

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ESTUDO DA ETIOLOGIA DAS PRINCIPAIS BACTÉRIAS ISOLADAS DE
MASTITE BOVINA EM REBANHOS LEITEIROS DE PROPRIEDADES
RURAIS DE GOIÁS**

Juliana Dias Martins

Orientador: Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau

GOIÂNIA
2012

JULIANA DIAS MARTINS

**ESTUDO DA ETIOLOGIA DAS PRINCIPAIS BACTÉRIAS ISOLADAS DE
MASTITE BOVINA EM REBANHOS LEITEIROS DE PROPRIEDADES
RURAIS DE GOIÁS**

Dissertação apresentada para obtenção
do grau de Mestre em Ciência Animal
junto à Escola de Veterinária e Zootecnia
da Universidade Federal de Goiás.

Área de Concentração:

Sanidade, Higiene e Tecnologia de Alimentos

Linha de Pesquisa:

Higiene, ciência, tecnologia e inspeção de alimentos

Orientador:

Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau - EVZ/UFG

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Albenones José de Mesquita- EVZ/UFG

Prof. Dr. Antônio Nonato de Oliveira – EVZ/UFG

GOIÂNIA
2012

À minha família e todas as pessoas que
acreditaram no meu potencial e que tiveram
de alguma forma participação nesta conquista.
Dedico.

AGRADECIMENTO

A presente dissertação não seria possível sem a colaboração e apoio de um conjunto de instituições e pessoas às quais qualquer agradecimento me soará necessariamente curto e insuficiente, pela importância individual de cada um no todo.

Primeiramente a Deus pelas oportunidades e pessoas maravilhosas que tenho em minha vida.

Agradeço aos meus pais, Cairo Alves Martins e Luzia Elena Dias Martins, pelo exemplo de vida, pelo amor incondicional, pelo apoio em todas as horas e por serem absolutamente fantásticos.

A minha irmã, Carla Elena Dias Martins, por me apoiar e incentivar sempre os meus estudos;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau, por sua paciência, amizade, ensino, dedicação e confiança durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores da pós, que colaboraram de forma significativa para minha formação acadêmica.

Ao meu colega, Marcelo Nascimento, pelo auxílio da parte estatística do trabalho.

Aos amigos e estagiários do Laboratório de Biologia Molecular e Laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisa em Alimentos: Bruno Moura, Ana Cristina, Michelly, Alana, Isabela, Nayana, Thiago Souza, Fernanda Luz, Gisely Prado, Keane, Nadielly Xavier e Caroline Schuster. Muito obrigada!

Ao Dr. Eurione A. G. da Veiga Jardim e Rodrigo Balduino pelas orientações e auxílio no desenvolvimento do projeto.

Ao Comitê de orientação pelos ensinamentos e apoio, Prof. Dr. Albenones José de Mesquita e Prof. Dr. Antonio Nonato de Oliveira.

Ao Fábio Filho, por todo amor, confiança, amizade e companheirismo.

Aos meus amigos e primas Marília Cristina, Samuel, Micaela, Marcos Paulo, Lívia Maria, Gabriela, Grazielle e Tamara. Obrigada pela amizade, ajuda, palavras de carinho e por estarem ao meu lado nesta etapa da vida.

A todos os colegas do Programa de Pós-graduação. Ao programa de Pós-graduação da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento desta pesquisa.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Qualidade do leite	5
2.2. Mastite bovina	6
2.3. Desenvolvimento da doença	7
2.3.1. Estabelecimento da infecção e inflamação do úbere.....	8
2.4. Tipos de agentes causadores	9
2.5. Agentes etiológicos	10
2.5.1. Gênero <i>Staphylococcus</i>	11
2.5.1.1. Estafilococos coagulase positiva	11
2.5.1.2. Estafilococos coagulase negativa	13
2.5.2. Gênero <i>Streptococcus</i>	14
2.5.3. <i>Mycoplasma bovis</i>	16
2.5.4. <i>Corynebacterium bovis</i>	17
2.5.5. Coliformes	18
2.5.6. <i>Nocardia</i> sp.....	19
2.5.7. <i>Bacillus</i> spp.....	19
2.5.8. <i>Prototheca</i> spp.....	19
2.6. Métodos de diagnóstico	20
2.6.1. Contagem de células somáticas (CCS)	21
2.6.2. Técnica de PCR em tempo real.....	24
2.7. Fatores que propiciam a redução na produção de leite	26
2.8. Fatores de risco para ocorrência de mastite bovina.....	27
2.9. Perfil de sensibilidade e resistência microbiana.....	28
2.10. Medidas gerais de controle e prevenção da mastite bovina	30
3. OBJETIVOS	36
3.1 Geral	36
3.2 Específicos	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1. Propriedades rurais.....	37
4.2. Amostras de leite	38
4.2.1. Análises microbiológicas e CCS.....	39
4.2.2. Procedimentos laboratoriais.....	39
4.2.3. Princípios analíticos	40
4.2.3.1. Detecção, identificação e quantificação de patógenos causadores de mastite subclínica através da técnica de PCR em Tempo Real	41
4.3. Planejamento experimental e análise estatística	42
4.3.1. Plano amostral da pesquisa	42
4.3.2 Análise estatística dos dados.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1. Dados das propriedades.....	44
5.2. Cultura e antibiograma.....	49
5.2.1. Fazenda D.....	49
5.2.1.1. Isolamento e identificação dos agentes causadores da mastite clínica.....	49
5.2.1.2. Antibiogramas	52
5.2.2. Fazenda B.....	55

5.2.2.1. Isolamento e identificação dos agentes causadores da mastite clínica.....	55
5.2.2.2. Antibiogramas	56
5.3. CCS e PCR em tempo real.....	58
6. CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXOS	85

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Representação esquemática da prevalência de mastite clínica e subclínica em um rebanho.	7
FIGURA 2. Califórnia Mastite Teste (CMT)	23
FIGURA 3 e 4. Municípios do Estado de Goiás onde foram realizadas as colheitas de amostras de leite bovino (identificados pelo marcador). Goiânia-GO, 2012.....	37
FIGURA 5. Antissepsia do esfíncter do teto com algodão embebido em álcool iodado e colheita de amostra de leite para cultivo microbiológico. Bela Vista-GO, 2011.....	39
FIGURA 6 – Equipamento Combifoss do LQL da UFG. Goiânia, 2011.	40
FIGURA 7. Propriedades leiteiras com manejo higiênico deficitário. A: sala de ordenha úmida e suja, teteira sujeita a contaminação. B: conjunto de ordenha sujo com fezes bovinas. C: desregulagem do vácuo da ordenhadeira. D, E e F: local para os animais pós ordenha. Goiânia, 2011.....	44
FIGURA 8. Modelo de solicitação de análises	89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Projeção de produção, consumo e exportação de leite do Brasil, no período de 2008 a 2020	1
TABELA 2 - Requisitos microbiológicos e de Contagem de Células Somáticas a serem avaliados pela Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite	2
TABELA 3. Principais características observadas entre as oito propriedades leiteiras avaliadas, localizadas no Estado de Goiás. Goiânia-GO, 2011.....	45
TABELA 4. Frequências (absoluta e relativa) de isolados bacterianos gram-positivos, frente ao total de isolamentos obtidos a partir de amostras de leite de vacas em produção da fazenda F localizada no município de Hidrolândia-GO. Goiânia-GO, 2011.	60
TABELA 5. Frequências (absoluta e relativa) de isolados bacterianos gram-positivos, frente ao total de isolamentos obtidos a partir de amostras de leite de vacas em produção da fazenda A localizada no município de Abadia de Goiás-GO. Goiânia-GO, 2011.....	61
TABELA 6. Frequências (absoluta e relativa) de isolados bacterianos gram-negativos, frente ao total de isolamentos obtidos a partir de amostras de leite de vacas em produção da fazenda F localizada no município de Hidrolândia-GO. Goiânia-GO, 2011.....	62
TABELA 7 - Frequência de patógenos isolados de 379 amostras de leite de fêmeas bovinas, em 7 propriedades leiteiras, durante os meses de junho de 2010 a junho de 2011.....	62

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. Perfil de sensibilidade antimicrobiana para bactérias Gram positivas.....	53
GRÁFICO 2. Perfil de sensibilidade antimicrobiana para bactérias Gram negativas.....	54
GRÁFICO 3. Perfil de sensibilidade antimicrobiana para bactérias Gram positivas.....	57
GRÁFICO 4. Perfil de sensibilidade antimicrobiana para bactérias Gram negativas.....	58
GRÁFICO 5. Frequência dos animais com ccs acima de 200.000 cs/mL.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

CCS	Contagem de células somáticas
et al.	e colaboradores
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
cél/mL	Células por mililitro
GO	Goiás
ton	Toneladas
%	Por cento
UFC	Unidades formadoras de colônia
°C	Graus Celsius
UHT	Ultra alta temperatura
CMT	California mastitis test
WMT	Wisconsin mastitis test
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
MT	Mato Grosso
CBT	Contagem bacteriana total
CCSI	Contagem individual de células somáticas
CCSLT	Contagem de células somáticas do leite do tanque
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
LQL	Laboratório de qualidade do leite
CPA	Centro de pesquisa em alimentos
LMB	Laboratório de microbiologia
LBM	Laboratório de biologia molecular
µL	Microlitro
IIM	Infecção intramamária
rpm	Rotações por minuto

RESUMO

A mastite bovina constitui-se num processo inflamatório da glândula mamária, com evolução aguda a crônica; ocorre quando um agente infeccioso agride a glândula mamária. Caracteriza-se por alterações físicas, químicas e sensoriais do leite, provocadas por microrganismo que invadem a glândula mamária e provocam modificações patológicas no tecido glandular. A mastite pode ser classificada quanto à forma de apresentação, em clínica ou subclínica. A forma clínica observa-se vários sintomas como secreção de leite com grumos, pus ou de aspecto aquoso, tetos e úbere apresentando edemaciados, rígidos e febris. Na forma subclínica os sinais na glândula mamária e no leite são inaparentes. A mastite constitui uma das principais causas de perdas econômicas nas explorações de bovinos leiteiros, devido principalmente à redução na produção de leite, alterações na composição e aumento da contagem de células somáticas (CCS). Objetivou-se neste trabalho, avaliar a prevalência das principais bactérias causadoras da mastite bovina (clínica e subclínica), e verificar o perfil de sensibilidade dos agentes a diversos antimicrobianos da mastite clínica. Os agentes mais isolados da mastite clínica foram *Streptococcus uberis* e *Staphylococcus aureus* e o antibiograma demonstrou uma maior eficácia dos princípios ativos linezolid, amikacina, gentamicina e imipenene, frente aos agentes isolados. Na mastite subclínica *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Staphylococcus* sp foram os agentes mais frequentemente identificados e que determinaram maiores valores médios de CCS. A CCS média dos rebanhos com mastite subclínica foi de aproximadamente 743×10^3 cel/mL. O estudo foi realizado em oito propriedades leiteiras, localizadas no Estado de Goiás. Os resultados encontrados foram analisados pela análise de frequência. Conclui-se que os resultados obtidos ressaltam a importância da avaliação do perfil de sensibilidade de microrganismos causadores de mastite clínica em cada rebanho estudado, possibilitando maior precisão na prescrição medicamentosa para os futuros casos de mastite clínica e a terapia da vaca seca. É importante também a utilização de outras técnicas como a de PCR em tempo real para a detecção dos principais microrganismos causadores de mastite subclínica, a qual pode ser indicada como método a ser utilizado na rotina, devido a sua especificidade, fornecendo um diagnóstico bacteriológico preciso.

Palavras-chave: mastite bovina, antibiograma, CCS, agentes etiológicos, leite.

ABSTRACT

The bovine mastitis consists of an inflammation of the mammary gland, with acute to chronic evolution, which occurs when an infectious agent attacks the mammary gland. It is characterized by physical, chemical and sensory alterations of the milk, caused by microorganisms that invade the mammary gland and cause pathological changes in the glandular tissue. Mastitis can be classified according to the form of presentation as clinical or subclinical. Several symptoms are observed in the clinical form of the disease such as the secretion of milk with lumps, pus or watery aspect, and edemaciated stiff and febrile teats and udder. On the other hand, no symptoms can be observed in the mammary gland and milk in subclinical cases. Mastitis is a major cause of economic losses in dairy cattle farms, mainly due to reduced milk production, changes in the composition and increased somatic cell count (CCS). The objective of this study was to evaluate the prevalence of the main bacteria that cause (clinical and subclinical) bovine mastitis, and to check the sensitivity to various antimicrobial agents of clinical mastitis. The agents most frequently isolated from clinical mastitis were *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* and the antibiogram demonstrated greater sensitivity and efficacy of the active principles linezolid, amikacin, gentamicin and imipenen regarding the isolated agents. In subclinical mastitis *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus* sp. Were the agents most frequently identified and that determined the highest mean values of CCS. The average CCS of cows with subclinical mastitis was approximately 743×10^3 cs/mL. The study was conducted in eight dairy farms in the State of Goiás. The results were obtained by frequency analysis. In conclusion, that the results emphasize the importance of assessing the sensitivity profile of microorganisms that cause clinical mastitis in each herd studied allowing greater precision in medication prescription for future cases of clinical mastitis and for dry cow therapy. The use of other techniques such as real time PCR is also important for the detection of the main microorganisms causin subclinical mastitis, which can be indicated as a routine method, due to its specificity, providing a precise bacteriological diagnosis.

Keywords: bovine mastitis, sensitivity, CCS, etiologic agents, milk.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca no cenário mundial como o segundo maior rebanho bovino, com 202 milhões de cabeças. Cerca de 10% está destinada à produção leiteira, o que em 2008 totalizavam 23 milhões de vacas em ordenha, com a produção de 30 bilhões de litros/ano (FAO, 2010)

O Brasil é considerado, pelos dados de 2010, o quinto maior produtor mundial de leite, porém, apresenta uma baixa produtividade (1,3 ton/vaca/ano), muito aquém de países como Estados Unidos (9,6 ton/vaca/ano) e Holanda (7,3 ton/vaca/ano), onde o regime intensivo prevalece, mas também de países como a Argentina (4,5 ton/vaca/ano) e Nova Zelândia (3,5 ton/vaca/ano), cujo regime de criação é baseado em pastagens (FAO, 2010). Dentre os fatores que se somam para justificar a baixa produtividade das vacas no Brasil está o fato de que os animais e os sistemas que são utilizados não estão adequados para a produção de leite (COSTA, 2002).

Em termos de participação regional tem-se que o Sudeste do país concentrou 40,5% da aquisição de leite cru, o Sul 32,0% e o Centro-Oeste 15,4% tomando por base o 1º trimestre de 2011. O estado de Goiás contribuiu com uma produção de 623.687 mil litros de leite no 1º trimestre de 2011 (IBGE, 2011).

De acordo com dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) no ano de 2009 (TABELA 1), estimou-se a produção de leite no Brasil em 31,12 bilhões de litros de leite, com uma taxa de crescimento anual de 1,95% (PRODUÇÃO, 2010).

TABELA 1. Projeção de produção, consumo e exportação de leite do Brasil, no período de 2008 a 2015.

Ano	Leite em bilhões de litros (Projeção)		
	Produção	Consumo	Exportação
2008/2009	30,4	26,58	1,05
2009/2010	31,12	27,33	1,10
2010/2011	31,80	27,93	1,18
2011/2012	32,46	28,52	1,27
2012/2013	33,12	29,11	1,35
2013/2014	33,78	29,71	1,44
2014/2015	34,45	30,30	1,52

Fonte: Elaboração da AGE/MAPA com dados do LSPA/IBGE, USDA e Embrapa Gado de leite (2010)

Com o objetivo de melhorar a qualidade do leite enquanto matéria-prima, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento instituiu a instrução normativa nº51 (IN 51) de 18 de setembro de 2002. Através da qual, o processo de coleta de leite cru passa a ser feito por caminhões isotérmicos, a granel, não sendo mais permitido o transporte de leite da propriedade ao laticínio em latões e sem refrigeração. Exceção se faz aos produtores que ordenham as vacas uma vez ao dia e que entregam o leite no resfriador comunitário, posto de resfriamento ou indústria processadora até duas horas após ordenha.

A qualidade do leite é fundamental para as indústrias e consumidores, tendo em vista sua grande influência nos hábitos de consumo e na produção de derivados. O leite é submetido a testes de avaliação, quantidade de células somáticas e de unidades formadoras de colônias de bactérias (UFC), para verificar a sua qualidade. São efetuadas análises, conforme as normas vigentes, visando garantir produtos com o menor risco possível para a população (TABELA 2).

TABELA 2 - Requisitos microbiológicos e de Contagem de Células Somáticas a serem avaliados pela Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite

Índice medido (por propriedade rural ou tanque comunitário)	A partir de 01/7/2008 até 31/12/2011 Regiões S/SE/CO. A partir de 01/7/2010 até 31/12/2012 Regiões: N/NE	A partir de 01/01/2012 até 30/6/2014 Regiões S/SE/CO. A partir de 01/1/2013 até 30/6/2015 Regiões N/NE	A partir de 01.7.2014 até 30.6.2016 Regiões: S / SE / CO A partir de 01.7.2015 a 30.6.2017 Regiões: N / NE	A partir de 01.7.2016 Regiões: S / SE / CO A partir de 01.7.2017 Regiões: N / NE
CPP (UFC/mL)	Máximo de $7,5 \times 10^5$	Máximo de $6,0 \times 10^5$	Máximo de $3,0 \times 10^5$	Máximo de $1,0 \times 10^5$
CCS (CS/mL)	Máximo de $7,5 \times 10^5$	Máximo de $6,0 \times 10^5$	Máximo de $5,0 \times 10^5$	Máximo de $4,0 \times 10^5$

Fonte: Instrução Normativa 62 de 29/12/2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Tanto na produção quanto na industrialização do leite, um dos fatores que mais reduzem a qualidade e a quantidade do produto obtido é a mastite. A

mastite bovina é a inflamação da glândula mamária, que se caracteriza por uma alteração física, química e organoléptica do leite e por modificações patológicas no tecido glandular (CORREA et al.,2006).

O conhecimento sobre os agentes causadores de mastite é importante para reduzir os prejuízos associados a estas afecções e para a definição de estratégias de controle da mastite, resultando em melhorias consideráveis da qualidade do leite.

Em relação à intensidade do processo inflamatório a mastite pode ser classificada em: clínica ou subclínica. A forma clínica pode ser aguda, subaguda ou crônica. As formas de evolução clínica aguda e subaguda apresentam na glândula mamária a sintomatologia clássica do processo inflamatório, facilmente evidenciáveis pelo exame clínico: edema, dor, calor, rubor. Na clínica subaguda a intensidade dos sintomas de inflamação na glândula mamária é discreta, mas há modificações visíveis no leite, observam-se grumos, filamentos, pus e às vezes, a secreção apresenta-se sanguinolenta. Na forma clínica crônica observa-se modificação na textura da glândula, há fibrosamento pela substituição do tecido glandular produtivo por conjuntivo e observam-se alterações na secreção do leite. A mastite subclínica caracteriza-se pela diminuição da produção leiteira, sem que, contudo, se observem sinais de processo inflamatório ou fibrosamento (BRADLEY, 2002; RADOSTITS et al., 2007; SANTOS & FONSECA, 2007; TOZZETTI et al., 2008). Esta forma de manifestação da mastite é a responsável pelos maiores prejuízos na produção leiteira; estima-se que, para cada vaca com mastite clínica, existam em média sete, ou mais, com mastite subclínica (SANTOS & FONSECA, 2007).

As identificações dos agentes infecciosos em amostras de leite podem ser feitas através de técnicas microbiológicas, as quais constituem métodos auxiliares no monitoramento das mastites, pois preservam a viabilidade dos microrganismos presente na amostra. Técnicas de microbiologia convencional que fazem o isolamento do agente microbiano e a identificação bioquímica levam em média dois a três dias, até mesmo semanas para o resultado. Portanto várias técnicas têm sido desenvolvidas para que acelerem os processos, como é o caso dos métodos moleculares que são mais rápidos, específicos, sensíveis e precisos (YANG et al., 2001; VERSALOVIC & LUPSKI, 2002).

A determinação da etiologia da mastite em rebanhos leiteiros permite estabelecer os pontos críticos e, portanto, a partir deste conhecimento poder-se-á estabelecer medidas de prevenção efetivas para o controle da afecção.

A mastite pode ser classificada como contagiosa ou ambiental de acordo com o tipo de microrganismo causador das infecções nos rebanhos (ESSLEMONT & KOSSAIBATI, 2002), a mastite normalmente ocorre em resposta à infecção intramamária, principalmente bacteriana, mas também micoplasmática, micótica (fúngica), ou infecções por algas. As principais bactérias causadoras da mastite são *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus sp.*, *Corynebacterium bovis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Peptoniphilus indolicus*, *Klebsiella sp.*, *Serratia marcescens*, *Mycoplasma* (BEER, 1999; PHILPOT & NICKERSON, 2002; BUENO et al., 2006; RADOSTITS et al., 2007).

No Brasil predominam as mastites de etiologia contagiosa o que indica que o principal momento de transmissão é a ordenha, portanto, adoção de medidas preventivas efetivas corrigindo eventuais falhas no manejo da ordenha, provavelmente obter-se-ia redução da prevalência e incidência a níveis desejáveis.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Qualidade do leite

A perda de qualidade do leite assume destaque no que se refere à saúde pública. No Brasil, são freqüentes os casos de doenças associadas ao consumo de leite cru ou de derivados produzidos com leite contaminado com microrganismos patogênicos (FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004).

A produção de leite de alta qualidade deve ser a prioridade para estabelecer um mercado forte para o leite e derivados, uma vez que a qualidade do leite cru determina a dos produtos lácteos (SANTOS; BERGMANN, 2003).

Segundo FONSECA & SANTOS (2000) a contaminação microbiana do leite *in natura* pode ocorrer por vias endógenas, decorrentes de infecções dos animais, incluindo os processos inflamatórios da glândula mamária, ou por vias exógenas, com destaque para superfície exterior do úbere e dos tetos, as mãos do ordenhador, os utensílios e equipamentos de ordenha e as condições de armazenamento do leite.

O leite apresenta uma composição rica em proteínas, vitaminas, gordura, carboidratos e sais minerais (principalmente cálcio), sendo fonte essencial à saúde do homem. A composição média do leite consiste em 87,4% de água e 12,6% de sólidos totais, sendo 3,9% de gordura, 3,2% de proteína, 4,6% de lactose e 0,90% de minerais e outros sólidos (WALSTRA et al., 1987). Quanto maior for a concentração de sólidos no leite, maior será o rendimento dos derivados lácteos. Leite com alta contagem de células somáticas (CCS) afeta negativamente a produção de leite em pó, manteiga e leite UHT, reduzindo a vida de prateleira, e produzindo sabores indesejáveis. Com relação à saúde pública, à medida que há aumento de CCS do rebanho, maior é a probabilidade de serem encontrados resíduos de antimicrobianos no leite (SOUZA et al., 2004).

O mercado interno e externo está mais exigente. Considerando não somente o ganho financeiro adquirido com a produção de leite de alto padrão, a melhoria na qualidade deste produto reflete a maior eficiência da produção nas propriedades rurais e eleva o rendimento dos produtos lácteos na indústria.

Conseqüentemente, esta eficiência beneficia o negócio destas empresas e da cadeia de leite como um todo (NASCIMENTO et al., 2001; NERO et al., 2005).

2.2. Mastite bovina

A mastite bovina constitui-se num processo inflamatório da glândula mamária, com evolução aguda a crônica, ocorre quando um agente infeccioso agride a glândula mamária, caracterizada pela redução da secreção de leite e mudança de permeabilidade da membrana dos ácinos, o que ocasiona mudança na sua composição (COSTA, 1998; LANGONI, 2000). A reação inflamatória é um mecanismo de defesa para eliminar o agente agressor, neutralizar suas toxinas e auxiliar no reparo dos tecidos produtores de leite (PHILPOT & NICKERSON, 2002).

Segundo PHILPOT & NICKERSON (2002) a mastite bovina pode ser clínica ou subclínica de acordo com a apresentação. A primeira caracteriza-se por apresentar sinais visíveis; enquanto a forma subclínica exige o emprego de outros métodos de diagnóstico, como a contagem de células somáticas (CCS), que é afetada, principalmente pela infecção intramamária; “California Mastitis Test” – CMT, o “Wisconsin Mastitis Test” – WMT e o “Whiteside” (MACHADO et al., 2008; RUPP et al., 2000; SOUZA, 2011).

Ambas as formas, clínica e subclínica, afetam a produção e a composição do leite e de seus derivados, sendo a mastite subclínica a forma mais importante, pois ocorre com maior frequência, não apresenta sintomas aparentes e normalmente antecede a clínica (MATIOLI et al., 2000), ela leva a alterações nos teores de cloro, sódio e proteínas séricas, diminuição nos teores de caseína, lactose, cálcio e gordura do leite (BRADLEY, 2002; GIANOLA et al., 2004; DIAS, 2007; SANTOS & FONSECA, 2007).

A elevação da CCS e as mudanças na composição do leite estão diretamente relacionados com a superfície do tecido mamário atingido pela reação inflamatória, portanto, há uma relação direta entre a CCS e a concentração dos componentes do leite (SCHÄELLIBAUM, 2000).

O leite obtido de quartos mamários de animais sadios contém de 50 a 200.000 células/mL. Na dependência da severidade e extensão da infecção e,

do tipo de microrganismo envolvido, a contagem pode variar de 200.000 a 5.000×10^3 células/ mL de leite (MALEK & SANTOS, 2008).

Segundo COSTA (1998) na mastite clínica o leite pode apresentar desde alguns coágulos até soro com aglomerados de fibrina na secreção. Ele pode ser encontrado na forma aquosa, contendo grumos finos, graúdos ou cremosos, além de outras substâncias, como fibrina, soro, sangue e pus. Pode ou não ter um cheiro anormal.

Cabe ressaltar que a mastite subclínica apresenta uma prevalência muito maior do que a mastite clínica, especialmente em rebanhos que apresentam um manejo de ordenha inadequado e conseqüentemente um alto índice de mastite contagiosa (FIGURA 1).

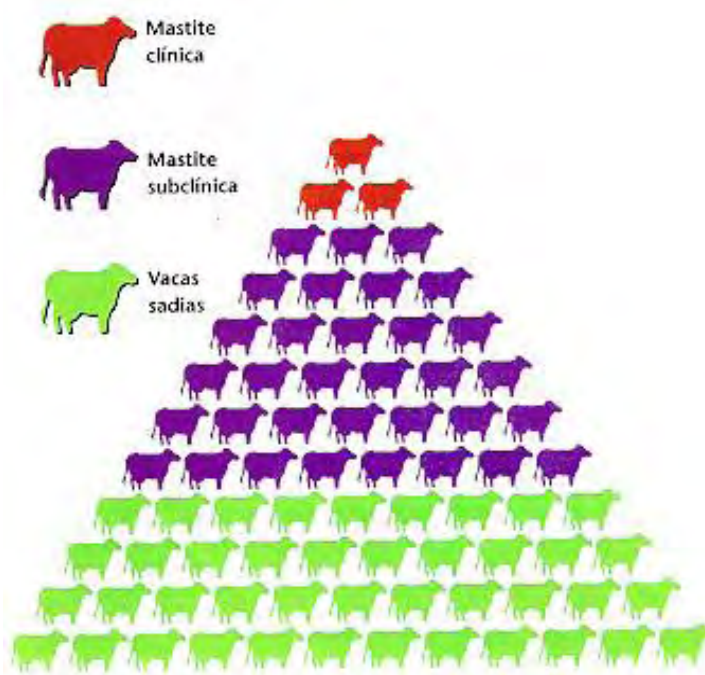


FIGURA 1. Representação esquemática da prevalência de mastite clínica e subclínica em um rebanho.

Fonte: SANTOS & FONSECA (2007).

2.3. Desenvolvimento da doença

A glândula mamária sadia é protegida por uma variedade de mecanismos de defesas naturais. Estes mecanismos podem ser não

imunológicos (inespecíficos) ou imunológicos (GIRAUDO, 1996). O primeiro deles está constituído por uma barreira física, que inclui canal e esfíncter do teto, os quais possuem propriedades defensivas como um mecanismo de oclusão relativamente eficiente e proteínas bactericidas (HILLERTON, 1996; NICKERSON, 2008).

O teto é a primeira linha de defesa contra a penetração de bactéria no úbere. Normalmente, o músculo do esfíncter fecha o canal do teto quando a vaca não está sendo ordenhada. A invasão do teto geralmente ocorre durante a ordenha ou imediatamente após. Depois da ordenha, o canal do teto permanece dilatado por uma a duas horas, o que torna importante o animal permanecer pós ordenha em um ambiente limpo, pois microrganismos do ambiente (fezes, material da cama, etc) ou aqueles encontrados na pele lesada da extremidade do teto podem facilmente invadir um canal aberto ou parcialmente aberto (WATTIAUX, 2010).

A penetração da bactéria no teto não é condição suficiente para que haja infecção, o microrganismo precisará se fixar nos tecidos. Quando isto acontecer se estabelece a infecção (DUQUE et al., 2005).

2.3.1. Estabelecimento da infecção e inflamação do úbere

Primeiramente, a bactéria danifica o tecido que envolve os ductos coletores maiores de leite, e encontrar-se leucócitos presentes naturalmente em pequeno número no leite que são a segunda linha de defesa, podendo englobar e destruir bactérias. Entretanto, durante esse processo, os leucócitos liberam substâncias que causam o movimento de leucócitos adicionais do sangue para o leite (ARAÚJO & GHELLER, 2005). Quando as bactérias não são totalmente destruídas, elas continuam a se multiplicar e começam a invadir os ductos menores e as áreas alveolares.

As bactérias produtoras de toxinas danificam as células secretoras de leite que liberam substâncias que resultam no aumento da permeabilidade dos tecidos sanguíneos. Assim, leucócitos adicionais movem para o lugar da infecção. Eles entram no tecido alveolar em grande número e se infiltram pelas células secretoras de leite danificadas (ARAÚJO & GHELLER, 2005; CARNEIRO, 2009). Fluídos, minerais e fatores de coagulação também

penetram na área afetada. Os coágulos de leite podem fechar os ductos e isolar as regiões infectadas. Contudo, os microrganismos podem ser eliminados e a infecção terminar. Neste caso, os ductos obstruídos posteriormente são abertos e a composição e produção retornam ao normal em alguns dias (CARNEIRO, 2009).

Entretanto, se a infecção persiste e os ductos permanecerem obstruídos, o leite retido faz com que as células secretórias revertam para um estado de descanso (não produção) e o alvéolo começa a regredir. Substâncias liberadas pelos leucócitos levam à completa destruição das estruturas alveolares, que são substituídas por tecido conjuntivo e cicatricial (WATTIAUX, 2010).

A terceira linha de defesa será a destruição do tecido secretório de leite para que ocorra o controle da infecção. Portanto, à medida que a doença progride, o número de células somáticas no leite torna-se elevado e associado com uma (permanente) redução da produção de leite.

2.4. Tipos de agentes causadores

De acordo com as maneiras de transmissão a mastite pode ser classificada como contagiosa ou ambiental, a mastite contagiosa apresenta baixa incidência de casos clínicos e alta incidência de casos subclínicos, normalmente de longa duração ou crônicos e nestes casos apresenta alta contagem de células somáticas (SANTOS & FONSECA, 2007). A mastite contagiosa é causada por patógenos cujo habitat preferencial é o interior da glândula mamária e a superfície da pele dos tetos (LANGONI, 2000).

Os principais microrganismos bacterianos que promovem a mastite contagiosa são *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma bovis*, *Corynebacterium bovis*. A contaminação ocorre principalmente durante a ordenha, pelas mãos do ordenhador ou de teteiras na ordenha mecânica (SILVA, 2003). Para que haja a transmissão, é necessário que exista um elemento de ligação entre um quarto infectado e um quarto sadio (LANGONI, 2000; FREITAS, 2001).

A mastite ambiental é causada por microrganismos oportunistas que vivem no ambiente de ordenha ou de curral. A transmissão pode ocorrer no

período de ordenhas ou entre as mesmas, principalmente, quando as vacas se deitam nos ambientes contaminados (RADOSTITS et al., 2007; SILVA, 2003; SANTOS & FONSECA, 2007).

Geralmente, a mastite ambiental é de curta duração, com maior tendência a evoluir para um quadro clínico que para a forma subclínica. As infecções por estreptococos ambientais têm duração menor que 30 dias. Porém, em rebanhos com CCS maior que 750.000 cs/mL cerca de 20% das infecções por estreptococos ambientais persistem por mais de 100 dias e evoluem para uma mastite crônica não responsiva ao tratamento com antibióticos (SANTOS & FONSECA, 2007).

Os microrganismos prevalentes são *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, espécies de *Citrobacter*, *Serratia* e *Proteus*, *Streptococcus uberis*, *S. faecalis*, *S. faecium* e outros *Streptococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Actinomicetales* (*Arcanobacterium pyogenes*, *Nocardia asteróides* e *N. brasiliensis*), leveduras, fungos micelianos e algas (*Prototheca zopfi*) (BUENO et al., 2006; COSTA, 2008; SILVA, 2003; SANTOS & FONSECA, 2007).

2.5. Agentes etiológicos

A incidência quanto à etiologia pode ser de forma variável, de acordo com a criação, higiene, fatores predisponentes onde se pode citar: a grande produção leiteira aliada com rações ricas em proteínas, traumas mamários por presença de pastos sujos, maus tratos, cabeçada de bezerros lactantes e o método de ordenha que será realizado (CORREA et al., 2006).

A invasão microbiana ocorre tanto no período seco como durante a lactação. A desinfecção pós-ordenha com germicida auxilia na redução da colonização do canal do teto. A patologia manifesta-se quando os microrganismos entram pelo canal do teto, passam livremente pelas defesas do hospedeiro e multiplicam-se (COSTA, 1998).

Embora cerca de 137 microrganismos diferentes possam estar envolvidos na etiologia da mastite bovina, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* são responsáveis por cerca de 80% dos casos. Menos que 5%

das infecções são causadas por *C. bovis*, *Pseudomonas* sp., *Mycobacterium* sp., *Nocardia asteroides*, *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *Serratia* sp. e *Prototheca* sp. (RANJAN et al., 2006).

2.5.1. Gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* é composto por 43 espécies e 17 sub-espécies, dentre elas, as espécies coagulase positivas apresentam maior importância clínica devido aos seus fatores de patogenicidade (SANTOS & FONSECA, 2007).

As espécies do gênero *Staphylococcus* são mesófilos típicos, apresentando temperatura ótima para multiplicação de 35°C, embora possam crescer entre 10 e 45°C. A variação de pH que permite crescimento do agente é de 4,2 a 9,3 (KLOSS & SCHLEIFER, 1994). *Staphylococcus* spp. multiplicam bem em alimentos com atividade de água de 0,83, valor bastante baixo para a maioria dos microrganismos, sendo a atividade de água ótima para seu crescimento e produção de enterotoxinas de 0,99 (ADAMS & MOSS, 1997).

Pertence à família *Micrococaceae*, sendo microrganismos gram-positivos, imóveis, anaeróbios facultativos, catalase positiva (BIER, 1990).

BENITES et al. (2001) estudaram a ocorrência de mastites em 140 glândulas mamárias de 35 vacas e encontraram um predomínio no isolamento de microrganismos do gênero *Staphylococcus* (60,71%), sendo que 54,29% corresponderam a *Staphylococcus* coagulase negativos e 6,43% a *Staphylococcus* coagulase positivos.

BARBALHO & MOTA (2001) encontraram nos exames microbiológico de 104 amostras de leite provenientes de 43 animais estudados, que as bactérias do gênero *Staphylococcus* sp foram isoladas de 50 amostras, correspondendo a 38,76% do total dos agentes isolados.

2.5.1.1. Estafilococos coagulase positiva

Dentre as espécies que são positivas ao teste da coagulase o *Staphylococcus aureus* é o principal. FOX & GAY (1993) estimaram que cerca de 19 a 40,7% das vacas com mastite são infectadas por este microrganismo.

ALMEIDA (1997) observou que o *Staphylococcus aureus* é capaz de invadir e se multiplicar dentro das células epiteliais da glândula mamária bovina, podendo este mecanismo ser um pré-requisito para a infecção, além de levar a resultado falso negativo nos exames bacteriológicos e influenciar na eficácia dos antibióticos usados no tratamento das mastites causadas por esse microrganismo (VOLTOLINI, 2001).

Atualmente, *S. aureus* destaca-se como um dos microrganismos mais freqüentemente associados às infecções intramamária de bovinos e o agente que isoladamente determina as maiores perdas na pecuária leiteira (ANNEMÜLLER et al., 1999; SCHLEGELOVÁ et al., 2003; VASUDEVAN et al., 2003).

A transmissão ocorre principalmente através de fômites. Uma vez instalado no interior da glândula mamária, este agente tem a propriedade de fixar-se às células epiteliais e estabelecer uma infecção através de variados mecanismos patogênicos, como por exemplo, a produção de toxinas. Isto pode resultar em necrose do estroma e parênquima mamário, estabelecendo-se nesse local um foco de infecção. Tal necrose resulta em perda de função secretora e conseqüente redução significativa da produção de leite (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2008).

Quando o *S. aureus* progride através dos ductos da glândula mamária, as toxinas causam injúrias ao epitélio ductal, resultando na liberação de substâncias quimiotáxicas, atraindo leucócitos. As toxinas causam também liberação de lisossomos leucocitários, aumentando a injúria ao epitélio mamário (ALBERTON et al., 2001).

FITZGERALD et al. (1997) relataram que a mastite clínica e subclínica de causa estafilocócica é de considerável relevância na Suíça, onde este agente representa cerca de 40% dos isolamentos. No Brasil, *S. aureus* é considerado o principal agente causal da mastite bovina, com taxas de isolamento variáveis entre 8,3% e 49,23% (LANGONI et al., 1991; COSTA et al., 1995; MORETTI et al., 1998; BRITO et al. 1998; LAFFRANCHI, 2001; DONATELE et al., 2002).

GONÇALVES (2006) analisou 217 amostras de leite mastíticos e identificou a presença de *S. aureus* na proporção de 34,61%.

MARTINS et al. (2010) examinadas 108 vacas pertencentes a rebanhos da microrregião Cuiabá-MT. Em seguida, submeteram-se 279 amostras de leite provenientes de quartos mamários mastíticos a provas microbiológicas. Quanto à etiologia, nos casos de mastite subclínica os agentes mais isolados foram *Corynebacterium* spp. (27,6%) e *Staphylococcus aureus* (21,5%). Dentre os casos de mastite clínica, isolaram-se com maior frequência *S. aureus* (44,0%) e *Corynebacterium* spp. (12,0%).

TRONCARELLI & LANGONI (2011) analisaram 6.066 amostras de leite provenientes de 20 propriedades localizadas no centro oeste do Estado de São Paulo, e 1.364 amostras identificaram a presença de microrganismos, destas 16,6% encontravam-se com *S. aureus*.

2.5.1.2. Estafilococos coagulase negativa

Os SCN são agentes de baixa patogenicidade, as manifestações são na forma subclínica, resultam em aumento de CCS, cerca de duas a três vezes acima dos valores normais dos quartos sadios. A presença desses microrganismos é maior em propriedades que reduziram o número de infecções causadas por outros patógenos, sendo mais frequentes em animais de primeira lactação (MARQUES, 2003; SANTOS & FONSECA, 2007).

Os SCN são agentes que colonizam a pele dos tetos e causam infecções oportunistas. Trata-se de um grupo bastante heterogêneo que embora apresente comportamento predominantemente contagioso possui espécies, *S. sciuri* e *S. xylosus*, que podem ser encontradas em altas contagens no ambiente e nas camas dos animais e ter disseminação ambiental. Estudos têm demonstrado que estes agentes apresentam grande importância na etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas (PARDO et al., 1998; LAFFRANCHI, 2001) e em rebanhos nos quais as infecções por *S. aureus* e *S. agalactiae* foram controladas (HARMON & LANGLOIS, 1989; SILVA et al., 1999; SEARS & MCCARTHY, 2003).

Essas bactérias são de interesse, porque são frequentemente isoladas em todos os rebanhos (PHILPOT & NICKERSON, 2002).

Os *Staphylococcus* Coagulase Negativos (SCN) são patógenos comuns em rebanhos leiteiros principalmente associados aos casos subclínicos de

mastite. As mastites por *Staphylococcus* coagulase negativa são causadas por *S. epidermidis*, *S. chromogenes* e *S. simulans* encontrados com alta frequência em amostras de leite. A prevalência de *S. epidermidis* é de 11,3 a 23,19% (NADER FILHO et al., 1985; SANTOS & FONSECA, 2007).

Dentre os SCN causadores de mastite subclínica, FILIPPSEN et al. (1999) isolaram com maior frequência os seguintes estafilococos: *Staphylococcus epidermidis* (19,3%), *Staphylococcus hyicus* (12,7%), *Staphylococcus haemolyticus* (10,7%) e *Staphylococcus warneri* (10,3%).

No Brasil, levantamentos realizados em diversas regiões do país apontaram prevalências de SCN variáveis entre 12,3% e 46,32% (NADER et al., 1984; BRITO et al., 1998; PARDO et al., 1998; BARBALHO & MOTA, 2001; DONATELE et al., 2002).

2.5.2. Gênero *Streptococcus*

O gênero *Streptococcus* tem considerável importância na etiologia das mastites em bovinos. Pertencem à família *Streptococaceae*, gênero *Streptococcus* e são cocos Gram-positivos geralmente dispostos aos pares ou em cadeias, anaeróbios facultativos ou estritos, catalase negativos (BIER, 1990). Três espécies são mais frequentemente identificadas como causadoras de mastite, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e o *Streptococcus uberis*, sendo o *Streptococcus agalactiae* o mais prevalente (FERNANDES, 2006).

Os estreptococos estão entre as bactérias mais exigentes em relação às suas necessidades nutritivas. Não crescem em meios com extrato de carne ou seu crescimento é pobre mesmo no infuso, a menos que seja enriquecido com sangue ou soro. Ágar infuso de carne equina é um excelente meio para isolamento dos estreptococos em animais (PHILPOT & NICKERSON, 2002).

O *Streptococcus agalactiae* é um microrganismo contagioso, obrigatório da glândula mamária. Causa em sua maioria mastites subclínicas que tendem à forma crônica (GONZALEZ et al., 2004; KEEFE, 1997; PICOLI et al., 2010). É disseminado muitas vezes por equipamento de ordenha, medicações intramamárias que não eliminam o agente e no momento da ordenha realizada sem higiene (HIRSH & ZEE, 2003).

Segundo DUARTE et al., (2004), as taxas de infecção para o *S. agalactiae* variam bastante entre rebanhos, sendo encontrados altos índices de morbidade em rebanhos nos quais as medidas de controle têm sido negligenciadas. As infecções intramamárias ocasionadas por *S. agalactiae* estão geralmente associadas com elevadas contagens de células somáticas no leite do tanque e contagem bacteriana total (CBT) e decréscimo na quantidade e qualidade do leite produzido pelo animal/rebanho infectado (ZAFALON et al., 2008; MERL et al., 2003).

No Brasil, *S. agalactiae* tem sido relacionado como um dos principais agentes etiológicos da mastite bovina. Entretanto, a maioria dos trabalhos não identifica os isolados de *Streptococcus*, os quais são relatados como *Streptococcus* spp. São citadas taxas de isolamento que variam entre 4,6% e 28,05% (BRANT & FIGUEIREDO, 1994; COSTA et al., 1995; PARDO et al., 1998; BRITO et al. 1998; BARBALHO & MOTA, 2001; LAFFRANCHI, 2001; MOTA et al., 2004).

O *Streptococcus uberis* é um agente de difícil eliminação do rebanho e apresenta características que causam impactos importantes sobre a qualidade do leite, pois as vacas apresentando mastite clínica causada por este agente podem ter elevada contagem bacteriana no leite (BRITO et al. 1998; LAFFRANCHI, 2001).

Além da glândula mamária de vacas infectadas, essa bactéria pode ser encontrada em diversos locais do corpo do animal, como por exemplo, na superfície da pele, trato genital, e no solo. A ocorrência de picos diários da contagem bacteriana total (CBT) do leite pode estar associada com elevado nível de mastite causada por *Streptococcus uberis*, pois em um estudo realizado por SANTOS & FONSECA (2007) as causas destes picos foi verificado em cerca de 50% das ocorrências.

S. uberis tem grande importância como um microrganismo associado ao ambiente, especialmente em sistemas de confinamento, que empregam camas de palha, onde pode alcançar altas concentrações (HILLERTON, 1996; HILLERTON & BERRY, 2003). Considera-se que vacas criadas a pasto são menos propensas à infecção por este microrganismo. Entretanto, de acordo com HARMON et al. (1992) a população deste agente em pastagens intensivamente utilizadas pode ser semelhante àquela observada em materiais

de camas. Diferentes formas de apresentação podem ser observadas quando do envolvimento de *S. uberis* na mastite bovina, inclusive infecções crônicas. Segundo HILLERTON & BERRY (2003), os estreptococos ambientais podem ser responsáveis por até um terço dos casos clínicos de mastite nos rebanhos onde os patógenos contagiosos foram controlados.

O *Streptococcus dysgalactiae* não é um patógeno obrigatório da glândula mamária. Pode ser isolado das tonsilas e causar infecção dos tetos por lambadura, o que explicaria a alta frequência de mastite em novilhas e vacas secas (SANTOS & FONSECA, 2007). Esses organismos não podem ser eliminados de um rebanho porque fazem parte do ambiente normal. A taxa de infecção dessas bactérias tende a aumentar quando as condições são favoráveis ao seu crescimento, por exemplo, durante os meses úmidos e chuvosos do ano (WATTIAUX, 2010).

2.5.3. *Mycoplasma bovis*

O microrganismo *Mycoplasma bovis* pertencem à família *Mycoplasmataceae*, gênero *Mycoplasma*, pleomórficos, cocos Gram- negativo, motilidade, geralmente são imóveis, mas alguns são móveis (movimento rotatório flexional e translacional – helicoidais), não possui parede celular, como as demais bactérias (HIRSH & ZEE, 2003). É considerado, dentre as várias espécies de micoplasma, o mais frequente e patogênico das infecções da glândula mamária sendo responsável por surtos esporádicos e altamente contagiosos (SANTOS, 2002; HIRSH & ZEE, 2003; SANTOS & FONSECA, 2007).

HALE et al. (1962) relataram o primeiro caso de mastite bovina por *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis*, posteriormente denominado de *Mycoplasma bovis*. No Brasil, a primeira citação de mastite por *M. bovis* foi de METTIFOGO et al. (1996) na região de Londrina, Estado do Paraná.

A mastite por *M. bovis* caracteriza-se pelo aumento de casos clínicos que não respondem à terapêutica, gravidade dos sintomas, múltiplos quartos com infecção e redução acentuada na secreção láctea (BUSHNELL, 1984). *M. bovis* pode ser introduzido em rebanhos livres da doença pela aquisição de animais portadores. No rebanho o microrganismo é disseminado durante a

ordenha, aerossóis e secreções de animais com distúrbios respiratórios e genitais. As vias hematogena ou linfática são responsabilizadas pela disseminação do micoplasma de um órgão infectado para outro (SACHSE et al., 1993). A principal medida de controle das mastites por *M. bovis* é a detecção de animais infectados e a eliminação dos mesmos.

A identificação do micoplasma como agente causador da mastite é difícil porque necessita de técnicas de cultura especiais que não são feitas rotineiramente (SANTOS, 2003). Normalmente, quando não cresce nenhuma colônia bacteriana em ágar sangue suspeita-se desse agente (PRETTO, 2001).

2.5.4. *Corynebacterium bovis*

Microrganismo Gram-positivo, encontrado principalmente no interior da glândula mamária e ducto do teto. São bastonetes pleomórficos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, catalase positivos e fermentadores (BEER, 1999; CORREA et al., 2006).

O gênero *Corynebacterium* é uma das causas mais freqüentes de mastite (20 a 30%), devido a sua baixa patogenicidade e alta contagiosidade. Detectado principalmente na forma subclínica da doença, o que de certa forma garante proteção à glândula mamária contra outras células patogênicas. Estas características determinam a classificação desse agente como um patógeno secundário (SANTOS & FONSECA, 2007).

A transmissão ocorre principalmente durante o momento da ordenha. A alta incidência de *Corynebacterium bovis* em um rebanho indica deficiência na desinfecção dos tetos pós ordenha (LARANJA, 1996).

Apresenta limitada virulência, determinando um pequeno aumento da CCS (300.000 a 400.000 células/mL) e acarreta prejuízos econômicos, visto que deprecia a qualidade do leite (LARANJA & MACHADO, 1994).

Geralmente as taxas de isolamento deste patógeno são mais elevadas em rebanhos nos quais existem falhas com relação à assepsia de tetos (WATTS, 2000). Levantamentos realizados em rebanhos de diferentes bacias leiteiras brasileiras apontaram prevalências para *C. bovis* entre 9,3% e 55,19% (BRITO et al., 1998; PARDO et al., 1998; BARBALHO & MOTA, 2001; LAFFRANCHI, 2001; MOTA et al., 2004; COSTA, 2005).

TRONCARELLI & LANGONI (2011) analisaram 6.066 amostras de leite provenientes de 20 propriedades localizadas no centro oeste do Estado de São Paulo, e 1.364 amostras identificaram a presença de microrganismos, destas 32% encontravam-se com *Corynebacterium sp.*

2.5.5. Coliformes

Os coliformes são bactérias Gram negativas que normalmente habitam o solo e o intestino das vacas. Elas se acumulam e se multiplicam no esterco e na cama. Coliformes podem causar mastite apenas se partículas contaminadas do ambiente entrarem em contato com o úbere. As infecções intramamárias causadas por coliformes são mais prevalentes em vacas com baixa CCS e sem infecção por outro microrganismo na glândula mamária (SANTOS & FONSECA, 2007).

Dentre as bactérias pertencentes a esse grupo estão a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* e *Serratia sp.* A *Escherichia coli* é o patógeno predominante nas infecções ambientais (RIBEIRO et al., 2002). As mastites causadas por *E. coli* ocorrem geralmente durante o período seco e logo após o parto são geralmente transitórias e associadas com quadros clínicos agudos ou superagudos, que podem ser fatais (BURVENICH et al., 2003; HOGAN & SMITH, 2003). Entretanto, tem sido demonstrado que *E. coli* pode determinar infecções persistentes da glândula mamária e que as amostras dotadas desta capacidade têm maior habilidade em invadir e replicar no interior de células epiteliais (DOGAN et al., 2006).

O gênero *Klebsiella spp.* é um coliforme que está presente em material vegetal como na serragem utilizada na cama dos animais, e é muito resistente e possui multiplicação rápida (HIRSH & ZEE, 2003).

Segundo SANTOS & FONSECA (2007), as vacas mais susceptíveis à manifestação severa de mastite por coliformes são aquelas mais velhas, no início de lactação e de maiores produções. As infecções que ocorrem no início da lactação (menos de sessenta dias), aproximadamente 50% se iniciam durante o período seco, podendo ocorrer cura espontânea ou permanecerem latentes e apenas ocasionalmente desenvolverem sinais clínicos.

2.5.6. *Nocardia* sp.

É uma bactéria Gram positiva encontrada em solos e água. De acordo com SANTOS & FONSECA (2007), a *Nocardia* sp. causa mastite aguda, com febre, evoluindo para uma mastite crônica e pneumonia. A infecção se instala quando existe contaminação de equipamentos e do próprio úbere através de água contaminada.

As infecções causadas por *Nocardia* sp. não respondem bem a antibioticoterapia, pois o agente é resistente a maioria dos antibióticos. Assim, as medidas de controle incluem o uso de produtos descartáveis para tratamento intramamário, sendo desaconselhável a utilização de produtos de uso múltiplo, o descarte de vacas positivas com a infecção ou secagem permanente do quarto afetado (SANTOS & FONSECA, 2007).

2.5.7. *Bacillus* spp.

O gênero *Bacillus* é uma bactéria Gram positiva, formadora de esporos, saprófita e patógeno oportunista. Os casos de mastites por *B. cereus* freqüentemente estão associados a contaminação cirúrgica ou lesões nos tetos (BARBALHO & MOTA, 2001). Segundo BRITO & BRITO (1999), o tratamento é difícil e resulta quase sempre na morte do animal. Estes bacilos produzem toxinas que permanecem no leite mesmo após a eliminação do agente, durante o processamento industrial (pasteurização ou outro tratamento térmico).

2.5.8. *Prototheca* spp.

Prototheca spp. são algas imóveis, aeróbias que utilizam a glicose como fonte de carbono, apresentam morfologia celular esférica ou oval, da família Chlorellaceae, unicelulares, de distribuição universal. Tem causado interesse por parte dos pesquisadores em mastites e se mostram como agentes importantes tanto nas mastites subclínicas como clínicas, com envolvimento em casos de toxiinfecção alimentar a partir da ingestão de queijo contaminado por *Prototheca zopfii* (LANGONI, et al., 1991; COSTA et. al., 1995; BUENO et al., 2006).

Os primeiros registros de surtos de mastite bovina causada por *Prototheca* spp. no Brasil datam de 1992 e referem-se a propriedades leiteiras situadas em Tambaú e Itapetininga, no estado de São Paulo (COSTA et al., 1995; LANGONI et al., 2000).

Leveduras e algas da espécie *Prototheca zopfii* são considerados agentes incomuns da mastite bovina (RANJAN et al., 2006). Esses agentes são encontrados em locais úmidos e ricos em matéria orgânica, sendo facilmente isolados do epitélio externo dos tetos e de equipamentos de ordenha. A mastite bovina causada por *P. zopfii* apresenta importância econômica, social e em saúde pública. Em saúde pública sua importância está relacionada com a transmissão de infecção gastroentérica, principalmente em indivíduos jovens, devido à ingestão de leite contaminado (BEXIGA et al.; 2003; BUZZINI et al., 2004; BUENO et al., 2006).

Segundo JANOSI et al. (2001), a mastite causada por este agente, embora incomum, é característica de rebanhos de alta produtividade onde existem falhas na higiene de ordenha e do ambiente. Os dados disponíveis na literatura apontam baixas taxas de isolamento para *Prototheca zopfii*, sendo citados índices que variam entre 0% e 2,89% (LANGONI, 1997; FILIPPSEN et al., 1999; PARDO et al., 1998; MOTA et al., 2004), contudo, eventualmente verificam-se surtos de grandes proporções (COSTA et al., 1995; COSTA et al.; 1998; RANJAN et al., 2006).

A forma endêmica da mastite bovina por *P. zopfii* costuma ocorrer em regiões de clima tropical que propicia condições de umidade e temperatura para o crescimento deste agente patogênico no meio ambiente. Entretanto, em zonas de clima temperado esta forma pode ocorrer em áreas geográficas com umidade relativamente alta. Este fato foi observado por JANOSI et al. (2001) na Hungria. Os autores observaram pelo período de dois anos 223 vacas com mastite por *P. zopfii* em trinta e dois rebanhos leiteiros com surtos e casos esporádicos da enfermidade. Todos os rebanhos com surtos apresentavam condições higiênicas ruins e falhas no manejo, porém não pode ser identificado nenhum fator predisponente específico.

2.6. Métodos de diagnóstico

O diagnóstico da mastite clínica é realizado pelo exame clínico da glândula mamária através de inspeção e palpação, observando inflamação do úbere, coloração e diferenças de tamanho entre os quartos mamários, complementado pelo exame do leite no qual detecta anormalidades como presença de grumos, coágulos, pus e sangue. O exame do leite faz-se através da prova da caneca de fundo escuro/caneca telada, utilizando-se os primeiros jatos de leite da ordenha. Para o diagnóstico da mastite subclínica é necessário a utilização de exames complementares baseados no conteúdo celular do leite tais como CCS, CMT e perfil microbiológico (RADOSTITIS et al., 2007; CORREA et al., 2006; DIAS, 2007; ROSA et al., 2009).

Contagens bacterianas totais (CBT) e de células somáticas (CCS) são métodos de referência e comumente são utilizados na avaliação da qualidade do leite cru. A contagem individual de células somáticas (CCSI) é um recurso laboratorial comumente empregado para o diagnóstico da mastite subclínica, enquanto a contagem de células somáticas do leite do tanque (CCSLT) é um parâmetro utilizado para estimar o índice de mastite subclínica presente no rebanho e as perdas de produção (SILVEIRA-FILHO, 2007; COSTA, 2008).

De acordo com CASSOLI & MACHADO (2007), CCSIs entre 100.000 e 200.000 cél/mL são consideradas normais, enquanto que escores superiores a 200.000 cél/mL constituem um forte indício da mastite subclínica. A CBT é um índice que está diretamente associado à higiene da ordenha e ao resfriamento do leite. Quanto mais higiênica for a ordenha e a limpeza dos utensílios e quanto mais rápido for o resfriamento do leite, menor será a contaminação e a taxa de multiplicação das bactérias no leite. A sujeira encontrada nos tetos e úbere é considerada a principal fonte de bactérias do ambiente para a glândula mamária, podendo causar mastite e, para o leite, podendo causar aumento da CBT (GALTON et al., 1982).

2.6.1. Contagem de células somáticas (CCS)

O leite apresenta algumas células epiteliais (muito poucas) e algumas células de defesa (macrófagos, linfócitos e neutrófilos), indicadas pela Contagem de Células Somáticas (CCS). Existe ainda bastante divergência entre autores sobre o que seria normal no leite da vaca. Em um estudo

realizado no Brasil por COLDEBELLA et al. (2004), observou-se que contagens de células somáticas superiores a 170.000 células/mL levariam a perdas na produção de leite, principalmente em vacas multíparas.

A CCS é um fenômeno dinâmico, estando sujeito a variações significativas. O estágio de lactação, a idade da vaca, a estação do ano, o tamanho do rebanho, o nível de produção de leite e a presença de outras doenças são fatores que podem afetar a concentração de células somáticas no leite. Porém, o fator que exerce maior influência sobre o nível de CCS do leite é a infecção intramamária (PHILPOT & NICKERSON, 2002).

Na CCS são encontradas todas as células presente no leite, que incluem as células originárias da corrente sanguínea, tais como leucócitos, e células de descamação do epitélio glandular secretor. Os leucócitos, em sua maioria, são mobilizados da corrente sanguínea para o tecido mamário diante de alterações na permeabilidade capilar (PHILPOT & NICKERSON, 2002). Os leucócitos fagocitam e digerem os microrganismos invasores. Do total de células somáticas, 75 a 98% correspondem a células de defesa e 2 a 25%, de células epiteliais, provenientes da descamação natural que ocorre no tecido de revestimento e secretor interno da glândula mamária (VOLTOLINI, 2001; RIBAS, 2003). O aporte destas células se intensifica na quarta semana pré-parto, diminuindo gradativamente até uma semana pós-parto. Na secreção láctea de vacas com infecção intramamária, ocorre elevação no número de células de defesa passando a predominar neutrófilos, seguidos por macrófagos e linfócitos (NICKERSON, 2008).

Dada a sua importância como indicador de qualidade do leite, a CCS pode representar acréscimo (< 200.000 células/mL) ou desconto (> 750.000 células/mL) de até R\$ 0,03 por litro de leite (SANTOS et al., 2009).

A contagem de células somáticas elevada está associada a perdas na produção de leite. Quando o leite de todas as vacas de um rebanho é colocado no tanque de expansão, a contagem de células somáticas em uma amostra composta é um bom indicador da prevalência de mastite do rebanho. Conforme WATTIAUX (2010) contagens de células somáticas menores que 400.000 cels/mL são típicas de rebanhos que têm boas práticas de manejo, mas sem ênfase particular no controle de mastite. Rebanhos com contagens de célula somática maiores que 500.000 cels/mL indicam que um terço das glândulas

mamárias estão infectadas e a perda de leite devida, à mastite subclínica é de pelo menos 10%.

A CCS pode ser determinada utilizando-se o contador eletrônico de células somáticas em que as amostras de leite têm os núcleos das células coradas e expostas a um raio laser, refletindo luz vermelha (fluorescência) e os sinais são transformados em impulsos elétricos detectados por um fotomultiplicador e transformados em número de células/mL (BRASIL, 2003).

O número de leucócitos, indiretamente, pode ser determinado pelo CMT, colhe-se de cada quarto mamário uma amostra de 2,0 mL de leite, à qual é adicionado na mesma proporção, um detergente aniônico (alquillauril sulfato de sódio) adicionado de púrpura de bromocresol, capaz de emulsificar os lipídios das membranas dos leucócitos presentes no leite, com conseqüente liberação de material nucléico, avaliando-se o grau de gelatinização ou viscosidade da mistura, sendo o teste realizado em bandeja apropriada. Os resultados são expressos como: Negativo, Traços, um, dois e três sinais positivos (ESSLEMONT & KOSSAIBATI, 2002) (FIGURA 2). A reação do CMT é proveniente da ação do reagente sobre as células somáticas presentes no leite, que se torna gelatinoso devido à liberação do ácido desoxiribonucléico (DNA), presente no núcleo dessas células.



FIGURA 2. Califórnia Mastite Teste (CMT)

Fonte: <http://www.infovets.com/demo/demo/dairy/D100.HTM>

Além desses métodos, FONSECA & SANTOS (2000) recomendaram utilizar métodos microbiológicos para a identificação dos agentes etiológicos envolvidos, para a implantação de procedimentos terapêuticos e estratégias de controle e profilaxia adequados. O exame microbiológico de amostras de leite coletadas assepticamente é considerado o método padrão para determinação da saúde do úbere e para o diagnóstico definitivo da mastite bovina, de modo

que medidas de controle possam ser implementadas com maior eficiência (BRITO et al., 1998).

O grau de infecção da glândula mamária é o fator mais importante que influencia na CCS (LANGONI et al., 2000; RODRIGUEZ-ZAS et al., 2000). Conforme citaram FUENTE et al. (1997) e VASCONCELOS (1997), a ordenha vespertina apresenta maior CCS em relação à ordenha da manhã, pois, logo após a ordenha, a CCS é máxima, permanecendo elevada por quatro horas, e reduzindo gradativamente até atingir a contagem mínima, imediatamente antes da próxima ordenha (HARMON, 1998).

2.6.2. Técnica de PCR em tempo real

Nos últimos anos, diversos trabalhos reportaram o uso da amplificação *in vitro* do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR; *polymerase chain reaction*), para a detecção de patógenos em alimentos (KNOW et al., 2004; GANDRA, 2006).

O método PCR multiplex (PCRM), se destaca, pois é uma variação da PCR, a qual utiliza dois ou mais pares de *primers* na mesma reação, permitindo a detecção de mais de um gene simultaneamente.

A técnica de PCR em tempo real identifica microrganismos e quantifica ácidos nucleicos. A reação é automatizada, a qual pode ser visualizada em alta resolução. Tem como vantagem a quantificação dos produtos amplificados que podem ser feitas de forma automática analisando a curva de amplificação do fragmento (GILLESPIE & OLIVER, 2005; LUND-OLESEN et al., 2008).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real é capaz de monitorar o progresso da PCR enquanto ela progride (ou seja, em tempo real). Os dados são coletados ao longo da PCR, ao invés de serem apenas no final da reação. Isso revoluciona completamente o modo de abordagem da quantificação de DNA e RNA pela PCR. A PCR em tempo real utiliza o momento do ciclo da reação no qual a amplificação de um alvo é detectada pela primeira vez, ao invés da quantidade de alvo acumulado após um número fixo de ciclos. Quanto mais alto o número de cópias iniciais do ácido nucleico alvo, mais rápido será observado o aumento significativo na fluorescência (NOVAIS & PIRES ALVES, 2004; DUARTE, 2006).

A PCR em Tempo Real utiliza o sistema TaqMan[®] baseada na detecção de um sinal fluorescente emitido por uma molécula anexada à sequência de ácidos nucleicos (sonda). A sonda fluorescente para permitir a detecção de um produto específico da PCR conforme este se acumula durante os ciclos da PCR. Uma sonda (oligonucleotídeo) é construída contendo um corante *reporter* fluorescente na extremidade 5' e um corante *quencher* (silenciador) na extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do *quencher* reduz bastante a fluorescência emitida pelo corante *reporter* através da transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET) através do espaço. Se a sequência alvo estiver presente, a sonda se anexa logo após um dos *primers* e é clivada através da atividade da nuclease 5' da Taq DNA polimerase enquanto o *primer* é estendido. Esta clivagem da sonda: separa o corante *reporter* do corante *quencher*, aumentando o sinal do corante *reporter*; remove a sonda da fita alvo, permitindo que a extensão do *primer* continue até o final da fita molde. Assim, a inclusão da sonda não inibe o processo geral da PCR. Moléculas adicionais do corante *reporter* são clivadas de suas respectivas sondas em cada ciclo, resultando em um aumento na intensidade de fluorescência, que é proporcional à quantidade de *amplicon* produzido. (NEWBY et al., 2003; MACKAY, 2004).

O ponto que detecta o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Threshold* (C_T). Ele permite a quantificação exata e reprodutível da amplificação, sendo proporcional ao número de cópias do alvo presente na amostra (NOVAIS & PIRES ALVES, 2004).

TAPONEN et al. (2009) realizaram um estudo com 67 vacas, obtiveram 79 amostras, destas 34 foram positivas para um ou dois tipos de bactérias diagnosticadas através da técnica PCR em tempo real. Entre os microrganismos mais detectados foram o *Streptococcus uberis* presente em 10 amostras, *Staphylococcus* spp. em 9 amostras, *Corynebacterium bovis* em 5 amostras, *Staphylococcus aureus* em 3 amostras. Os autores observaram que a técnica PCR em tempo real pode fornecer um diagnóstico bacteriológico para quase metade dos casos onde os resultados de cultivo convencional foram negativos.

2.7. Fatores que propiciam a redução na produção de leite

A redução da produção leiteira, no caso da mastite subclínica, depende de fatores ligados como o agente etiológico, resposta imunológica do animal, evolução e duração da infecção e da propagação da mastite no rebanho (LANGENEGGER et al., 1981).

Em estudos realizado por NICOLAU et al. (1992) em cinco rebanhos produtores de leite B, no estado de São Paulo, verificaram uma redução de 31% na produção dos quartos infectados por *Staphylococcus* coagulase positiva, enquanto por *Staphylococcus* coagulase negativa esta foi de 11%. LANGENEGGER et al. (1981) comprovaram que as infecções por *Streptococcus* spp. reduziram, em média, 42,9% da produção, ao passo que por *S. aureus* e *S. epidermidis* foi de 27,4%. Dentre os *Streptococcus*, as infecções por *S. agalactiae* causaram redução na produção de 57,7% seguido por *S. dysgalactiae* 32,9% e *S. uberis* 22,6%.

MILLER (1993) citaram a importância da utilização da CCS para quantificar as perdas de produção entre vacas, ou mesmo, entre os quartos mamários e relatam, além deste tipo de comparação, a redução estimada a partir da CCS. HORTET et al. (1999) citaram que para um dado nível de CCS, a redução na produção aumentou com o número de parições, ou com o estágio da lactação. Isto ocorre em consequência do agravamento na saúde do úbere em vacas multíparas e/ou no final da lactação, pela maior possibilidade de infecção e danos permanentes a glândula (BARTLETT et al., 1990).

Um estudo realizado por JONES (1984) observou a relação entre CCS e a produção de leite durante a primeira e as demais lactações e verificou correlação negativa, ou seja, à medida que o número de células somáticas aumentava, diminuía a produção de leite, tanto diariamente como no período de 305 dias.

A perda de produção de leite devido à mastite clínica é variável e depende de vários fatores. Segundo BARTLETT et al. (1990), a redução na produção de leite pode ser dividida em duas fases: a primeira, fase aguda, ocorre rápido declínio de produção logo após o aparecimento dos sintomas, seguido de rápida recuperação e dura em torno de seis dias. A queda é de aproximadamente 30%, durante este período. A segunda fase dura

aproximadamente 60 dias, na qual a produção ainda é abaixo do normal, podendo persistir até o final da lactação.

BARTLETT et al. (1990) citam que o efeito da mastite clínica na produção de leite é mais acentuado em vacas multíparas com perdas duas vezes maiores que as primíparas.

2.8. Fatores de risco para ocorrência de mastite bovina

A ocorrência de mastite ambiental, segundo o fator estágio de lactação, é maior no início da lactação, imediatamente ao período pós-parto. Porém, a ocorrência de mastite subclínica, contagiosa, é maior na medida em que a lactação progride (PRESTES et al., 2002).

Segundo SANTOS & FONSECA (2007) no período seco a glândula mamária passa por uma involução ativa, nas duas semanas seguintes à secagem da vaca. Nessa fase a glândula continua a secretar leite nos dois a três dias depois de suspensa a ordenha, ocorrendo acúmulo de leite que pressiona a glândula, promovendo dilatação do canal do teto e, permitindo a penetração de microrganismos no interior do úbere (ANDERSON & CÔTÉ, 1996).

Outro fator relevante é a idade das fêmeas, animais mais velhos, de sete a nove anos, são mais suscetíveis as infecções intramamárias, devido a lesões internas e desgaste sofrido pelo esfíncter do teto e pela glândula em si (SANTOS & FONSECA 2007).

PEELER et al. (2000) citaram que o aumento do número de partos é um fator de risco para ocorrência de mastite clínica e subclínica, devido ao maior tempo de exposição aos agentes patogênicos durante a vida produtiva.

O método de ordenha, mecânica ou manual, influencia na saúde da glândula mamária. Devido a transmissão de patógenos entre vacas durante a ordenha, flutuação no sistema de vácuo da ordenhadeira (FERREIRA et al, 2006).

As instalações têm influência sobre o surgimento de novos casos de mastite. FERREIRA et al. (2006) e ZAFALON et al. (2008) verificaram uma frequência superior de isolamento de *S. aureus* em períodos com elevados

índices pluviométricos, provavelmente devido às condições de umidade e temperatura favoráveis à sua sobrevivência e proliferação do patógeno.

2.9. Perfil de sensibilidade e resistência microbiana

A resistência de microrganismos aos antimicrobianos é um sério e emergente problema de saúde pública, como por exemplo, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* entre outros (McEWENS & FEDORKA-CRAY 2002). De acordo com COSTA (1998) não é somente o uso indiscriminado de antimicrobianos que causa essa resistência, mas também em decorrência da transmissão de microrganismos resistentes de origem animal para indivíduos da espécie humana por alimentos ou mesmo pelo contato direto com animais, uma vez que muitos dos antimicrobianos licenciados para uso em medicina humana são também registrados para uso veterinário.

Um estudo realizado por GARINO (2004) verificou ao analisar 154 amostras de *E. coli*, que *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* enteropatogênica (EPEC) isoladas de casos de mastite clínica e subclínica apresentaram múltipla resistência, sendo que 88,2% de EIEC e 87,5% de EPEC foram resistentes a mais de 5 antimicrobianos.

A antibioticoterapia para mastite deve visar a eficácia terapêutica e benefícios econômicos, tanto do ponto de vista do aumento da produção como na redução de fontes de infecção (ANDRADE et al., 2000). Estes mesmos autores em 2009 estudaram o comportamento de diferentes agentes isolados da mastite bovina, e demonstraram uma situação de alerta pelo uso indiscriminado de antibióticos no tratamento desta enfermidade e confirmaram a possibilidade de resistência bacteriana a diferentes antimicrobianos comumente encontrados no comércio.

Em decorrência da diversidade de agentes etiológicos envolvidos em mastites, a utilização de exames microbiológicos e posteriormente testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* são medidas indicadas antes da eleição do tratamento, pois esta diversidade microbiológica pode ter diferentes respostas frente ao medicamento a ser utilizado (SILVA, 2008).

Segundo citou FERNANDES (2006) para diminuir o processo de resistência microbiana aos medicamentos utilizados, torna-se necessária a

realização de isolamento bacteriano e respectivo antibiograma que é um teste que oferece como resultado padrões de resistência ou suscetibilidade, de uma bactéria específica a antimicrobianos. Estas ferramentas são úteis para confirmar o diagnóstico clínico e, com a obtenção dos resultados laboratoriais há possibilidade de sugerir possíveis tratamentos e melhorias de manejo, reduzir sensivelmente as recidivas.

NADER FILHO et al. (1984) submeteram ao antibiograma 37 amostras de *S. aureus* isoladas de infecção intramamária de bovinos em Ribeirão Preto/SP. Verificaram que gentamicina, amicacina, eritromicina e cefotaxima foram as drogas mais eficientes e que os maiores índices de resistência ocorreram para oxacilina, penicilina, ácido nalidíxico e ampicilina.

DONATELE et al. (2002) avaliaram o perfil de resistência a antimicrobianos de 180 amostras de *S. aureus* isoladas de mastite subclínica em rebanhos do estado do Rio de Janeiro, verificando elevados índices de resistência para os antibióticos β -lactâmicos (82,9%) e tetraciclinas (24,4%). Os maiores índices de sensibilidade foram obtidos para sulfazotrim e gentamicina. Porém estudos realizados por SILVEIRA-FILHO et al. (2005) verificaram índices de resistência superiores a 50% para gentamicina, lincomicina, tetraciclina e oxacilina em rebanhos leiteiros do estado de Pernambuco.

RAPINI et al. (2004), ao avaliarem o perfil de sensibilidade antimicrobiana de 45 cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de dez amostras de queijo tipo coalho comercializado nas praias nordestinas, encontraram elevado percentual de resistência: 100% para penicilina; 91% para tetraciclina; 75,5% para vancomicina; 71,1% para gentamicina; 66,7% para oxacilina; 60% para eritromicina; 48,9% para cefalotina e 26,7% para sulfazotrin. Os autores destacaram a necessidade de medidas de controle no uso indiscriminado de antimicrobianos.

BRITO et al. (2001) ressaltaram que diversos estudos sobre a sensibilidade antimicrobiana realizados no Brasil com patógenos envolvidos na mastite bovina demonstram um aumento crescente no padrão de resistência, principalmente para *S. aureus*.

COSTA (2010) analisou a sensibilidade frente aos antibióticos e quimioterápicos de 116 cepas de *Staphylococcus aureus*, observou um elevado

percentual de amostras de *S. aureus* sensíveis à norfloxacin (92,1%), à enrofloxacin (89,6%), ao ceftiofur (88,5%) e ao cefquinome (82,9%).

MOREIRA et al. (1997) observaram em 35 propriedades rurais da bacia leiteira de Goiânia vacas com mastite clínica e determinaram que as cepas de *S. coagulase* positiva apresentavam a maior frequência de sensibilidade frente à enrofloxacin (96%) e ao ceftiofur (94%).

RIBEIRO et al. (2009) avaliaram o perfil de resistência antimicrobiana de bactérias isoladas de 148 vacas no período médio de lactação, das quais 2 com mastite clínica, 72 com mastite subclínica e 74 sem mastite (controles), provenientes de quatro pequenas propriedades do interior do Estado de São Paulo certificadas como orgânicas, verificou que as maiores taxas de resistência das linhagens encontradas foram constatadas para penicilina (53,5%), ampicilina (41,6%) e neomicina (38,6%).

COSTA (2010) verificou-se o perfil de sensibilidade antimicrobiana para o *Staphylococcus coagulase* negativo e observou que trimetoprim + sulfametoxazol, amoxicilina e sulfonamida tiveram sensibilidade menor que 80%. CUNHA et al. (2006) observaram que a maior eficácia foi em relação à gentamicina (97,98%) e enrofloxacin (90,90%).

S. agalactiae é bastante sensível à penicilina, ampicilina, eritromicina, cloranfenicol, cefalosporina e tetraciclina. Há registro de resistência às tetraciclina, penicilina e aos antimicrobianos beta lactâmicos em fazendas leiteiras expostas a intensa pressão de seleção antimicrobiana ou no tratamento de vacas no período seco. Nos casos de mastites por *Streptococcus spp* é recomendado realizar o teste de sensibilidade mesmo sendo bem sensíveis às penicilinas (MULLER, 2002).

2.10. Medidas gerais de controle e prevenção da mastite bovina

Para o controle da mastite faz-se necessária a identificação dos fatores predisponentes para a ocorrência de infecções da glândula mamária. A implantação de intervenções estratégicas impede tanto a sua instalação quanto a sua disseminação entre os animais (VEIGA, 1993). Primeiramente é preciso ressaltar que em qualquer programa de controle, atenção especial deve ser dada ao treinamento e capacitação da mão-de-obra, pois de nada valerá um

plano de controle se ocorrem falhas na sua atuação (MULLER, 1999; SANTOS & FONSECA, 2007).

Vários programas foram propostos para diminuir a ocorrência de mastite bovina. Entre as principais medidas estão o monitoramento dos índices de mastite, pré e pós imersão dos tetos em solução anti-séptica, conforto ambiental, terapia de vacas secas, tratamento dos casos clínicos, descarte de vacas com infecções crônicas, higiene, manejo e manutenção dos equipamentos de ordenha (NICKERSON, 2008; MÜLLER, 1999; PHILPOT & NICKERSON, 2002; SANTOS & FONSECA, 2007).

O progresso no controle da mastite nos rebanhos brasileiros tem sido lento porque, na maioria das propriedades, o programa de controle se fundamenta quase que exclusivamente no tratamento de animais clinicamente acometidos. Como resultado, os produtores têm tido pouco êxito no controle da doença, com a agravante do uso indiscriminado de antimicrobianos (BRITO & BRITO, 1996).

Os métodos para controlar esta doença requerem um programa integrado de prevenção e de eliminação da infecção e neste caso, pode ser citado como estratégia o monitoramento do rebanho. São fundamentais que sejam registrados os índices zootécnicos de produção e os casos de mastite, o que possibilita mensurar os prejuízos causados pela doença e avaliar a eficiência das medidas de controle implantadas. O registro individual deve ser o mais detalhado possível, contendo: nome do animal; data de nascimento; data do último parto; ordem de lactação; descrição do caso de mastite (aguda, subaguda, crônica ou subclínica) e quarto acometido; histórico de mastite anterior e a descrição do tratamento empregado, data de liberação do caso clínico, identificação dos agentes isolados e o resultado do antibiograma (LOPES & VIANA, 1996).

A mastite clínica deve ser detectada precocemente pela realização do teste da caneca telada, para os casos subagudos, e pela observação de sinais inflamatórios na glândula mamária no caso de mastites agudas. Em casos de surtos ou de má resposta aos tratamentos, realiza-se a coleta de amostras de leite, para proceder ao isolamento e identificação dos agentes envolvidos, com posterior realização do antibiograma (LOPES & VIANA, 1996; VEIGA, 1998).

O tratamento dos animais com mastite clínica durante a lactação tem por objetivos eliminar a infecção e reintegrar o animal o mais breve possível à produção. O sucesso do tratamento dependerá fundamentalmente do quadro clínico, da escolha adequada das drogas, da posologia adequada, da boa distribuição do mesmo dentro da glândula mamária, do estado fisiológico do animal e do microrganismo envolvido (OWENS & NICKERSON, 1989; HILLERTON, 1996; GRUET et al., 2001; ERKSINE et al., 2003).

Para o tratamento de casos clínicos de animais em lactação consiste em se fazer a aplicação por via intramamária de antibióticos por um período de cerca de três dias, em intervalos de 12-24 horas. Casos clínicos mais graves, com reação inflamatória muito intensa, devem ser tratados por via sistêmica e local, inclusive com a utilização de anti-inflamatórios associados ao antibiótico (BRITO & BRITO, 1999).

Geralmente não se recomenda o tratamento de infecções subclínicas nas demais situações devido ao ônus decorrente do descarte de leite e de aquisição dos antibióticos (ERKSINE et al., 2003). A escolha do produto para o tratamento de vacas lactantes ou vacas secas deve ser fundamentada no perfil de sensibilidade do microrganismo aos antibióticos, uma vez que microrganismos de uma mesma espécie, mesmo dentro de um mesmo rebanho, podem ter perfis de sensibilidades diferentes (MCKELLAR, 1991).

Outra medida que deve ser utilizada é o tratamento de vacas secas e tem por objetivo eliminar as infecções remanescentes da lactação anterior e prevenir novas infecções durante o período seco e início da próxima lactação (ERKSINE et al., 2003; SANTOS & FONSECA, 2007).

Segundo OWENS e NICKERSON (1989), cerca de 40% das infecções se dão nas primeiras duas semanas após a secagem, e na ausência do tratamento de vacas secas, 10-15% dos quartos irão se tornar infectados nesse período.

Segundo ZECCONI et al. (1995), o período seco é o momento ideal para realizar o tratamento da mastite, o tratamento nessa ocasião não requer o descarte de leite devido à presença de antibióticos. O tratamento de vacas secas tem possibilitado significativa redução do nível de novas infecções pelos patógenos contagiosos, especialmente por *S. agalactiae* e *S. aureus*,

promovendo um índice de cura bacteriológica para infecções por estas bactérias.

A limpeza e anti-sepsia de tetos previamente à ordenha constituem medidas essenciais para evitar a entrada de patógenos no interior da glândula mamária, bem como para preservar as características microbiológicas e físico-químicas do leite ordenhado. Quando os tetos ou úberes apresentam-se muito sujos, deve-se atentar para o manejo adequado de currais, camas, estábulos, piquetes e sombrites onde as vacas se deitam (HILLERTON, 1996).

O principal objetivo da anti-sepsia pós-ordenha é eliminar os patógenos que contaminam o teto no momento da ordenha e entre as ordenhas, prevenindo a infecção do canal do teto e conseqüentemente do tecido secretor. O uso de um anti-séptico diminui a possibilidade de ocorrer infecções intramamária em ambas as situações (COSTA, et al., 1998).

Os desinfetantes disponíveis comercialmente empregam uma variedade de ingredientes ativos, sendo os mais comuns o iodo, a clorexidina, os aldeídos, os compostos de cloro e de amônia quaternária (LANGONI, 2007).

A higiene da ordenha é fundamental para um bom programa de controle da mastite e melhoria da qualidade do leite, o ponto chave é o ordenhador, pois dele depende a execução de todas as medidas que irão levar ao controle da doença (CERQUEIRA & SENA, 1998). É importante que realize treinamentos, visando orientá-los quanto às regras básicas de funcionamento, lavagem e desinfecção de equipamentos, preparo dos animais para a ordenha e tratamentos de casos clínicos de mastite (LOPES & VIANA, 1996).

Além dos aspectos que envolvem o ordenhador, a higiene de ordenha compreende também a higiene dos animais, de instalações e de equipamentos utilizados na ordenha. A água é o componente mais importante nestas atividades, mas pode se constituir em fonte adicional de contaminação do leite e dos animais, caso não esteja dentro dos padrões microbiológicos e físico-químicos (RIBEIRO & CARVALHO, 2001).

É de suma importância que se tenham instalações e ambientes onde os animais permanecem limpos e higienizados, a fim de diminuir a possibilidade de contaminação da glândula mamária. Piquetes destinados às vacas secas, bem como aqueles onde são mantidas as vacas lactantes no intervalo entre ordenhas, não devem conter excesso de lama e ou de material orgânico

(LANGONI, 2007). O material de camas é considerado uma fonte importante de microrganismos envolvidos nas infecções, sobretudo no que se refere aos agentes ambientais, principalmente quando estas são compostas de material orgânico e não têm o manejo adequado (NICKERSON, 2008). Deve evitar que os animais se deitem no período imediatamente após a ordenha. Nessa ocasião, o esfíncter não está totalmente fechado, favorecendo a penetração de patógenos na glândula mamária. Para tal, eles devem receber algum alimento logo após a ordenha, devendo permanecer de pé pelo menos durante as duas primeiras horas pós ordenha (LOPES & VIANA, 1996; LANGONI, 2007).

A utilização da linha de ordenha é outro método para evitar contaminações cruzadas no rebanho, tem demonstrado que em rebanhos infectados por patógenos contagiosos tais como *S. aureus*, após a ordenha de um animal infectado, a unidade de ordenha se constitui em veículo para a infecção de cerca de seis outros animais que vierem a ser ordenhados a seguir (MYLLYS et al., 1994). Este fato mostra a necessidade de se implantar uma linha de ordenha, visando diminuir o número de novas infecções ocasionadas por patógenos contagiosos.

O descarte de animais cronicamente infectados deve fazer parte do programa de controle da mastite em qualquer rebanho. A adoção desta medida conduz rapidamente a uma redução na taxa de mastite clínica, permitindo também reduzir a contagem de células somáticas do leite de tanque (CCSLT) do rebanho, já que vacas cronicamente infectadas contribuem com 10-12% da CCSLT (HILLERTON, 1996).

O equipamento de ordenha mecânica favorece as infecções intramamárias segundo LANGLOIS et al. (1981); COSTA (1998) vacas ordenhadas mecanicamente tendem a apresentar índices mais elevados de mastite subclínica em relação a vacas ordenhadas manualmente em decorrências de falhas na higienização e manutenção dos equipamentos de ordenha. As falhas mais importantes em relação ao funcionamento do equipamento de ordenha são a baixa reserva de vácuo, flutuações de vácuo, pressão de vácuo elevada e o funcionamento irregular dos pulsadores que afetam a integridade do esfíncter e da camada de queratina, propiciando o aumento da ocorrência de novas infecções. A revisão periódica do equipamento de ordenha permite detectar e sanar oportunamente falhas que

possam prejudicar seu funcionamento, eliminando assim uma das principais causas de mastite e de alterações na qualidade do leite.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a prevalência das principais bactérias causadoras da mastite bovina, verificar o perfil de sensibilidade a diversos antimicrobianos da mastite bovina clínica e condições de higiene e manejo das propriedades leiteiras localizadas no estado de Goiás.

3.2 Específicos

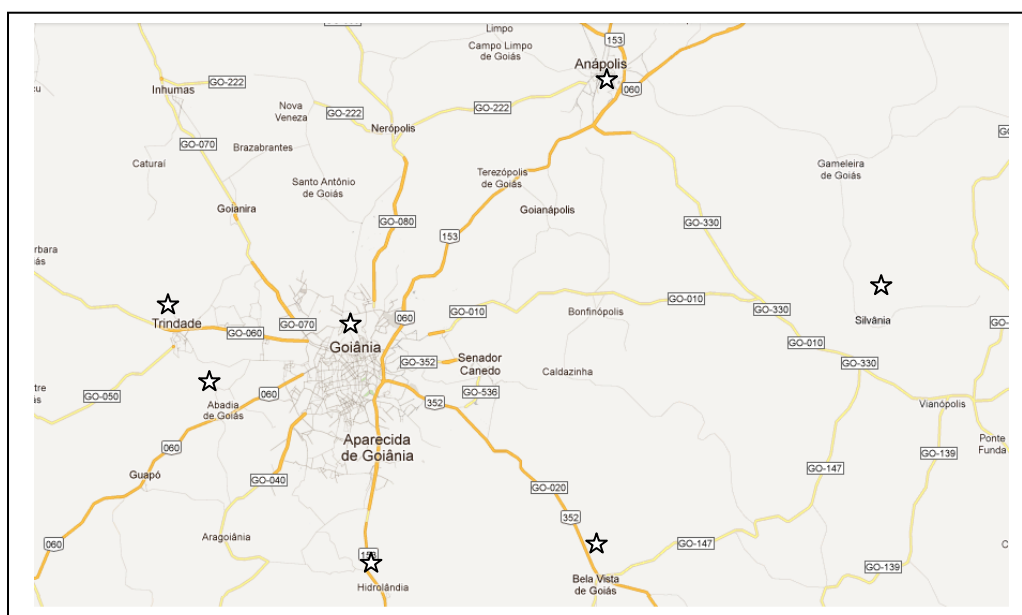
- Realizar análise de cultura e antibiograma dos patógenos identificados através de sistema automatizado Vitek, para vacas com mastite clínica.
- Detectar, identificar e quantificar *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp., *Corynebacterium bovis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Klebsiella* sp., *Serratia marcescens* e o gen para expressão de resistência da β -lactamase (blaZ) em 10% das vacas, de cada propriedade, que apresentaram mastite subclínica, através da análise de PCR em tempo real.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Propriedades rurais

Foram colhidas informações de oito propriedades leiteiras do estado de Goiás: Abadia de Goiás (A), Anápolis (B), Bela Vista (C), Goiás (D), Goiânia (E), Hidrolândia (F), Silvânia (G) e Turvânia (H), (FIGURA 3 e 4). Todas as propriedades contavam com sistema de ordenha mecânica para extração do leite, foi utilizando um questionário (ANEXO 1), aplicado no dia da visita a fazenda. Selecionou-se as propriedades que enviaram frequentemente as amostras para o laboratório do CPA-UFG, considerando-se ainda a disponibilidade e o interesse do proprietário em participar do estudo, e também a distância entre as propriedades e os laboratórios.

Avaliaram-se as condições gerais de manejo dos animais e higiene de ordenha, considerando os seguintes itens: produção leiteira (média diária), número de vacas em lactação, tipos de equipamentos de ordenha e de armazenamento do leite, manejo de ordenha, medidas de diagnóstico e prevenção de mastite, prevalência de mastite clínica e/ou subclínica, higiene e limpeza dos equipamentos, protocolo de tratamentos antimicrobianos rotineiramente utilizados nos animais com mastite.



☆ = marcador

FIGURA 3. Municípios do Estado de Goiás onde foram realizadas as colheitas de amostras de leite bovino (identificados pelo marcador). Goiânia-GO, 2012.



☆ = marcador

FIGURA 4. Municípios do Estado de Goiás onde foram realizadas as colheitas de amostras de leite bovino (identificados pelo marcador). Goiânia-GO, 2012.

4.2. Amostras de leite

No período de junho de 2010 a junho de 2011 foram analisadas 6186 amostras de leite cru (96 amostras – cultura e antibiograma, 5758 amostras – CCS e 332 amostras – PCR em tempo real)

Mensalmente foram realizadas colheitas das amostras de leite de vacas, individualmente que apresentaram mastite clínica, foram procedida sem conservante e submetidas a técnica microbiológica - cultura e antibiograma por meio de equipamento automatizado Vitek (bioMérieux), no Laboratório de Microbiologia – LMB e para as amostras de leite cru de vacas individuais, após realizado o teste da caneca telada e constatação de ausência de mastite clínica, foram destinadas à análise de CCS e conservadas em Bronopol[®], no Laboratório de Qualidade do Leite - LQL, e 10% das amostras de leite de vacas individuais, que apresentaram contagem celular somática acima de 200.000 CS/mL foram submetidas à técnica de PCR em tempo real utilizando o *kit PathoproofTM Mastitis PCR Assay* (FINNZYMES DIAGNOSTICS[®]), que tem a capacidade de detectar, identificar e quantificar 11 microrganismos e 1 gene de resistência a β -lactamase, no Laboratório de Biologia Molecular – LBM, todos

no Centro de Pesquisa em Alimentos (CPA) da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ/UFG).

4.2.1. Análises microbiológicas e CCS

Imediatamente antes da ordenha, após os animais serem submetidos ao teste da caneca telada, os tetos que se observaram grumos no leite foram higienizados com solução de pré-*dipping* usada na propriedade. Após a secagem de cada quarto com papel-toalha, procedeu-se a desinfecção do orifício do teto afetado com algodão embebido em álcool 70°GL, a seguir foi realizada a colheita asséptica da amostra de leite, 2,5 mL do teto que foi de cada vaca em frascos esterilizados para a análise microbiológica (FIGURA 5). Para a realização da contagem de células somáticas (CCS) foram coletadas 40 mL de leite de todos os tetos de cada vaca (pool), em frascos contendo o conservante Bronopol®. Esse conservante é estável em meio ácido e possui largo espectro bactericida sendo efetivo contra bastonetes Gram-positivos, Gram-negativos e fungos (CHEMICAL, 2011).

Após as colheitas, os frascos foram tampados, identificados e acondicionados em caixas isotérmicas contendo bolsas de gelo reciclável.

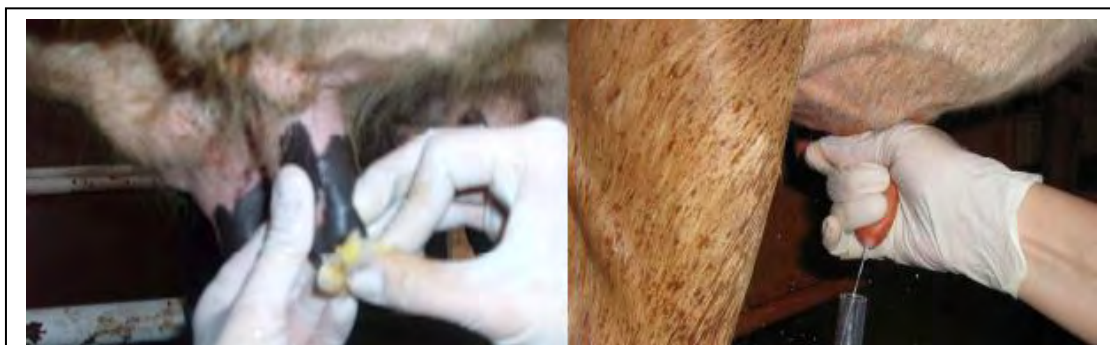


FIGURA 5. Antissepsia do esfíncter do teto com algodão embebido em álcool iodado e colheita de amostra de leite para cultivo microbiológico. Bela Vista-GO, 2011.

4.2.2. Procedimentos laboratoriais

a) Análise da contagem de células somáticas (CCS)

No laboratório LQL o equipamento Combifoss é constituído pelo Fossomatic 500 Basic (Foss Electric A/S. Hillerod, Denmark) que quantifica a contagem de células somáticas (CCS), com capacidade de análise de 300 amostras/hora e cujo princípio analítico baseia-se na citometria de fluxo (FIGURA 6).



FIGURA 6 – Equipamento Combifoss do LQL da UFG. Goiânia, 2011.

b) Isolamento e identificação do agente infeccioso

No Laboratório de Microbiologia - LMB, com o auxílio de alça de níquel-cromo calibrada, uma alíquota de leite foi estriada em placa de ágar sangue de carneiro e incubada a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas, visando o isolamento de colônias. Isolados do ágar sangue foram avaliadas quanto às características morfológicas e submetidas à coloração de Gram. Unidades formadoras de colônia identificadas como Gram-positivos, foram submetidas a provas de catalase e coagulase, e Gram-negativos a prova de oxidase.

As unidades formadoras de colônias morfotintorialmente diferentes foram submetidas ao teste de identificação e sensibilidade a antimicrobianos automatizado – VITEK 2 compact® - Biomérieux.

4.2.3. Princípios analíticos

4.2.3.1. Detecção, identificação e quantificação de patógenos causadores de mastite subclínica através da técnica de PCR em Tempo Real

4.2.3.1.1 Protocolo para extração de DNA de amostras de leite cru

A extração de DNA das amostras de leite cru foi realizada em conformidade com o protocolo do *Pathoproof Mastitis PCR Assay*[®] (FINNZYMES DIAGNOSTICS[®]). Primeiramente homogeneizou as amostras de leite em seguida transferiu 350 µl da amostra de leite para *ependorf*. Preparou-se solução 1 contendo 7 µl proteinase K e 350 µl solução lise 1, para cada amostra foi adicionado 350 µl da solução 1 em cada amostra de leite (*ependorf*) homogeneizou e as amostras foram incubadas em banho-maria à 55°C por 5 minutos. Em seguida centrifugou-as durante 5 minutos a 6000 rpm, retirando todo o sobrenadante por pipetagem e ressuspendeu o sedimento (*pellet*) em 100 µl da solução lise 2 por pipetagem posteriormente incubou em banho-maria à 37°C por 10 minutos;

Preparou se a solução 2 contendo 20 µl proteinase K e 200 µl de tampão AL, para cada amostra, adicionou 220 µl da solução 2 em cada amostra (*ependorf*) em seguida homogeneizou e as amostras foram incubadas a 55°C por 10 minutos. Adicionou-se 200 µl de etanol (96-100%) para cada amostra, transferiu o sobrenadante do *ependorf* para a placa QIAamp 96, em seguida selou a placa QIAamp 96 com uma folha de fita AirPore e centrifugou à 3700 rpm por 8 minutos, em seguida foi adicionou 500 µl do Tampão AW1 a cada tubo e selou a placa QIAamp 96 sendo centrifugada a 3700 rpm por 8 minutos, posteriormente adicionou 500 µl do tampão AW2 a cada tubo a placa não foi selada e centrifugou à 3700 rpm por 30 minutos. Após esse tempo a placa QIAamp 96 foi colocada no suporte de eluição de tubos coletores e adicionou 100 µl do tampão AE a cada tubo a placa foi selada e centrifugou à 3700 rpm por 8 minutos. Transferiu as amostras de DNA extraído do suporte de eluição para os respectivos *ependorf's*; para armazenamento e posterior realização da técnica de PCR

4.2.3.1.2. Protocolo para PCR

Todos os reagentes utilizados na reação de PCR foram mantidos sob refrigeração com gelo em escamas. Para proteger os *pathoproof primer mixes* da ação da luz, foram utilizadas folhas de papel alumínio.

Inicialmente, o *pathoproof master mix* e os *pathoproof primer mixes* numerados de 1 a 4 foram homogeneizados brevemente para o preparo de 4 soluções individuais combinando o *pathoproof master mix* e as 4 *pathoproof primer mixes*. O volume total da solução 1, foi formado pelo número de amostras multiplicado por 11 μ L de *pathoproof master mix* adicionado de número de amostras multiplicado por 5,5 μ L do *pathoproof primer mix1*. Para as outras 4 soluções foi utilizado o mesmo volume, porém, contendo os *pathoproof primer mix 2, 3 e 4*, respectivamente. Em seguida, cada uma das 4 soluções foi homogeneizada brevemente.

Posteriormente, foram identificados os 96 poçinhos da placa para PCR em tempo real, e adicionados 15 μ L de cada uma das 4 soluções preparadas anteriormente aos 4 pontos respectivos de cada amostra. Foram adicionados 5 μ L do *template* (controle positivo) previamente diluído em cada um dos 4 poçinhos últimos da placa.

Finalmente, os 96 poçinhos da placa foram fechados com filme selante e a placa colocada no equipamento para PCR em tempo real.

4.3. Planejamento experimental e análise estatística

4.3.1. Plano amostral da pesquisa

No projeto foi realizado um levantamento analítico e descritivo simples, com amostragem probabilística estratificada e simples ao acaso. A distribuição amostral foi de acordo com o número de ocorrências e proporções. Os dados relativos obtidos foram especificados como uma razão relativa ao total, que equivale a uma porcentagem (100).

4.3.2 Análise estatística dos dados

As respostas qualitativas (presença ou ausência) e quantitativas foram analisadas em tabela de contingência, sendo a dispersão de frequência então

obtida. A análise de sensibilidade dos microrganismos foi verificada também através de tabela de frequência.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Dados das propriedades

Os resultados dos questionários aplicados nas oito propriedades leiteiras avaliadas estão apresentados na Tabela 3.

Na Figura 7 são apresentadas condições insatisfatórias de higiene e de manejo em algumas das propriedades envolvidas no estudo.



FIGURA 7. Propriedades leiteiras com manejo higiênico deficitário. A: sala de ordenha úmida e suja, teteira sujeita a contaminação. B: conjunto de ordenha sujo com fezes bovinas. C: desregulagem do vácuo da ordenhadeira. D, E e F: local para os animais pós ordenha. Goiânia, 2011.

TABELA 3. Principais características observadas entre as oito propriedades leiteiras avaliadas, localizadas no Estado de Goiás. Goiânia-GO, 2011.

Características	Ocorrência (Número de fazendas)	(%)
Higiene do ambiente satisfatória (pós ordenha)	3	37,5
Realiza teste da caneca telada	8	100,0
Realiza <i>predipping</i>	8	100,0
Realiza <i>posdipping</i>	8	100,0
Uso de água para limpeza dos tetos	3	37,5
Uso de papel toalha para secagem dos tetos	8	100,0
Realiza linha de ordenha	8	100,0
Manejo pós-ordenha adequado	5	62,5
Fornece alimento durante a ordenha	5	62,5
Realiza periodicamente da análise de CCS	4	50,0
Realiza teste periódico de CMT	1	12,5
Tratamento de mastite (com base em antibiograma)	3	37,5
Limpeza do equipamento adequado	5	62,5
Nível de vácuo correto	6	75,0
Realiza terapia da vaca seca	8	100,0
Descarte de animais com mastite crônica	3	37,5
Tipo de local/cama onde as vacas deitam está limpo e seco	2	25,0
Registra os dados dos animais	5	62,5

Verifica-se na Tabela 3, que em 37,5% (3) das propriedades, a higiene do ambiente foi considerada satisfatória, porém cinco encontravam com alta carga de matéria orgânica no local de permanência das vacas. Estes dados corroboram com o de FAGUNDES (2007), que avaliou 42 propriedades leiteiras, em duas regiões do Estado de São Paulo, e verificou que 33,3% e 19,1% delas apresentavam adequado manejo higiênico-sanitário de ordenha. A presença de lama e esterco foi observada na maioria das explorações leiteiras estudadas, provavelmente contribuindo para o aumento da mastite. BRITO & BRITO (2002) apontaram também este fator, onde constataram que o ambiente pode se tornar uma fonte de infecção de mastite durante o período entre as ordenhas, por isso torna-se necessário que o ambiente seja bem manejado.

Dentro dos parâmetros avaliados em relação ao teste da "caneca telada" é uma prática adotada por todas as fazendas acompanhadas. Segundo SANTOS & FONSECA (2007); MENDONÇA (2009) o exame que consiste na retirada dos primeiros jatos de leite deve ser realizado imediatamente antes de

todas as ordenhas, com a finalidade de observar alterações no leite que possam indicar a ocorrência ou presença de mastite clínica.

A realização de pré e pós-*dipping* ocorreu em 100% (8) das propriedades avaliadas. Foi constatado durante as visitas às propriedades que os produtores utilizam antissépticos, porém alguns utilizavam em concentrações inadequadas, o que demonstra um inadequado manejo preventivo de mastite ambiental e contagiosa. A utilização de produtos à base de cloro no pré-*dipping* e de iodo no pós-*dipping* é prática comum entre os produtores. Conforme VEIGA (2011) os princípios ativos mais utilizados para a desinfecção dos tetos são o iodo, o clorexidina, LDBSA (ácido sulfônico), cloro, peróxidos, lauridina e ácido cloroso. Objetivando diminuir a irritação e condicionar a pele dos tetos, são utilizadas algumas bases e emolientes na formulação destes germicidas, como a glicerina, lanolina, propilenoglicol, sorbitol, óleos vegetais e minerais, e colágeno. Segundo esse mesmo autor o objetivo da desinfecção dos tetos antes da ordenha é de reduzir a contaminação dos mesmos impedindo novas infecções, especialmente aquelas causadas por patógenos ambientais, além disso, a utilização do pré-*dipping* dispensa a lavagem dos tetos, reduzindo a quantidade de água presente nos tetos ordenhados, o que conseqüentemente previne novas infecções.

Em 37,5% (3) das propriedades avaliadas no presente estudo a lavagem dos tetos é realizada antes da ordenha. Constatou-se onde se adota esta prática, não se procede a lavagem total do úbere, e sim somente dos tetos, de maneira a evitar a contaminação do leite e dos equipamentos de ordenha. Segundo EMBRAPA (2008) recomenda-se que a lavagem seja feita apenas no caso de apresentarem sujidades, tais como barro ou esterco e quando fizer, deve-se evitar o excesso de água para lavagem, limitando-se à lavagem dos tetos, evitando as partes altas do úbere. O uso excessivo de água pode provocar o escorrimento de água residual do úbere até a ponta da teteira e, eventualmente, essa água altamente contaminada pode se misturar com o leite, causando sua contaminação.

A secagem dos tetos é um dos fatores mais importantes da rotina da ordenha a contribuir para a qualidade do leite e para a saúde da glândula mamária. Deve ser realizada com toalhas de papel individuais, descartáveis (EMBRAPA, 2008). Esta conduta é realizada com bastante freqüente nas

propriedades, com a utilização de papel toalha em 100% (8), demonstrando que o hábito de utilização de pano ou outros tecidos, está sendo descontinuado.

FONSECA & SANTOS (2000) citaram sobre a importância da realização de linha de ordenha, recomendando-se que animais sejam ordenhados em lotes de acordo com o estado sanitário. Neste estudo observou-se que todas as fazendas realizam esse método. BEXIGA et al. (2003) observaram que em 58,3%, das explorações leiteiras analisadas, as vacas com mastite clínica eram ordenhadas sem segregação especial, em 33,3% no fim da ordenha e em outra sala de ordenha somente em 8,3% das propriedades.

Verificou-se que em 62,5% (5) das propriedades eram oferecidos alimentos às vacas na sala de ordenha, este método torna o manejo pós-ordenha inadequado, pois ao oferecer novamente o alimento na saída da sala de ordenha os animais pouco se alimentam e logo repousam. GRECELLÉ (2008) citou sobre o fornecimento de alimento pós ordenha segundo o qual, isso possibilita que as vacas se mantem em posição quadrupedal até que o esfíncter do teto se feche, e desta maneira diminui a penetração de microrganismos no canal do teto e reduz o risco de novas infecções.

Observou-se que 50% (4) das fazendas realizaram periodicamente a análise de CCS, isso propicia a identificação dos animais infectados com mastite subclínica no rebanho. Segundo SOUZA et al. (2009) admitiu-se que a principal causa do aumento da CCS seja a presença de inflamação na glândula mamária, com envolvimento de patógenos, ainda que outros fatores como número de parições, estágio de lactação, estação do ano, possam ter efeitos indiretos na CCS (PEELER et al., 2000; CUNHA et al., 2008; ZAFALON et al., 2008).

Ainda com relação ao manejo pré-ordenha, embora o teste da “caneca telada” seja realizado em 100% das propriedades, verificou-se que o CMT é realizado apenas em uma fazenda, indicando que os produtores não realizam rotineiramente o diagnóstico de mastite subclínica nos rebanhos. Além disso, a escolha do tratamento de mastite clínica é realizada com base na experiência profissional dos médicos veterinários responsáveis pelas fazendas ou no apelo comercial de certos anti-mastíticos, não fundamentada em isolamento microbiológico/antibiograma, em 62,5% (5) das propriedades estudadas.

Constatou-se que a limpeza do equipamento de ordenha estava adequada em 62,5% (5) das fazendas, porém foi observada em algumas propriedades que quando algumas teteiras caíam e contaminavam com fezes elas eram higienizadas apenas em balde com solução clorada em concentrações inadequadas. As teteiras, em particular, constituem-se em importante fômite, podendo funcionar como um elemento de transferência de bactérias de uma vaca infectada para uma sadia. A queda do conjunto de teteiras favorece a entrada de patógenos para dentro da glândula mamária.

A manutenção dos equipamentos de ordenha estava sendo realizada de forma correta na maioria das propriedades, porém 25% (2) das fazendas o nível de vácuo estava inadequado demonstrando a falta de assistência de técnicos especializados para sua manutenção. SOUZA et al. (2005) observaram que em 79 rebanhos leiteiros ordenhados mecanicamente, 28 (35,4%) não realizavam ou realizavam de forma esporádica a manutenção do equipamento.

A terapia da vaca seca foi observada em 100% (8) das fazendas. A terapia nada mais é que o tratamento de todos os quartos de todas as vacas no dia da secagem com antibiótico por via intramamária. Atua tanto na prevenção da ocorrência de novos casos quanto na cura dos casos existentes. A prevenção de novos casos de mastite durante o período seco é de extrema importância visto que é neste período que ocorre a maior taxa de risco de uma nova infecção, taxa de risco essa que é diminuída de forma significativa com o tratamento no dia da secagem.

O descarte de vacas com mastite crônica é uma maneira prática e rápida para a redução do nível de infecção existente no rebanho. Porém foi observado que apenas 37,5% (3) das fazendas realizam esse método. Segundo VEIGA (1998) em termos de controle de mastite, a manutenção de animais com casos crônicos de mastite no rebanho, mesmo que estas vacas tenham passado por um tratamento de vaca seca, é pouco justificável. As vacas com mastite crônica (vacas com infecção persistente da glândula mamária por mais de dois meses) funcionam como verdadeiros reservatórios de agentes causadores de mastite e, desta maneira, podem transmitir estes agentes para animais sadios.

Conforme Tabela 3 apenas em duas fazendas o tipo de local/cama onde as vacas deitam estavam limpo e seco. A exposição das vacas a agentes

causadores da mastite ocorre, muitas vezes, no ambiente onde elas vivem. O manejo de dejetos, o tipo e os procedimentos de limpeza da cama são fatores que exercem forte influência sobre a higiene dos animais. Desta forma, a higiene das vacas leiteiras pode ser usada como um indicador da eficiência do manejo da fazenda.

5.2. Cultura e antibiograma

Das 96 amostras colhidas, de vacas com mastite clínica, de duas fazendas leiteiras dos municípios de Anápolis (B) e Goiás (D), em 11 amostras não houve crescimento de nenhum tipo de microrganismo. Portanto, foram analisadas 85 amostras positivas, sendo 58 amostras da fazenda B e 27 amostras da fazenda D.

BRITO & BRITO (1999) explicam que “as amostras de leite podem dar resultados negativos quando: o número de bactérias na amostra é muito baixo para ser detectado pelos métodos laboratoriais de rotina e, em outros casos a infecção pode já ter sido eliminada, mas persiste uma elevada contagem de células, porque a cura das lesões não se completou” e, também, quando amostras sucessivas são sempre negativas na cultura, deve-se pensar em micoplasmas.

5.2.1. Fazenda D

5.2.1.1. Isolamento e identificação dos agentes causadores da mastite clínica

As bactérias Gram positivas de maior ocorrência isoladas nas amostras de leite analisadas da FAZENDA “D” foram o *Staphylococcus warneri* (17,1%), *Streptococcus uberis* (11,4%), *Streptococcus dysgalactiae ssp dysgalactiae* (11,4%), *Staphylococcus aureus* (11,4%) e *Staphylococcus haemolyticus* (8,6%). Para as bactérias Gram negativo com maior incidência nas amostras de leite de vacas com mastite clínica analisadas foram *Escherichia coli* (57%) e *Pseudomonas aeruginosa* (13%).

Levantamentos realizados em diversas regiões do Brasil apontaram a mastite contagiosa como a mais freqüente em nosso país, tendo como agentes

principais *S. aureus* (30-83%), *Streptococcus* spp. (3-60%), *Corynebacterium bovis* (1,3-30%) e *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN) (16-25%) (NADER FILHO et al., 1984; LANGONI et al., 1991; COSTA et al., 1995; BRITO & BRITO, 1999; BARBALHO & MOTA, 2001; LAFFRANCHI, 2001).

No grupo da mastite contagiosa o microrganismo mais isolado foi *Staphylococcus warneri* (17,1%) que é um SCN, frequência maior foi encontrado no estudo de LUCHEIS (2011), 30,7% e *Staphylococcus aureus* em concordância com estudo realizado por BENITES et al. (2001) estudaram a ocorrência de mastites em 140 glândulas mamárias de 35 vacas e encontraram um predomínio no isolamento de microrganismos do gênero *Staphylococcus* (60,71%), sendo que 54,29% corresponderam a *Staphylococcus* coagulase negativos e 6,43% *Staphylococcus* coagulase positivos.

Segundo RANJAN et al. (2006), embora diversos agentes possam estar envolvidos na etiologia da mastite bovina, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e coliformes são os patógenos mais comumente envolvidos no processo, responsáveis por aproximadamente 80% de todas as infecções intramamárias. Segundo PHILPOT & NICKERSON (2002), os SCN são os agentes mais freqüentemente isolados nos rebanhos, resultado confirmado neste caso.

A elevada ocorrência de microrganismos do gênero *Staphylococcus aureus* (11,4%) está em conformidade ao verificado em outros estudos (NADER FILHO et al., 1986; BRITO et al., 1998; COSTA et al., 1995; LANGONI et al., 2000), que tem referido resultados semelhantes. Estudos realizados por GUIMARÃES (2011) de 4.584 glândulas mamárias, 1.148 vacas em lactação, identificou a frequência de 722 do total microbiológico positivos, observou a presença do *S. aureus* 90/722 (12,5%).

BRABES et al. (1999) analisaram 127 amostras de leite de casos de mastite em cinco propriedades nos estados de São Paulo e Minas Gerais entre os SCN foram identificados: *S. chromogenes* (11,8%), *S. sciuri* (9,5%), *S. warneri* (2,36%); *S. epidermidis* (0,8%), COSTA et al. (2008), estudaram casos de mastite por SCN em bovinos leiteiros de fazendas de São Paulo e Pernambuco e identificaram as seguintes espécies: *S. warneri* (45,5%), *S. hyicus* (18,2%), *S. chromogenes* (14,3%), *S. epidermidis* (5,2%), *S. saprophyticus* (5,2%), *S. haemolyticus* (5,2%), *S. capitis* (2,6%); *S. simulans*

(1,3%), *S. xylosus* (1,3%), *S. hominis* (1,3%). Em contraste, no presente estudo as espécies de SCN mais frequentemente isoladas foram: *S. warneri* (17,1%), *S. haemolyticus* (8,6%), *S. chromogenes* (3%), *S. sciuri* (3%), *S. epidermidis* (3%), *Staphylococcus intermedius* (3%) e *Staphylococcus gallinarum* (3%).

Surpreende o fato de *S. chromogenes* ter sido isolado apenas em um caso de mastite na fazenda, uma vez que foi referido ser um dos 65 SCN de maior frequência na etiologia de mastite nos EUA (NICKERSON, 2008) e já ter sido isolado em outros estudos brasileiros (BRABES et al., 1999; COSTA, 2002 e 2008). Tal fato demonstra que programas de controle muitas vezes devem ser específicos e de acordo com a etiologia da mastite presente nos animais das fazendas.

Ainda entre os estafilococos, os SCN nas últimas décadas vem assumindo papel importante na etiologia da mastite bovina, como registrado em alguns estudos nacionais e internacionais. Os SCN são considerados menos patogênicos que as espécies coagulase positivas e fazem parte da microbiota normal da pele de homens e animais (TORTORA et al., 2002; RIBAS, 2003). Os SCNs aderem facilmente às superfícies poliméricas como cateteres por produzirem biofilmes. Este fato, provavelmente, pode acontecer também nas ordenhadeiras, facilitando sua disseminação entre os animais (RUPP et al., 2000).

Estes patógenos têm sido observados tanto em mastites subclínicas como nas clínicas, em casos onde se verifica acentuada redução na produção leiteira (TAPONEN et al., 2007).

A elevada ocorrência do SCN (40,7%), na propriedade leiteira estudada, confirma com a crescente relevância destes microrganismos e fundamenta o objetivo do presente estudo em identificar as espécies prevalentes e avaliar a resistência a antimicrobianos.

Em um levantamento recente com 935 quartos mamários avaliados, OLIVEIRA et al. (2011) isolaram em casos de mastite clínica *Staphylococcus coagulase negativa* (25%), *Staphylococcus aureus* (16,7%), *Streptococcus* spp. (8,3%) e *Corynebacterium* spp. (8,3%).

Dentre as bactérias Gram-negativas a *Escherichia coli* foi detectada em 13/23 (57%) dos isolamentos nas amostras, resultado superior aos detectados

por REIS et al. (2003), 11,6%. *E. coli* é considerada como o microrganismo predominante na etiologia da mastite ambiental e seus reservatórios são principalmente as fezes dos animais ou materiais contaminados (SANTOS & FONSECA, 2007).

Cabe destacar a grande importância da contaminação do leite por bactérias do gênero *Pseudomonas*, por serem microrganismos psicotróficos, se multiplicarem em temperaturas de refrigeração constituindo problema emergente para os profissionais da área de inspeção sanitária e de qualidade do leite (FERNANDES et al. 2009).

Pseudomonas aeruginosa trata-se de um microrganismo considerado saprófita, sendo isolado de ambientes onde existem bovinos, principalmente da água usada para lavagem dos equipamentos de ordenha (COSTA, 1998). Segundo RIBEIRO & CARVALHO (2001), a água pode se constituir em fonte adicional de contaminação do leite e dos animais, caso não esteja dentro dos padrões microbiológicos e físico-químicos, tendo como contaminantes mais comuns os coliformes, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Cytophaga*, *Micrococcus* e *Pseudomonas*, provenientes do solo ou da própria água rica em matéria orgânica.

Segundo PACKER (1977), *P. aeruginosa* é responsável por menos de 1% das mastites em bovinos leiteiros e estas infecções raramente atingem níveis superiores a 3%, o que não estão de acordo com os achados desta pesquisa.

Verificou-se na pesquisa, a frequência de 13% de *Pseudomonas aeruginosa* resultados semelhantes aos apresentados por MOREIRA et al. (1997), 12,12% e ANDRADE (1997), 10,0%, e superiores aos relatados por REIS et al. (2003), 2,9%.

5.2.1.2. Antibiógramas

Foram testados 15 princípios ativos de antimicrobianos para bactérias Gram positivas, sendo que, para este grupo de microrganismos, a gentamicina 500, estreptomicina 2000 e linezolid foram os antibióticos que apresentaram a melhor atividade biológica antibacteriana, sendo evidenciados 100% de sensibilidade para os dois primeiros e 96,3% para o linezolid. Enquanto, a

tetraciclina foi a que apresentou menor percentual de sensibilidade, demonstrando, nos testes *in vitro*, susceptibilidade para apenas 41,2% do total de microrganismos isolados (GRÁFICO 1).

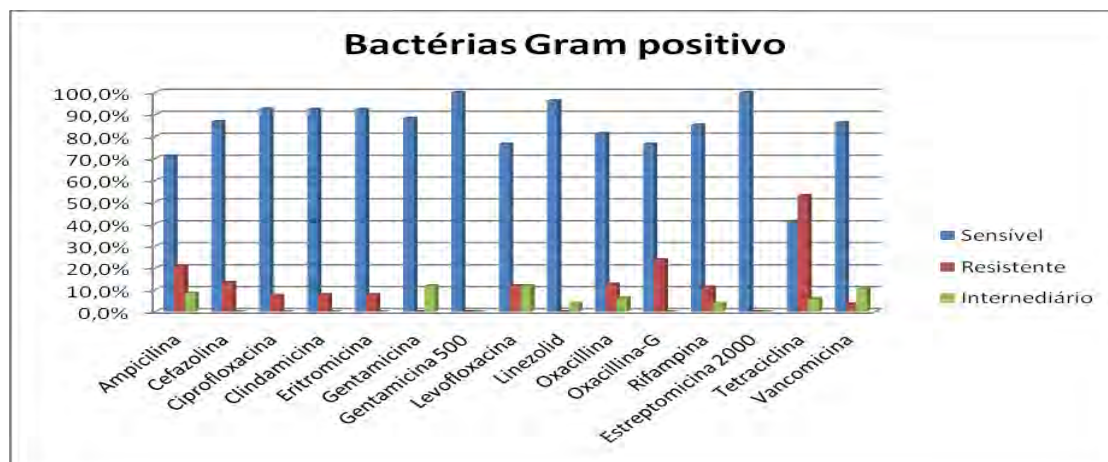


GRÁFICO 1. Perfil de sensibilidade antimicrobiana para bactérias Gram positivas.

NADER FILHO et al. (1984) submeteram ao antibiograma 37 amostras de *S. aureus* isoladas de Infecção Intramamária (IIM) de bovinos em Ribeirão Preto/SP. Verificaram que gentamicina, amicacina, eritromicina e cefotaxima foram as drogas mais eficientes corroborando com os achados na pesquisa. Em 2007, os mesmos autores estudaram 72 cepas de *S. aureus* isoladas do leite de vacas com sinais de mastite ou que apresentavam positividade no CMT, em 10 propriedades rurais do Estado de São Paulo, os resultados dos testes de sensibilidade demonstrou que os princípios ativos que apresentaram maior sensibilidade foram a gentamicina (98,6%), seguidos pela estreptomicina (94,4%), oxacilina (84,7%), novobiocina (73,4%), vancomicina (72,2%), ampicilina (4,2%) e a penicilina (2,8%).

Neste estudo, foi verificada eficácia de 100% sobre as cepas de *S. warneri* nos testes realizados com os princípios ativos ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, linezolid, oxacilina, rifampicina e vancomicina.

PINTO et al. (1999) observaram resistência dos SCN em relação à enrofloxacina de 9,09% e 45,7% à ampicilina, sendo que a resistência frente ao cloranfenicol, à penicilina e sulfazotrim foi acima de 26,31% no Rio Grande do

Sul. No presente estudo dados inferiores foram encontrados para ampicilina (20%) de resistência.

BENITES et al. (2001) avaliaram o padrão de resistência de amostras de *Staphylococcus* coagulase positivos e SCN isoladas de parênquima de glândulas mamárias de vacas em lactação enviadas ao abate e verificaram que a maior resistência foi à penicilina (84,4%) e ampicilina (86,6%) e a maior sensibilidade à cefalotina e gentamicina. MOTA et al. (1999) obtiveram valores de sensibilidade antimicrobiana para gentamicina (100%), neomicina (92,4%), lincomicina (90,6%), sulfazotrim (88,5%), cloranfenicol (86,8%), cefalotina (82,7%) para SCN isolados de leite bovino. Dados em relação a sensibilidade a gentamicina estão em concordância com os citados pela literatura.

Para o grupo de microrganismos Gram negativos, foram utilizados 16 princípios ativos de antimicrobianos, dos quais a amikacina, imipeneme e trimetoprim/sulfa apresentaram sensibilidade de 90,5%, ao passo que, ampicilina (30,8%) foi a que apresentou o menor percentual de sensibilidade (GRÁFICO 2).

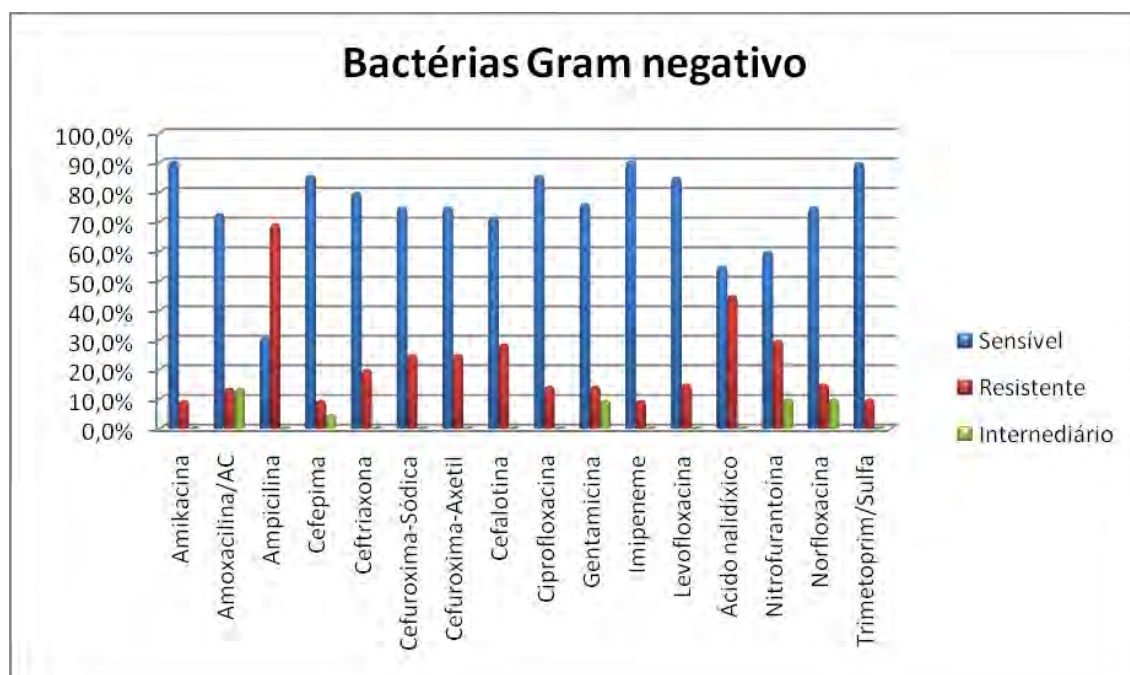


GRÁFICO 2. Perfil de sensibilidade antimicrobiana para bactérias Gram negativas.

FERNANDES et al. (2009) verificaram multirresistência de 19 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* para ampicilina, cefalexina, gentamicina,

tetraciclina, penicilina/novobiocina e cloxacilina. Além disso, o perfil de sensibilidade microbiana das 19 linhagens mostrou que somente enrofloxacina (73,7%) e danofloxacina (73,7%) foram os antibióticos mais efetivos frente aos microrganismos isolados. A elevada resistência aos antimicrobianos foi similar aos achados no estudo.

ERSKINE et al. (2003) afirmaram que as bactérias Gram-negativas, em geral, são suscetíveis à gentamicina, amikacina, polimixinas, e às cefalosporinas de 2^a e 3^a geração, tais como a cefuroxima e cefoperazona e que a maioria é resistente à estreptomicina, neomicina, tetraciclina, ampicilina e amoxicilina. Como também, estão em concordância com os relatos de ANDRADE et al. (2000) que justificaram a menor taxa de eficácia do antibiótico ampicilina em razão do uso indiscriminado e inadequado (subdosagens) destes antimicrobianos na prática veterinária, pois que são estes os antibióticos mais frequentemente utilizados para controle de mastite.

RIBEIRO et al.(2009) avaliaram o perfil de resistência antimicrobiana de bactérias isoladas de 148 vacas no período médio de lactação, das quais 2 com mastite clínica, 72 com mastite subclínica e 74 sem mastite (controle), provenientes de quatro propriedades do interior do estado de São Paulo, verificou-se que as maiores taxas de resistência das linhagens encontradas foram constatadas para penicilina (53,5%), ampicilina (41,6%) e neomicina (38,6%). No presente estudo foi encontrado valores maiores de resistência para o principio ativo ampicilina (68%).

5.2.2. Fazenda B

5.2.2.1. Isolamento e identificação dos agentes causadores da mastite clínica

As bactérias Gram positivas de maior ocorrência isoladas nas amostras de leite analisadas da FAZENDA “B” foram o *Streptococcus uberis* (23%), *Staphylococcus aureus* (14%), *Streptococcus spp.* (14%). As bactérias Gram negativo com maior incidência nas amostras de leite de vacas desta propriedade com mastite clínica analisadas foram *Klebsiella oxytoca* (50%), *Pseudomonas aeruginosa* (33%).

Coliformes e *S. uberis* tem sido os principais patógenos ambientais envolvidos nas infecções intramamárias (IIM), com taxas de isolamento variáveis entre 5 e 26% (HILLERTON et al., 1993; HOGAN & SMITH, 1997; RIBEIRO et al., 2002). As taxas de infecções por bactérias ambientais são variáveis em nosso meio (NADER FILHO et al., 1984; LANGONI et al., 1991; COSTA et al., 1995; RIBEIRO et al., 2006) e dependem, fundamentalmente, da aplicação de medidas de manejo utilizadas, posto que coliformes e *S. uberis* são patógenos envolvidos nas IIM em rebanhos bem manejados, nos quais as CCSLT são baixas e as infecções por patógenos contagiosos foram controladas (SILVA et al., 1999).

A elevada ocorrência de *S. uberis* (23%) entre os agentes ambientais foi também relatada por COSTA (1998), que incriminou esse microrganismo como um dos principais agentes etiológicos da mastite ambiental.

Pseudomonas spp. são bastonetes gram-negativos, aeróbios obrigatórios, móveis, sendo a maioria catalase positiva e oxidase positiva. São microrganismos ambientais, também encontrados na pele, membranas mucosas e fezes. *Pseudomonas aeruginosa* é relatada como causadora oportunista de mastite em bovinos e está frequentemente associada ao uso de tubos intramamários contaminados (QUINN et al., 2005).

Verificou-se na pesquisa, a frequência de 50% de *Klebsiella* sp. resultados superiores aos apresentados por MOREIRA et al. (1997), 4,32%.

5.2.2.2. Antibiogramas

Foram testados 13 princípios ativos de antimicrobianos para bactérias Gram positivas, sendo que, para este grupo de microrganismos, clindamicina, rifampina, linezolid e vancomicina foram os antibióticos que apresentaram a melhor atividade biológica antibacteriana, sendo evidenciados 100% de sensibilidade. Enquanto, a tetraciclina foi a que apresentou menor percentual de sensibilidade, demonstrando, nos testes *in vitro*, susceptibilidade para apenas 57,1% do total de microrganismos isolados (GRÁFICO 3).

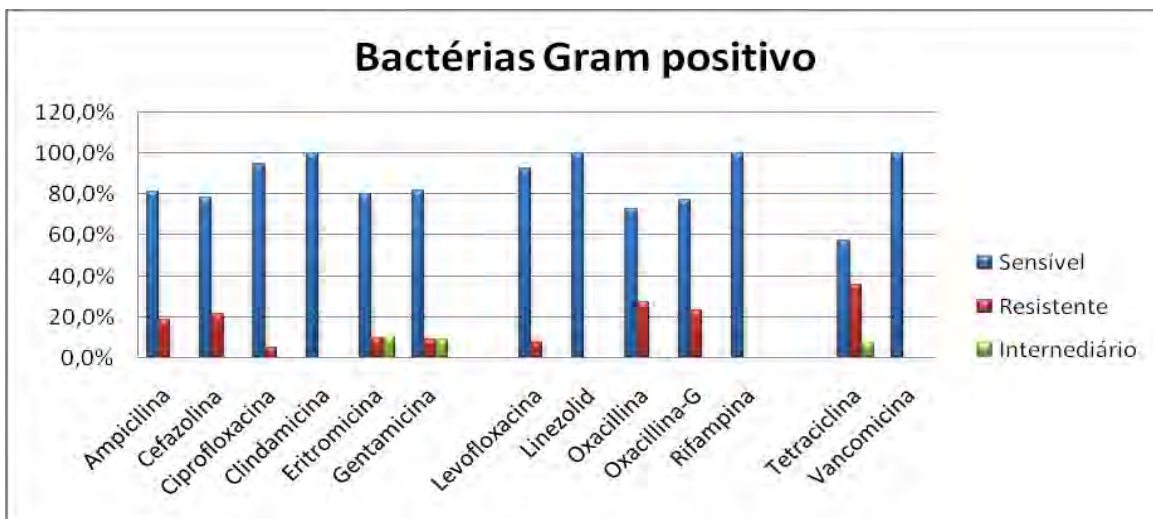


GRÁFICO 3. Perfil de sensibilidade antimicrobiana para bactérias Gram positivo.

As cepas de *Streptococcus* spp que apresentaram menor sensibilidade entre os princípios ativos de antimicrobianos avaliados, foram tetraciclina (57,1%), oxacilina (72,7%) e cefazolina (78,6%). A baixa sensibilidade apresentada pelas cepas de *Streptococcus* spp pode ser um reflexo de práticas inadequadas na escolha e/ou no uso indiscriminado desses antimicrobianos (FONSECA & SANTOS, 2000).

BRITO et al. (2001) comprovaram que *Staphylococcus aureus* isolados de infecções intramamárias bovinas no Brasil (clínicas e subclínicas) foram sensíveis a cefalotina, eritromicina, gentamicina, norfloxacina e oxacilina, 91% resistentes à tetraciclina e a tilosina e 65% a ampicilina e a penicilina e 99% à neomicina, estes resultados estão em conformidade com o exposto na pesquisa.

NADER FILHO et al. (2007) encontraram resultados maiores em relação a resistência dos isolados de *S. aureus* frente à ampicilina (95,8%), bem como a baixa resistência frente à gentamicina (1,4%). A baixa resistência à ampicilina (20%) observada no presente estudo, também contradiz com a observada por LANGE et al. (1997) no Rio Grande do Sul e PEREIRA (2001) em Minas Gerais.

Para o grupo de microrganismos Gram negativos, foram utilizados 16 princípios ativos de antimicrobianos, dos quais a amikacina, ciprofloxacina, gentamicina, levofloxacina, imipeneme e norfloxacina apresentaram

sensibilidade de 100%, ao passo que, ampicilina (28,6%) foi a que apresentou o menor percentual de sensibilidade (GRÁFICO 4).

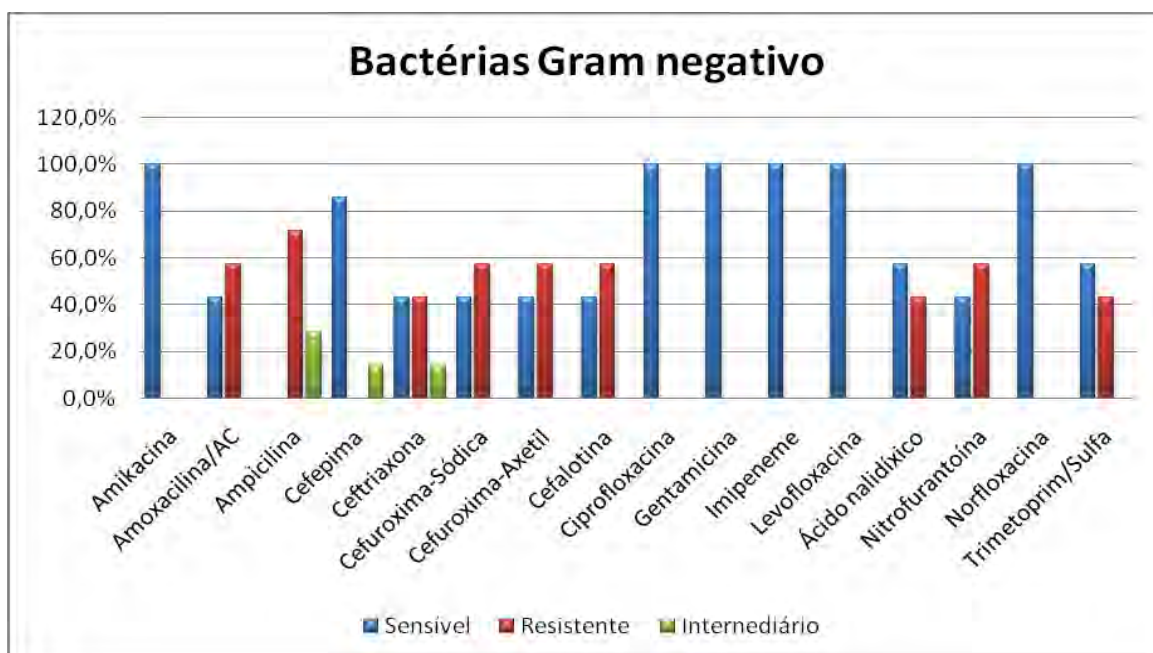


GRÁFICO 4. Perfil de sensibilidade antimicrobiana para bactérias Gram negativo.

Os antibióticos do grupo dos β - lactâmicos, como a penicilina G, as cefalosporinas e a ampicilina, são os mais utilizados para tratamento de doenças em rebanhos leiteiros, sendo assim os mais frequentemente detectados no leite (PHILPOT & NICKERSON, 2002). Outros como a gentamicina, as tetraciclina e os macrolídeos são citados por QUINN et al. (2005) como antibióticos comumente usados contra patógenos causadores de mastite bovina.

FERNANDES et al. (2009) verificaram o perfil de resistência de 19 isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e identificou elevada porcentagem a ampicilina, cefalexina, gentamicina, tetraciclina, penicilina/novobiocina e cloxacilina (100%). A elevada resistência ao antimicrobiano ampicilina foi similar aos achados no estudo (71,4%).

5.3. CCS e PCR em tempo real

Foram analisadas 5.758 amostras individuais de leite de vacas individuais de 7 propriedades, para verificação da CCS. Das amostras de leite de vacas individuais que apresentaram CCS acima de 200×10^3 cs/mL, 10% destas foram submetidas à técnica de PCR em tempo real, representando um total de 332 amostras. Os resultados de CCS (pool das amostras de leite dos animais avaliados), estão apresentados no Gráfico 5.

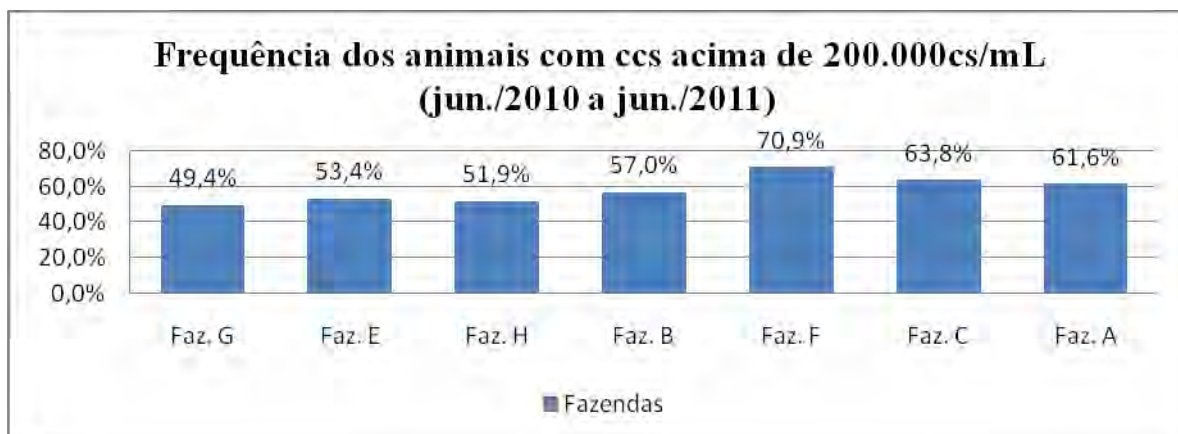


GRÁFICO 5. Frequência dos animais com CCS acima de 200.000 cs/mL, por fazenda.

Conforme o gráfico acima observa-se que a Fazenda F (70,9%) apresentou a maior frequência de animais com CCS acima de 200.000 cs/mL. Já a fazenda G (49,4%) foi a que teve menor frequência.

Considerando como ponto de corte de CCS acima de 200×10^3 células/mL para classificar animais possivelmente infectados, obteve-se 2442/5758 (42,41%) de amostras que apresentaram resultados inferiores e 3316/5758 (57,59%) superiores a esse valor. Esses resultados estão em conformidade com os estudos realizado por COENTRÃO et al.(2008), que encontraram 52,0% de amostras com CCS acima desse valor. Os resultados deste trabalho demonstram alto percentual de animais, com a enfermidade em sua forma subclínica.

O fator que apresenta maior efeito sobre a CCS é o nível de infecção da glândula mamária no rebanho e o tipo de agente etiológico (SOUZA et al., 2009). Portanto, agrupou-se os diversos microrganismos isolados do leite das 7 propriedades estudadas de acordo com suas principais características: cocos Gram-positivos (G+), bastonetes Gram-negativos (G-) e relacionou-se com as

CCS identificadas a partir das amostras de leite proveniente das vacas pertencentes ao estudo.

A contagem média de células somáticas das 5.758 amostras de leite das propriedades foi de aproximadamente 743×10^3 cs/mL, com o mínimo registrado de 422×10^3 cs/mL em um rebanho, e o máximo de 1.177×10^3 cs/mL em outro. COENTRÃO et al. (2008) obtiveram valores da média da CCS individual por rebanho de 608×10^3 cs/mL. No entanto, estudos realizados por VIANNA et al. (2002), encontraram valores das médias de CCS de 469×10^3 cs/mL de leite de animais com mastite subclínica e já MEDEIROS & SOUZA (2009) identificaram a 1.631×10^3 cs/mL.

Conforme médias obtidas da CCS individual por rebanho as fazendas das quais se observou maior média de CCS foram fazendas F e A, com os valores 1.177×10^3 cs/mL e 910×10^3 cs/mL respectivamente. Como pode ser observada na tabela 4 e 5, a presença de agentes infecciosos no leite influenciou a variação na CCS. Segundo SANTOS & FONSECA (2007) a alta prevalência de *Streptococcus agalactiae* em rebanhos leiteiros pode ter impacto negativo sobre a qualidade do leite, pois esse agente provoca grande elevação da CCS (acima de 1.000.000 cs/mL).

As propriedades com médias inferiores de CCS foram a fazenda E e G, com os valores de 422×10^3 cs/mL e 508×10^3 cs/mL respectivamente.

O microrganismo gram-positivo isolado com maior frequência absoluta (33/143) foi *Streptococcus agalactiae* (TABELA 4) na fazenda F e na fazenda A (12/56) (TABELA 5).

TABELA 4. Frequências (absoluta e relativa) de isolados bacterianos gram-positivos, frente ao total de isolamentos obtidos a partir de amostras de leite de vacas em produção da fazenda F localizada no município de Hidrolândia-GO. Goiânia-GO, 2011.

Microrganismo	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	3,5
<i>Streptococcus agalactiae</i>	33	23,1
<i>Corynebacterium bovis</i>	11	8
<i>Enterococcus sp.</i>	28	19,6
<i>Arcanobacterium pyogenes/ Peptococcus indolicus</i>	6	4
<i>Streptococcus uberis</i>	28	19,6
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	10	7,0
<i>Staphylococcus sp.</i>	22	15
Total	143	100

TABELA 5. Frequências (absoluta e relativa) de isolados bacterianos gram-positivos, frente ao total de isolamentos obtidos a partir de amostras de leite de vacas em produção da fazenda A localizada no município de Abadia de Goiás-GO. Goiânia-GO, 2011.

Microrganismo	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	3,6
<i>Streptococcus agalactiae</i>	12	21,4
<i>Corynebacterium bovis</i>	3	5
<i>Enterococcus sp.</i>	8	14,3
<i>Arcanobacterium pyogenes/ Peptococcus indolicus</i>	5	9
<i>Streptococcus uberis</i>	11	19,6
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	4	7,1
<i>Staphylococcus sp.</i>	11	20
Total	56	100

Estes resultados encontram-se respaldos nos dados apresentados por VIANNA et al. (2002) observaram que o gênero *Streptococcus* foi um agente capaz de elevar a CCS, com média de 1.094×10^3 cs/mL. Porém, contagens superiores foram descritas por ELIAS et al. (2005), 1.800×10^3 cs/mL, e MEDEIROS & SOUZA (2009) que observaram a CCS média de amostras de leite oriundas de animais infectados por *Streptococcus* spp. com 1.556×10^3 cs/mL. SOUZA et al. (2009) relataram 894×10^3 cs/mL em animais infectados por esse patógeno.

Enterobactérias representadas, principalmente pelos coliformes, como a *E. coli* e *Klebsiella* spp. compuseram o grupo das Gram-negativas. Foi identificada a presença de *E. coli* com frequência de 57%(4/7) das fazendas. Estas bactérias são apontadas como importantes agentes das mastites ambientais (PRESTES et al., 2002), e são constituintes da microbiota intestinal tanto do homem como dos animais. Constatou-se a maior frequência desses microrganismos na fazenda F em 63,41% (26/41) (TABELA 6). Resultados semelhantes foram identificados no estudo de COSTA et al. (2006) sendo identificada em 75% (15/20). O aumento da frequência de *E. coli* pode ser atribuído ao manuseio direto dos animais, como o toque na cauda, contato com úbere sujo e fezes na sala de ordenha. O segundo microrganismo mais isolado foi a *Klebsiella* sp. com uma frequência de 43% (3/7) das fazendas estudadas.

TABELA 6. Frequências (absoluta e relativa) de isolados bacterianos gram-negativos, frente ao total de isolamentos obtidos a partir de amostras de leite de vacas em produção da fazenda F localizada no município de Hidrolândia-GO. Goiânia-GO, 2011.

Microrganismo	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
<i>Klebsiella oxytoca/ K. pneumoniae</i>	8	19,51
<i>Serratia marcescens</i>	7	17,08
<i>Escherichia coli</i>	26	63,41
Total	41	100

Na Tabela 7 estão expressos os microrganismos isolados das amostras de leite com CCS acima de 200×10^3 cs/mL oriundas das 7 propriedades leiteiras estudadas. Das 332 amostras de leite obtidas, dentre as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus uberis* foram os microrganismos mais isolados nas fazendas (15,2%), seguido por *Enterococcus sp.* e *Streptococcus agalactiae* (11,6%), *Corynebacterium bovis* (7,3%), *Streptococcus dysgalactiae* (6,8%), *Staphylococcus aureus* (4,8%) e *Arcanobacterium pyogenes* (4,5%). Para as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (9,5%) foi o microrganismo mais isolado, seguido por *Klebsiella sp.* (8%) e *Serratia marcescens* (5,5%).

TABELA 7 - Frequência (absoluta e relativa) de patógenos isolados de 332 amostras de leite de fêmeas bovinas, em 7 propriedades leiteiras, durante os meses de junho de 2010 a junho de 2011.

Patógenos isolados	Frequência absoluta	Frequência relativa(%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	51	4,8
<i>Streptococcus agalactiae</i>	123	11,6
<i>Corynebacterium bovis</i>	78	7,3
<i>Enterococcus sp.</i>	123	11,6
<i>Arcanobacterium pyogenes/</i>	46	4,5
<i>Peptococcus indolicus</i>		
<i>Streptococcus uberis</i>	161	15,2
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	72	6,8
<i>Staphylococcus spp.</i>	161	15,2
<i>Klebsiella sp.</i>	84	8,0
<i>Serratia marcescens</i>	57	5,5
<i>Escherichia coli</i>	100	9,5
Total	1.056	100,0

Observando-se na Tabela 7, a predominância de *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus uberis* sobre os demais microrganismos, com 15,2% do total de

microrganismos isolados. Estes resultados estão inferiores aos relatados por ANDRADE (1997), 43,0%, REIS et al. (2003), 43,1%, SANTOS et al. (2006), 39,13% e COSTA (2010), 37,5% de *Staphylococcus* spp. Essas diferenças nas frequências dos patógenos isolados podem ser atribuídas a fatores relacionados ao manejo e ao sistema de criação.

Staphylococcus spp e *Streptococcus* spp predominaram em casos de mastite subclínica. Segundo BRAMLEY & DODD (1984); HARMON (1998); WILSON et al. (1998); FONSECA & SANTOS (2000); SANTOS (2001) esses agentes são relacionados entre os principais causadores de infecções subclínicas, ocasionando expressivo aumento na contagem de células somáticas, o que representa grave comprometimento da produção e da qualidade do leite, gerando sérios prejuízos ao sistema de produção.

A elevada ocorrência de *S. uberis* (15,2%) entre os agentes ambientais foi também relatada por COSTA (1998), que incriminou esse microrganismo como um dos principais agentes etiológicos da mastite ambiental.

Segundo QUINN et al. (2005), cinco patógenos bacterianos são os principais responsáveis pela mastite bovina: *E. coli*, *Streptococcus uberis*, *S. aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus agalactiae* o que confirma com achados neste estudo.

Segundo RADOSTITS et al. (2007) consideram os patógenos menos comuns causadores de mastite são *Nocardia* spp., *Arcanobacterium pyogenes*, *Pasteurella multocida*, *Campylobacter jejuni*, *B. cereus*, *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp. e alguns fungos como *Aspergillus* spp. e *Candida* spp. o que corroboram com os encontramos *Arcanobacterium pyogenes* (4,5%).

MOREIRA et al. (1997) avaliaram amostras de leite de 231 vacas da bacia leiteira de Goiânia, e isolaram *Staphylococcus* coagulase positiva (32,90%), *Streptococcus* sp. (22,07%), *Pseudomonas* sp. (12,12%), *Enterobacter* sp. (10,38%), *Corynebacterium* sp. (8,65%), *E. coli* (8,22%), *Bacillus* sp. (8,22%), *Proteus* sp. (6,49%), *Klebsiella* sp. (4,32%) e *Staphylococcus* coagulase negativa (3,46%). Alguns resultados foram semelhantes aos encontrados na pesquisa.

COSTA (2008) analisaram 35 rebanhos leiteiros pertencentes à bacia leiteira da região sul do estado de Minas Gerais obteve amostras de leite de 1.645 quartos mamários, sendo 238 oriundas de casos clínicos e as demais de

casos subclínicos. Verificou-se o isolamento de *C. bovis* em 91,42% das propriedades e 14,11% das amostras de leite analisadas, com taxas de isolamento que variaram de zero a 59,25%, e o envolvimento predominantemente nos caso subclínicos (91,67%). Diferentes autores relataram que o *C. bovis* é um patógeno responsável por altas taxas de infecção subclínica em rebanhos leiteiros nacionais (LANGONI et al., 1991; COSTA et al., 1995; BRITO et al., 1998; COSTA, 2005), sendo isolado com maior freqüência em rebanhos nos quais ocorrem falhas na anti-sepsia de tetos após ordenha (WATTS, 2000).

RIBEIRO et al. (2009) relataram que, em um levantamento com 74 vacas com mastite, *S. aureus* foi o microrganismo que obteve o maior percentual (25,7%), seguido de *Streptococcus* spp. (21,4%), *Corynebacterium bovis* (12,9%), *Streptococcus agalactiae* (4,3%) e *Staphylococcus* spp. (4,3%). Diferentemente no presente estudo foi identificado um maior percentual para os microrganismos *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus* spp.

OLIVEIRA et at. (2011) isolaram em casos de mastite subclínica *Staphylococcus* coagulase negativa (32,3%), *Staphylococcus aureus* (17,7%), *Staphylococcus intermedius* (1,6%), *Streptococcus* spp. (4,8%) e *Corynebacterium* spp. (4,8%) esses dados estão em parte em consonância com os encontrados nesta pesquisa, pois para os microrganismos *S. aureus* encontrado o valor menor (4,8%) e valores maiores para *Streptococcus* spp. (33,6%) e *Corynebacterium bovis* (7,3%).

O conhecimento da etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana é importante para a escolha do medicamento a ser utilizado no tratamento dos futuros casos de mastite clínica bovina e a técnica de PCR em tempo real permitiu a detecção dos principais microrganismos causadores de mastite subclínica proporcionando maior agilidade na tomada de decisão quanto ao tratamento e controle da doença.

6. CONCLUSÕES

- Na mastite clínica o *Streptococcus uberis* e *Staphylococcus aureus* foram os agentes mais frequentemente isolados e o antibiograma demonstrou uma maior eficácia do linezolid, amikacina, gentamicina e imipenene frente aos agentes isolados.
- A mastite subclínica é predominante nas propriedades e tanto os agentes contagiosos como ambientais estão contribuindo para este tipo de infecção. O *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Staphylococcus* sp foram os agentes mais frequentemente isolados e que determinou maiores valores médios de CCS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. Agentes bacterianos de enfermidade transmitida por alimentos. In: _____ **Microbiologia de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1997, p. 195 – 276.
2. ALBERTON, L.R.A.; WERNER, P.R.; CUNHA, L.; WARTH, J.F.; FAROCO, A.P.P.A.; RIBAS, N.P. Vacinação com bacterina de *Staphylococcus aureus* no controle da mastite em vacas em lactação. **Arq. Ciên. Vet. Zool. UNIPAR**, p. 31-40, 2001.
3. ALMEIDA, M. A. C. **Prevalência de mastite subclínica em bovinos por *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. na microregião de Garanhuns, Pernambuco**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1997. 48p.
4. ANDRADE, M.A. **Mastite bovina subclínica: prevalência, etiologia e frequência de patógenos isolados das mãos de ordenhadores e teteiras e testes de sensibilidade a drogas antimicrobianas**. 1997. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Goiás. Goiânia.
5. ANDRADE, M. A.; FILHO, F.C.D.; MESQUITA, A.J.; ROCHA, P.T. Sensibilidade in vitro de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 1, n. 1, p. 53-57, 2000.
6. ANDERSON, N.G., CÔTÉ, J.F. **Dry cow therapy**. 1996. [On line]. Disponível em: <http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/dairy/facts/90-003.htm>. Acesso: 25 de agosto de 2011.
7. ANNEMÜLLER, C.; LÄMMLER, C.; ZSCHÖCK, M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 69, p.217-224, 1999.
8. ARAÚJO D. K. G.; GHELLER V.A. Aspectos morfológicos, celulares e moleculares da imunidade da glândula mamária de búfalas (*Bubalus bubalis*): revisão de literatura. **Rev. Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n.2, p.77-83, abril/jun. 2005. Disponível em: www.cbra.org.br. Acesso em: 02 de jan. 2012.
9. BARBALHO, T. C.; MOTA, R. A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no Estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. V.2, n.2,p.31-36, 2001.
10. BARTLETT, P. C.; MILLER, G. Y.; ANDERSON, C. R. Milk production and somatic cell count in Michigan dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p.2794-2800. 1990.

11. BEER, J. **Doenças infecciosas em animais domésticos**. São Paulo: Roca, 1999. 2 v.
12. BENITES, N.R.; MELVILLE, P.A.; COSTA, E.O. 2001. Modificação da técnica de contagem de células somáticas de Prescott & Breed utilizando-se a coloração hematoxilina e eosina. **Napgama**, 4 (3): 6-9
13. BEXIGA, R.; CAVACO, L.; VILELA, C.L. Isolamento de *Prototheca zopfii* a partir de leite bovino. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 98, n. 545, p. 33-37, 2003.
14. BIER, O. **Microbiologia e imunologia**. 24 ed. São Paulo: Melhoramentos, 1990. 1324p.
15. BRADLEY, A.J. Bovine mastitis: an evolving disease. **Vet. Journal**. 164:116-128.2002.
16. BRAMLEY, J; DODD, F.H. Reviews of the progress of dairy science: mastitis control – progress and prospects. **J D Res**. 51:481-512. 1984
17. BRANT, M.C.; FIGUEIREDO, J.B. Prevalência da mastite subclínica e perdas de produção em vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 46, n. 6, p. 595-606, 1994.
18. BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa n.9 de 27 de junho de 2003. Dispõe sobre a proibição de fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e susceptível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. **Diário oficial da união**, Brasília, DF, 30 jun. 03. Seção 1, p.1-2, 2003.
19. **BRASIL**. Instrução Normativa n.51 de 18 de Setembro de 2002.
20. BRABES, E.P.; CARVALHO, F.L.; DIONÍSIO, M.L.; PEREIRA, F. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas de gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Rev. Napgama**, v. 3, p. 4-11, 1999.
21. BRITO, M.A.V.P., BRITO, J.R.F. Produção científica brasileira sobre mastite bovina. In: BRITO, J.R.F., BRESSAN, M. (Ed.). **Controle integrado da mastite bovina**. Juiz de Fora: EMBRAPA/CNPGL, 1996. p.68-96.
22. BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SOUZA, H. M. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. **Pesq. Vet. Bras.**, v.18, n.1, p.39-44. 1998.
23. BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; SILVA, M.A.S.; CARMO, R.A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos de amostras para

Staphylococcus aureus isoladas de infecção intramamária bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 2001; 53:531-7.

24. BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F. **Diagnóstico Microbiológico da Mastite mastite.** Circular Técnica n. 55. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999. 26p. 2002

25. BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; NICOLAU, E. S.; OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, J. P.; NEVES, R. B. S.; MANSUR, J. R. G.; THOMAZ, L. W. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 848 – 854, 2006.

26. BUSCHNELL, R.B. Mycoplasma mastitis. **Vet. Clin. North Am.** 6:301-312. 1984.

27. BURVENICH, C.; VAN MERRIS, V.; MEHRZAD, J. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. **Veterinary Research**, v. 34, p. 521-564, 2003.

28. BUZZINI, P.; TURCHETTI, B.; FACELLI, R. First large-scale isolation of *Prototheca zopfii* from milk produced by dairy herds in Italy. **Mycopathologia**, v. 158, p. 427-430, 2004.

29. CARNEIRO, D. M. V. F. **Detecção microbiológica e molecular de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite bovino obtidas de tanques de expansão – correlação com resíduos de antibióticos.** Tese (doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista. 2009.

30. CORREA, F. R.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, M. D. C.; LEMOS, R.A.A. **Doenças de ruminantes e equinos.** 2. ed. São Paulo: Varela, vol. 1, 426p. 2006.

31. CASSOLI, L.D.; MACHADO, P.F. Impacto da Instrução Normativa 51 na qualidade do leite. In: encontro de pesquisadores em mastites. **Anais...** Botucatu: FMVZ – UNESP, 2007, p.30-37.

32. CERQUEIRA, M.M.O.P.; SENA, M.J. Produção higiênica e fatores determinantes de qualidade do leite. **Ciência Veterinária nos Trópicos.** Recife, v. 1, n. 2, p. 115-134, 1998.

33. CHEMICAL LAND21. 2-BROMO-2-NITRO-1,3-PROPANEDIOL. Disponível em: <http://www.chemicalland21.com/arokorhi/specialtychem/perchem/BRONOPOL.htm>. Acesso em: 12 de nov. de 2011.

34. COENTRÃO, C.M.; SOUZA, G.M.; BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P.; LILENBAUM, W. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras.

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v. 60, n.2, p.283-288, 2008.

35. COLDEBELLA, A.; MACHADO, P. F.; DEMÉTRIO, C. G. B.; RIBEIRO JÚNIOR, P. J. ; MEYER, P. M.; CORASSIN, C. H.; CASSOLI, L. D. Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas confinadas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n.3, p. 623-634, 2004.

36. COSTA, E. O.; BENITES, N.R.; MELVILLE, P.A.; PARDO, R.B.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.17, p.156-8, 1995.

37. COSTA, E.O. Importância da mastite na produção leiteira do Brasil. **Revista de Educação Continuada do CMRV-SP**. São Paulo, v. 1, p.3-9, 1998.

38. COSTA, C. N. Estimativa de parâmetros genéticos, fenotípicos e ambientes para as produções de leite no dia do controle e em 305 dias de lactação de vacas da raça Gir. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 5, p. 1953-1963, 2002.

39. COSTA, E. O. Programa nacional de melhoria da qualidade do leite (PNMQL). **Revista Napgama**, São Paulo, v.8,n.2,p.18-21, 2005.

40. COSTA, E. O.; SANTOS, F. G. B.; MÁRMORE, C.; ARCARO, J. R. P.; PERES, A. A. C.; RAIÁ, R. B. Influência da intensidade da mastite subclínica por microrganismo do Gênero *Staphylococcus*, estimada por escores de CMT e CCS, na composição do leite: gordura, proteína e lactose. **Revista Napgama, São Paulo**, v.9, p13-18, 2006.

41. COSTA, G. M. **Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais**. 2008. 123 p. Tese (doutorado) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

42. COSTA, A. C. **Mastite subclínica: patógenos isolados e respectiva sensibilidade antimicrobiana, variação da contagem de células somáticas e fatores de risco**. 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Goiás. Goiânia.

43. CUNHA, R.P.L.; MOLINA, L.R.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J.; FERREIRA, P.M.; GENTILINI, M.B. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 60, n. 1, p. 19-24, 2008.

44. DIAS, R.V.C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. **Acta Veterinária Brasília**. v.1, n.1, p.23-27, 2007.

45. DOGAN, B.; KLAESSIG, S.; RISHNIW, M. Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 116, p. 27-282, 2006.

46. DONATELE, D.M.; MOTTA, O.V.; FOLLY, M.M. Perfil antimicrobiano de linhagens de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva na mastite subclínica de vacas leiteiras nas regiões norte e noroeste do Estado do Rio de Janeiro. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, v. 5, n. 2, p. 3-6, 2002.
47. DUARTE, R.S.; MIRANDA, O.P.; BELLEI, B.C. et al. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolated recovered from milk of dairy cows in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 9, p. 4214-4222, 2004.
48. DUARTE, C. A. B. **Detecção e quantificação do vírus da hepatite C através de RT-PCR em Tempo real** [online]. 2006. 47f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/1884/6246/1/56418%20CESAR%20AUGUSTO%20BARROS%20DUARTE%20TESE%20MESTRADO%20BIOLOGIA%20CELULAR.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2012.
49. DUQUE, P. V. T.; BORGES, K. E.; PICCININ, A. Mastite bovina: descrição da doença e seus impactos na economia brasileira. **Anais ...São Paulo**, 2005.
50. ELIAS, A.O.; VICTORIA, C.; DA SILVA, A.V.; LANGONI, H. Características físico-químicas e contagem de células somáticas de leite proveniente de vacas naturalmente infectadas por *Streptococcus* spp. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**. v. 8, n. 2, p. 165-170, 2005.
51. EMBRAPA. Sistema de Criação de bovinos de leite para a região sudoeste do Rio Grande do Sul. 2008. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/BovinoLeiteRegiaoSudoesteRioGrandeSul/manejo.htm>. Acesso em: 02 de jan. 2012.
52. ESSLEMONT, D.; KOSSAIBATI, M. Mastitis: how to get out of the dark ages. **Vet. J.** 164:85-86. 2002.
53. ERSKINE, R.J.; WAGNER, S.; DEGRAVES, F.J. Mastitis therapy and pharmacology. **Veterinary Clinical Food Animal Practice**, v.19, n. 1, p. 109-138, 2003.
54. EUZÉBY, J. List of News names and new combinations previously effectively, but not validly, published. Validation list n° 132. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.60, p.469-472, 2010. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>. Acesso em 02 nov.2011.
55. FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1315-1320, 2004.

56. FAGUNDES, H. **Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* O157:H7 em rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo**, 2007. 101f. Tese (doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.
57. FAO. **ProdSTAT**. 2010. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/573/default.aspx>. Acesso em: 25 jan. 2011.
58. FERNANDES, D. Diagnóstico laboratorial em mastites bovinas: sua real importância e aplicação prática. **Atualização técnica 33, Divisão Agropecuária Pfizer**, 2006. [On line]. Disponível em: http://www.pfizersaudeanimal.com.br/bov_atualizacoes15.asp. Acesso em: 28 de dez. 2010.
59. FERNANDES, M.C.; RIBEIRO, M.G.; SILVEIRA, A.K.; SALERNO, T.; LARA, G.H.B.; LISTONI, F.J.P. Surto de mastite bovina causada por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.3, p.745-748, 2009. Botucatu, SP.
60. FERREIRA, L. M.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, E.; ZAFALON, L. F.; SOUZA, V. Variabilidade fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados em casos de mastite subclínica bovina. **Ciência Rural**. v. 36, p. 1228-1234, 2006.
61. FILIPPSSEN, L. F.; BITTENCOURT, D. R.; MENOSSO, V. A. Classificação de *Staphylococcus* coagulase negativos isolados de mastite subclínica bovina. In: XX Congresso Brasileiro de Microbiologia, 24 a 28 de outubro de 1999. **Anais...**,p.149, Foz do Iguaçu, PR
62. FITZGERALD, J.R.; MEANEY, W.J.; HARTIGAN, P.J. et al. Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered cows. **Epidemiology and Infection**, v. 119, p. 261- 269, 1997.
63. FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**, São Paulo: Lemos, 2000. 175p.
64. FOX, L. K.; GAY, J.L. Contagious mastitis. **Vet. Clin. N. Amer. Food Animal Practice**, 9(3): 475-87. 1993.
65. FREITAS, A. F. Parâmetros genéticos para produções de leite e gordura nas três primeiras lactações de vacas holandesas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 3, p. 709- 713, 2001.
66. FUENTE, L.F.; PRIMITIVO, F.S.; FUERTES, J.A. Daily and between-milking variations and repeatabilities in milik yield, somatic cell count, fat and protein of dairy ewes. **Small Ruminant Research**, v. 24, n.2, p.133-139, 1997
67. GALTON, D. M.; ADKINSON, R. W.; THOMAS, C. V. et al. Effects of premilking udder preparation on environmental bacterial contamination of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 65, p.1540, 1982.

68. GANDRA, E.A. **Multiplex PCR para Detecção de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em Leite UHT Artificialmente Contaminado.** Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pelotas, Brasil. 69 p. 2006.
69. GARINO Jr, F. **Avaliação da sensibilidade “in vitro” de sorogrupos de *Escherichia coli* de casos de mastite bovina e pesquisa da produção de lactamases e detecção de múltipla-resistência.** 2004. 115f. Tese doutorado (Microbiologia). Instituto de Ciências Biomédicas- Universidade de São Paulo.
70. GIANOLA, D., HERINGSTAD, B., KLEMETSDAL, G., CHANG, Y. M. **Longitudinal analysis of clinical mastitis at different stages of lactation in Norwegian cattle.** *Livest. Prod. Sci.* 88:251-261. 2004.
71. GILLESPIE, B. E.; OLIVER, S. P. Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction. **Journal Dairy Science**, v.88, p.3510-3518. 2005.
72. GIRAUDO, J.A. Conceptos basicos sobre inmunologia de la glandula mamaria y utilización de vacunas contra mastitis. In: VERÍSSIMO, C.J, AMARAL, J.B. **2º Encontro de pesquisadores em mastite bovina do Estado de São Paulo.** São Paulo: Instituto de Zootecnia, 1996. p. 73-86.
73. GONÇALVES, D. **Caracterização molecular de isolados de *staphylococcus aureus* e produção de marcadores genéticos para diagnóstico de mastite em bovinos leiteiros.** Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de tecnologia, Curitiba, 2006.
74. GONZALEZ, H. L.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M. E. R.; GOMES J. F.; STUMPF JR., W.; SILVA, M. A. Avaliação da qualidade do leite na bacia leiteira de Pelotas, RS. Efeito dos meses do ano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 1531 – 1543, 2004.
75. GRECELLÉ, C.B.Z. **Manejo da ordenha para melhoria da qualidade do leite.** 2008. [On line]. Disponível em: <http://www.fefaro.com.br/noticia081125-1.php>. Acesso em: 28 de dezembro de 2010.
76. GRUET, P.; MAINCENT, P.; BERTHELOT, X. et al. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. **Advanced Drugs Delivery Reviews**, v. 50, p. 245-259, 2001.
77. GUIMARÃES, F. F. **Perfil de sensibilidade microbiana, pesquisa de gene Meca de resistência à meticilina e detecção molecular de genes codificadores de enterotoxinas, em espécies de estafilococos coagulase positiva e negativa, isolados de mastites bovinas.** Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista. Botucatu-SP. 2011.

78. HALE, H.H.; HELMBOLTD, C.F.; PLASTRIDGE, W.N.; STULA, E.F. **Bovine mastitis caused by a mycoplasma species**. Cornell. Vet. 52:582-591. 1962.
79. HARMON, R. J. Fatores que afetam a contagem de células somáticas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE A QUALIDADE DO LEITE, 1998, Curitiba. Anais... Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1998. p. 7-17
80. HARMON, R. J.; LANGLOIS, B.E. Mastitis due to coagulase negative Staphylococcus species. Agri-Practice v.10, p.29-32, 1989.
81. HARMON, R.J.; CLARK, T.; RAMESH, T. Environmental pathogen numbers in pasture and bedding of dairy cattle. **Journal of Dairy Sciences**, v. 75, p. 256, 1992.
82. HARMON, R. J. Fatores que afetam a contagem de células somáticas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE. **Anais**. Curitiba: UFPR, 1998. p. 7-15.
83. HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia veterinária**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 446p.
84. HILLERTON, J.E.; SHEARN, M.F.S; TEVERSON, R.M. Effect of pre-milking teat dipping on clinical mastitis in dairy farms in England. **Journal of Dairy Research**, v. 60, p. 31-41, 1993
85. HILLERTON, J.E. Controle da mastite bovina. In: Brito, J.R.F., Bressan, M. **Controle integrado da mastite bovina**. Tradução de José Renaldi F. de Brito. Juiz de Fora: Embrapa-CNPGL, p.10-52, 1996.
86. HILLERTON, J.E.; BERRY, E.A. The management and treatment of environmental streptococcal mastitis. **Veterinary Clinical Food Animal Practice**, v.19, n. 1, p. 157-169, 2003.
87. HOGAN, J.S.; SMITH, K.L. Occurrence of clinical and subclinical environmental streptococcal mastitis. In: **proceedings of the symposium on udder health management for environmental streptococci**, 1997. National Mastitis Council Inc, p.59-75, 1997.
88. HOGAN, J.S.; SMITH, K.L. Coliform mastitis. **Veterinary Research**, v. 34, p. 507-519, 2003.
89. HORTET, P. et al. Reduction in milk yield associated with somatic cell counts up to 600.000 cells/ml in French Holsteins cows without clinical mastitis. **Livestock Production Science**, v. 61, n. 1, p. 33-42, 1999.
90. JANOSI, S.; RATZ, F.; SZIGETI, G. et al. Review of the microbiological, pathological and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. **Veterinary Quartely**, v. 23, n. 2, p. 58-61, 2001

91. JONES, G. M. Relationships between cell counts and milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 8, p. 1823-1831, 1984
92. KEEFE, G. P. Streptococcus agalactiae mastitis: a review. **Canadian Veterinary Journal**, v.38, p.429-437. 1997.
93. KLOSS, W.E.; SCHLEIFER, K.H. Genus *Staphylococcus* Rosenbach 1994. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. *et al.* (Eds.). **Bergey's manual® of determinative bacteriology**. Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1984, v. 2, section 12, p. 1013 – 1035.
94. KWON, N.H, KIM, S. H, PARK, K.T, BAE, W.K, KIM, J.Y, LIM, J.Y, AHN J.S, LYOO, K.S, KIM, J.M, JUNG, W.K, NOH, K.M, BOHACH, G.A, PARK, Y.H. Application of extended single-reaction multiplex polymerase chain reaction for toxin typing of *Staphylococcus aureus* isolates in South Korea. **Int. J. Food Microbiol.** 97: 137-145.2004.
95. LAFFRANCHI, A. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas ao longo dos primeiros quatro meses de lactação. **Ciência rural**, v.31,n.6,p.1027-1031, 2001.
96. LANGE, C.; CARDOSO, M.; PIANTA, C. Epidemiological characterization of *S. aureus* isolated from bovine mastitis in Porto Alegre, Brasil. **Revista de Microbiologia**, v.28, p.215-219, 1997.
97. LANGENEGGER, J.; VIANI, M.C.R.; BAHIA, M.G. Efeito do agente etiológico da mastite subclínica sobre a produção de leite. **Pesq. Vet. Bras.** v.1, p. 47-52, 1981.
98. LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; PINTO, M.P.; LISTONI, F.J.P. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.43, p. 507-15, 1991.
99. LANGONI, H. Agentes emergentes na etiologia da mastite bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 19, n. 6, p. 238-240, 1997.
100. LANGONI, H.; MENDONÇA, A.O.; DEVELLEY, A. Avaliação do uso da associação da bromexina com gentamicina no tratamento da mastite subclínica bovina. **Napgama**, n.1, p.4-7, 2000.
101. LANGONI, H. Mastite bovina. Conceitos e Fundamentos. In: encontro de pesquisadores em mastites, 4, 2007, Botucatu. **Anais...** Botucatu: FMVZ – UNESP, 2007. p. 8-17.
102. LANGLOIS, B. E.; COX, J. S.; HEMKEN, R. H. Milking Vacuum influencing indicators of udder health. **Journal of Dairy Science**, v.64, p.1837-1842. 1981.
103. LARANJA, L.F., Princípios básicos sobre funcionamento, dimensionamento, manutenção e avaliação de sistemas de ordenha. **2º**

Encontro de pesquisadores em mastite bovina do estado de São Paulo, 23 a 24 de maio 1996. Nova Odessa, São Paulo SP, p. 11 – 28.

104. LARANJA, L. F.; MACHADO, P.F. Avaliação da efetividade de um programa de controle de mastite bovina em fazendas produtoras de leite B do Estado de São Paulo. *Sci. Agric. Piracicaba*, 51(2): 569:577, set/dez. 1994. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/sa/v5n3/31.pdf>. Acesso em 27 de out. 2011.

105. LOPES, E.O.; VIANA, A.K.M. Controle da mastite em rebanhos leiteiros-um enfoque técnico da iniciativa privada. In: WORKSHOP sobre programa de controle integrado da mastite bovina, 1996, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: EMBRAPA, 1996.

106. LUCHEIS, S. B. **A importância dos estafilococos coagulase negativos na mastite bovina subclínica e resistência antimicrobiana.** Disponível em: http://www.aptaregional.sp.gov.br/images_editor/artigos/IMPORTANCIA_ESTA_FILOCOCCOS_COAGULASE_NEG_MASTITE_BOVINA.pdf. Acesso em 16 jan. 2011.

107. LUND-OLESEN, T.; DUFVA, M.; DAHL, J. A.; COLLAS, P.; HANSEN, M. F. Sensitive on-chip quantitative real-time PCR performed on an adaptable and robust platform . **Biomedical Microdevices**, v. 10, pp 769-776, 2008.

108. MACHADO, T. R. O.; CORREA, M. G.; MARIN, J. M. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci isolated from mastitis cattle in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.1, p. 278-282, 2008.

109. MACKAY, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and Infectious**, Oxford, [online], v.10, n.3, p.190-212, mar. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15008940>. Acesso em: 28 nov. 2010.

110. MALEK, C.B.; SANTOS, M.V. Estratégias para redução de células somáticas no leite. In: Requisitos de qualidade na bovinocultura leiteira. **Anais...** 6 ed. Piracicaba-SP: FEALQ, 2008, v.1, p.65-80.

111. MARQUES, D. C. **Criação de Bovinos**. 7.ed. rev., atual e ampl., Belo Horizonte, CVP Consultoria Veterinária e Publicações, 2003.

112. MARTINS, R.P.; SILVA, J.A.G.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; ALMEIDA FILHO, E. S. **Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT.** v.11, n.1, 2010. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/5085/8093>. Acesso em 18 dez. 2011

113. MATIOLI, G.P.; PINTO, S.S.M.; BARBANO, D.M. Effect of milk from cows with mastitis on the production of fresh minas cheese. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, Juiz de Fora, v.34, n.38-54, 2000.
114. MEDEIROS, M.I.M.; SOUZA, L.C. Associação de agentes patogênicos isolados em análise microbiológica da água, com a presença de mastite clínica ou subclínica, em vacas de propriedades leiteiras da região de Cerqueira César – SP. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 33, n. 2, p. 580-585, 2009.
115. MENDONÇA, L. C. A importância do ordenhador para a produção de leite de qualidade. 2009. **Panorama do leite on line**. Ano 3, n. 31, junho de 2009. Disponível em:
<http://www.cileite.com.br/panorama/qualidade31.html>. Acesso: 01 de dezembro de 2011.
116. MERL, K.; ABDULMAWJOOD, A.; LÄMMLER, C. Determination of epidemiological relationships of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. *FEMS Microbiology Letters*, v. 226, n. 1, p. 87-92, 2003.
117. METTIFOGO, E.; NASCIMENTO, E.R.; MULLER, E.E.; NASCIMENTO, M.G.F.; FREITAS, J.C. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis*. **Revista Brasileira Medicina Veterinária**. 18:22-25. 1996.
118. McKELLAR, Q. A. Intramammary treatment of mastitis in cows. **In Practice**, November, p. 244-249, 1991.
119. McEWENS, S.A.; FEDORKA-CRAY, P.J. Antimicrobial use and resistance in animals. **Clin Infect Dis**. Chicago, v.34,n.3, p.93-106, 2002.
120. MILLER, R. H. The relationship of milk somatic cell count to milk yields for Holstein heifers after first calving. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 3, p. 728-733, 1993.
121. MOREIRA, P.C.; SILVA, L.A.F.; MESQUITA, A.J. Etiologia da mastite clínica na bacia leiteira de Goiânia. **Anais Esc. Agronomia e Veterinária**. 27(2): 69-74, 1997.
122. MORETTI, A.; PASQUALI, P.; MENCARONI, G. Relationship between cell counts in bovine milk and the presence of mastitis pathogens (yeasts and bacteria). **Journal of Veterinary Medicine**, v. 45, p. 129-132, 1998.
123. MOTA, R. A.; CASTRO, F. J. C. DE; OLIVEIRA, A. A. et al. Avaliação in vitro da sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de mastite subclínica de cabras do estado de Pernambuco-Brasil. In: Encontro de Pesquisadores em Mamites, 3, 1999, Botucatu. Anais... Botucatu: FMVZ-UNESP, 1999. p.140.
124. MOTA, R. A.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; SILVA, D. R.; SILVEIRA, N. S. S.; GOMES, S. M.; SILVA, L. B. G.; CUNHA, A. P. RABELO, S. S. A.; SILVA, K. P. C.; BARBOSA, M. A. G. Etiologia da mastite subclínica em bovinos da bacia leiteira do estado de Pernambuco. **Rev Napgama**, v.7, n.1,p.10-13, 2004.

125. MULLER, E. E. Profilaxia e controle da mastite. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 3, 1999, Botucatu. **Anais....** Botucatu: FMVZ UNESP, 1999. p.57-61.
126. MULLER, E.E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. In: SANTOS, G. T.; JOBIM, C. C.; DAMASCENO, J. C. Sul-Leite Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, 2002, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM/CCA/DZO-NUPEL, 2002.
127. MYLLYS, V.; HOKANEN-BUZALSKI, T.; HUOVINEN, P. Association of changes in the bacterial ecology of bovine mastitis with changes in the use of milking machines and antibacterial drugs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 35, n. 4, p. 363- 369, 1994.
128. NADER FILHO, A.N.; ITURRINO, R.P.S.; ROSSI-JUNIOR, O.D. Mastite subclínica em rebanhos produtores de leite gordura 3,2%. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 36, n. 5, p. 549-58, 1984.
129. NADER FILHO, A. R. P. SCHOCKEN-ITURRINO, O.D. ROSSI JÚNIOR; CEMBRANELLI, E.M. Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Ribeirão Preto. **Pesq. Vet. Bras.** 5(2): 53-6. 1985
130. NADER FILHO, A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; AMARAL, L.A.; Sensibilidade dos *Staphylococcus aureus* isolados em casos de mastite bovina, a ação de antibióticos e quimioterápicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.38, n.4, p.581-588, 1986.
131. NADER FILHO, A. L. M.; FERREIRA, L. A. A.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; OLIVEIRA, R.P. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.74, n.1, p.1-4, jan./mar., 2007.
132. NASCIMENTO, G. G. F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M. S. P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Rev. Nutr.** v.14, n.2, p.119-124, 2001.
133. NERO, L. A.; MATTOS, M .R.; BELOTI, V. et al. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: Perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciência Tecnologia Alimentos**. v.25, n.1, p.191-195, 2005.
134. NEWBY, D. T.; HADFIELD, T. L.; ROBERTO, F. F. Real-time PCR detection of *Brucella abortus*: a comparative study of SYBR green I, 5'-exonuclease, and hybridization probe assays **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, [online], v. 69, n. 8, p. 4753–4759, ago. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12902268>. Acesso em: 11 jul. 2010.
135. NICOLAU, E.S.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L.A. Influência da mastite subclínica estafilocócica sobre a produção láctea dos quartos afetados. **ARS Veterinária**, v.8, n.2, p.118-124, 1992.

136. NICKERSON, S.C. **Mastitis control in replacement heifers**. 2008. [Online]. Disponível em: <http://www.wcds.afns.ualberta.ca/Proceedings/1996/wcd96389.htm>. Acesso: 10 de set. de 2011.
137. NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em Tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, [online], v. 33, p. 10-13, 2004. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio33/pcr.pdf>. Acesso em 15 jan. 2012.
138. OLIVEIRA, C. M.C.; SOUSA, M.G.S.; SILVA, N.S.; MENDONÇA, C.L.; SILVEIRA, J.A.S.; OAIGEN, R.P.; ANDRADE, S.J.T.; BARBOSA, J.D. Prevalência e etiologia da mastite bovina em rebanhos leiteiros na região de Rondon do Pará, estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 31(2): 104-110, fev. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v31n2/02.pdf>. Acesso em: 24 de set. 2011.
139. OWENS, W.E.; NICKERSON, S.C. Antibiotic levels in milk and mammary tissues during various treatment regimens for bovine mastitis. **Agri-Practice**, v. 10, n. 1, p. 10-15, 1989.
140. PACKER, R.A. Bovine mastitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 170, n. 10, p. 1.166, 1977.
141. PARDO, P. E.; METTIFOGO, E.; MULLER, E. E. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas no período pós-parto. **Pesquisa veterinária brasileira**. V.18,n.3/4,p.115-118, 1998.
142. PEELER, E.J.; GREEN, M.J.; FITZPATRICK, J.L. Risk factors associated with clinical mastitis in low somatic cell count British dairy herds. **Journal of Dairy Science**. v. 83, p. 2464-2472, 2000.
143. PEREIRA, R.O. Epidemiologia Molecular da Mastite causada por *Staphylococcus aureus*. 2001.52p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista –Jaboticabal, 2001.
144. PICOLI, T.; MEZZOMO, R.; RIBEIRO, M. E. R.; DORNELLES,T.; MARQUES, L. T.; ZANI, J.L. **Tratamento de mastite bovina causada por *Streptococcus agalactiae* com utilização de própolis**. 2010. XVIII CIC XI ENPOS I mostra científica. Disponível em: http://www.ufpel.tche.br/cic/2009/cd/pdf/CA/CA_01715.pdf. Acesso em: 31 de mar. 2011.
145. PINTO, M. R. R.; LADEIRA, S.; CARDOSO, C. M. Mastite bovina: ocorrência de agentes etiológicos e resistência a antimicrobianos. In: Encontro de Pesquisadores em Mamites, 3, 1999, Botucatu. Anais... Botucatu: FMVZ-UNESP, 1999. p. 160

146. PRODUÇÃO, consumo e exportação de leite. Projeções do agronegócio, Brasil 2009/10 a 2019/20 - Assessoria de Gestão Estratégica. Ministério da Agricultura pecuária e Abastecimento, 2010. 48p. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/images/MAPA/arquivos_portal/Projecoes_Agronegocio.pdf. Acesso em: 28 agost. 2011.
147. PHILPOT, N. W.; NICKERSON, S. C. **Vencendo a luta contra a mastite**. Piracicaba: Westfalia Surge/Westfalia Landtechnik do Brasil, 2002. 192p.
148. PRETTO, L. G. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis* em rebanhos leiteiros. In: **Pesq. Vet. Bras.** 21(4):143-145, out./dez, 2001.
149. PRESTES, D.S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam – uma revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**. v. 9, n. 1, p. 118-132. 2002.
150. QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1 ed. Porto Alegre: ArtMed, 2005. 512p.
151. RADOSTITS, O. M.; BLOOD, D.C.; GAY, C.C. **Clínica Veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.1737 p. 2007.
152. RANJAN, R.; SWARUP, D.; PATRA, R.C. Bovine protothecal mastitis: a review. **Perspectives in Agriculture, Veterinary Sciences, Nutrition and Natural Resources**, v. 1, n. 17, p. 1-7, 2006.
153. RAPINI, L. S; TEIXEIRA, J. P.; MARTINS, N. E. et al. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.56, n.1, p.130-133, 2004.
154. REIS, S.R.; SILVA, N.; BRESCIA, M.V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 55, n. 6, p. 651-658, 2003. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v55n6/19370.pdf>> Acesso 05 de Nov. 2011
155. RIBAS, R. M. Infecções hospitalares em pacientes idosos: aspectos epidemiológicos clássicos e moleculares associados a *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* spp. Uberlândia. Universidade Federal de Uberlândia, 2003. 99p.
156. RIBEIRO, R.M.; COSTA, E.O; LEITE, D. S. Fator necrosante citotóxico em *Escherichia coli* isolada de mastite clínica bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.54 n.6 Belo Horizonte. 2002
157. RIBEIRO, M.G.; COSTA, E.O.; LEITE, D.S. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 724-731, 2006.

158. RIBEIRO JÚNIOR, E.; SILVA, M. H.; VIEGAS, S. A. A.; RAMALHO, E. J.; RIBEIRO, M. D.; OLIVEIRA, F. C. S. California Mastitis Test (CMT) e whiteside como métodos de diagnóstico indireto da mastite subclínica. **Ver. Bras. Saúde Prod. An.**, v.9, n.4, p.680-686, out/dez, 2008.
159. RIBEIRO, M. G.; GERALDO, J.S.; LANGONI, H.; LARA, G.H.B.; SIQUEIRA, A.K.; SALERNO, T.; FERNANDES, M.C. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. *Pesq. Vet. Bras.* 29(1):52-58, janeiro 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v29n1/a08v29n1.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2011.
160. RIBEIRO, M. T.; CARVALHO, A.C. Higiene dos equipamentos de ordenha e tanques de resfriamento, visando à qualidade do leite. In: MARTINS, C.E.; ALENCAR, C.A.B.; BRESSAN, M. **Sustentabilidade na Produção de Leite no Leste Mineiro**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. p.175-179.
161. RIBEIRO, M.G.; GERALDO, J.S.; LANGONI, H.; LARA, G.H.G.B.; SIQUEIRA, A.K.; SALERNO, T.; FERNANDES, M.C. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. **Pesq. Vet. Bras.** 29(1):52-58, janeiro 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v29n1.pdf>. Acesso em: 15 jan 2012.
162. ROSA, M. S.; COSTA, M. J. R. P.; SANT'ANNA, A.C.; MADUREIRA, A.P. **Boas Práticas de Manejo – Ordenha**. Jaboticabal: Funep, 2009. 43 p.
163. RODRIGUEZ-ZAZ, S.L.; GIANOLA, D.; SHOOK, G.E. Evaluation of models for somatic cell score lactation patterns in Holsteins. **Livestock Production Science**, v. 67, p. 19-30, 2000.
164. RUPP, R.; BEAUDEAU, F.; BOICHARD, D. **Relationship between milk somatic-cell counts in the first lactation and clinical mastitis occurrence in the second lactation of French Holstein cows**. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 46, p. 99-111. 2000.
165. SACHSE, K.; PFUTZNER, H.; HOTZEL, H.; DEMUTH, B.; HELLER, M.; BERTHOLD, E. Comparison of various diagnostic methods for the detection of *Mycoplasma bovis*. **Rev. Sci. Tech. Off. Epiz.** 12:571-580. 1993.
166. SANTOS, M. V. Contagem de células somáticas e qualidade do leite e derivados. In: 2 encontro anual do conselho brasileiro de qualidade do leite e 5 simpósio internacional sobre produção intensiva de leite, 30 de agosto a 1 de setembro de 2001. **Anais...** p.115-127, Belo Horizonte, MG.
167. SANTOS, M. V. Efeito da mastite sobre a qualidade do leite e derivados lácteos. 2 Congresso Panamericano de Qualidade do Leite e Controle de Mastite, Ribeirão Preto, **Anais**, p.179-188, 2002.
168. SANTOS, M. V. Impacto econômico da mastite bovina. **A hora veterinária**. Ano 22 N^o 131, jan/ fev p 31- 34, 2003.

169. SANTOS, D.; BERGMANN, G. P. Influência da temperatura durante o transporte sobre a qualidade microbiológica do leite cru. Parte II – Coliformes totais. **Revista Higiene Alimentar**. v.17, n.110, p.80 – 84, 2003.
170. SANTOS, M. V.; OLIVEIRA, C. A. F.; LIMA, Y. V. R.; BOTARO, B. G. Remoção de células somáticas pela microfiltração não afeta a composição e a proteólise do leite. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 5, p. 1486 – 1493, 2006.
171. SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para o controle da mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole, 2007. 314 p.
172. SANTOS, E. B.; DANTAS, G.S.; SANTOS, H.B.; DINIZ, M.F.F.M.; SAMPAIO, F. C. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. Ver. Bras. Farmacognosia, 19(1B): Jan/mar. 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X2009000200024&script=sci_arttext. Acesso em 02 de dez. 2011.
173. SCHÄELLIBAUM, M. Efeitos de altas contagens de células somáticas sobre a produção e qualidade de queijos. In: Simpósio Internacional sobre Qualidade do Leite, 2, 2000, Curitiba. **Anais...** Curitiba: CIETEP/FIEP, 2000. p.21-26.
174. SCHLEGELOVÁ, J.; DENDIS, M.; BENEDÍK, J. *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows and humans on farms differ in coagulase genotype. **Veterinary Microbiology**, v. 92, p. 327-334, 2003.
175. SEARS, P.H.; McCARTHY, K.K. Management and treatment of staphylococcal mastitis. **Veterinary Clinical of North American Food Animal Practice**, .v. 19, n. 1, p. 171-185, 2003.
176. SILVA, N.; CARDOSO, H.F.T.; SENA, M. J.; CARMO, L.S. Produção de toxina-1 da síndrome do choque tóxico por *Staphylococcus aureus* isolados do leite bovino em Minas Gerais. **Revista Napgama**, v.2, n.5, p.12-14, 1999.
177. SILVA, N. Doença da glândula mamária. In: MARQUES, D.C. **Criação de bovinos**. 7. Ed. Belo Horizonte: CVP – consultoria veterinária e publicações. 2003. P.435-451.
178. SILVA, M. A. **Utilização de PCR multiplex para o diagnóstico etiológico da mastite bovina**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, escola de veterinária. 2008. 32p.
179. SILVEIRA-FILHO, V. M.; SANTOS, F. G. B.; FREITAS, M. L. F. Molecular epidemiologic study of *Staphylococcus aureus* associated to bovine mastitis from Pernambuco state, Brazil. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, v. 8, n. 1, p. 12-17, 2005.

180. SILVEIRA-FILHO, V. M. **Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina no Estado de Pernambuco**, 2007. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Recife, 2007.
181. SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M.; LEITE, M. O. **Determinação dos teores de gordura, extrato seco total e extrato seco desengordurado do leite: Tecnologia de leite e produtos derivados**. Belo Horizonte: UFMG, 2004.
182. SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F.; MOREIRA, E. C.; BRITO, M. A. V. P.; BASTOS, R. R. Fatores de risco para alta contagem de células somáticas do leite do tanque em rebanhos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 57, n. 2, p. 251 - 260, 2005.
183. SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F.; MOREIRA, E. C.; BRITO, M. A. V. P.; SILVA, M. V. G. B. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 61, n.5, p. 1015-1020, 2009.
184. SOUZA, L. F. L. **Atividade antimicrobiana de extratos de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) frente a bactérias relacionadas à mastite bovina**. 2011. 62f. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília.
185. TAPONEN, S.; KOORT, J.; BJÖRKROTH, J.; SALONIEMI, H.; PYÖRÄLÄ, S. Bovine intramammary infections caused by coagulase-negative Staphylococci may persist throughout lactation according to amplified fragment length polymorphism based analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 3301-3307, 2007.
186. TAPONEN, S.; SALMIKIVI, L.; SIMOJOKI, H.; KOSKINEN, M.T.; PYORALA, S. Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. **Journal of Dairy Science** V. 92 N. 6, 2009.
187. TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CHRISTINE, L. **Microbiologia**, 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 827p.
188. TOZZETTI, D. S.; BATAIER, M. B. N.; ALMEIDA, L. R. **Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas – revisão de literatura**. Revista científica eletrônica de medicina veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça. Garça: FAEF. Ano VI – Número 10 – Janeiro de 2008 – Periódicos Semestral.
189. TRONCARELLI, M. Z.; LANGONI, H. **Padronização da técnica de multiplex PCR para a detecção de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli* em amostras de leite bovino, obtidas de tanques de expansão**. Tese (doutorado). Universidade Estadual Paulista. Botucatu-SP. 2011.

190. USDA. **United States Department of Agriculture**. 2008. Disponível em: http://www.milkpoint.com.br/estatisticas/Producao_htm. Acesso: 21 jan. 2011
191. VASCONCELOS, C. G. C. Influência da estação do ano, do estágio de lactação e da hora da ordenha sobre o número de células somáticas do leite bovino. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**. V.49,n.4,p.483-491, 1997.
192. VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T.A. et al. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v. 92, p. 179-185, 2003.
193. VEIGA, V. M. O. Controle da mamite dos bovinos. In: **Manejo sanitário, prevenção e controle de parasitoses e mamite em rebanhos leiteiros**. Juiz de Fora: Embrapa- CNPGL, 1993 (Capítulo de Circular Técnica).
194. VEIGA, V. M. O. **Diagnóstico da mastite bovina**. Juiz de Fora: Embrapa CNPGL. 1998. 24p.
195. VEIGA, V. M. O. **Imersão dos tetos pré e pós-ordenha: a importância da desinfecção dos tetos**. Disponível em: <http://marcosveiga.net/biblioteca/livros/7%20Pre%20e%20Pos%20dipping3.pdf>. Acesso em 15 de jan. 2011.
196. VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J. R. Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers 2002. **Trends in Microbiology**, v.10, pp15–21, 2002.
197. VIANNA, L.C.; MÜLLER, E.E.; FREITAS, J.C.; PRETTO-GIORDANO, L.G.; SALVADOR, R.; DIAS, J.A. Etiologia das infecções intramamárias e contagem de células somáticas em vacas primíparas. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 23, n. 1, p. 3-8, 2002.
198. VOLTOLINI T. V. Influência dos estádios de lactação sobre a contagem de células somáticas do leite de vacas da raça holandesa e identificação de patógenos causadores de mastite no rebanho. **Acta Scientiarum**. Maringá, v. 23, n. 4, p. 961-966, 2001.
199. WALSTRA, P.; JENNESS, R.; BADINGS, H. T. **Química y física lactológica**. Zaragoza: Acribia, 1987. 423p
200. WATTIAUX, M. A. **Development The Babcock Institute for International Dairy Research**. Disponível em http://babcock.cals.wisc.edu/downloads/de_html/ch_23_pt.html. Acesso 30 dez. 2010.
201. WATTS, J.L. Etiological agents of bovine mastitis. **Vet. Microbiol.**, v.16, p. 41-66, 2000.

202. WILSON , D.J.; CASE, K. L.; GONZALEZ, R. N. Bacteriologic cure rates for bovine mastitis cases with no treatment or with eight different antibiotics. **National mastitis council annual meeting proceedings**, v.37, p.273-274. 1998.
203. YANG, C. H.; CROWLEY, D. E.; BORNEMAN, J.; KEEN, N. T. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. p. 3889–3894. 2001
204. ZAFALON, L.F.; LANGONI, H.; BENVENUTTO, F.; CASTELANI, L.; BROCCOLO, C.R. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. **Veterinária e Zootecnia**. v. 15, n. 1, p. 56-65, 2008.
205. ZECCONI, A.; MORONI, P. CASULA, R. Influence of some individual and management factors associated with drying off on bacteriological cure rate of bovine mammary gland. **Milchwissenschaft**, v. 50, n. 8, p. 433-435, 1995.

ANEXOS

Laboratório de Microbiologia	DADOS CADASTRAIS - PRODUTOR				
DADOS CADASTRAIS					
Nome completo (produtor):					
Roteiro:					
Nome da Fazenda:					
Endereço da Fazenda:					
Município:		UF:		CEP:	
CARACTERÍSTICAS DA PROPRIEDADE					
Produção diária:		Número de vacas em lactação:		Média de litros/vaca	
Tipo de ordenha:	<input type="checkbox"/> Manual		<input type="checkbox"/> Balde ao pé		<input type="checkbox"/> Circuito fechado
Quais as categorias de matrizes que manifestam mais mastite clínica?		<input type="checkbox"/> Vacas secas <input type="checkbox"/> Vacas recém-paridas <input type="checkbox"/> Novilhas primeira cria <input type="checkbox"/> Vacas de alta produção <input type="checkbox"/> Sempre as mesmas vacas			
Qual o tipo de local/cama onde as vacas deitam?		<input type="checkbox"/> Concreto <input type="checkbox"/> Solo <input type="checkbox"/> Areia <input type="checkbox"/> Palha <input type="checkbox"/> Serragem <input type="checkbox"/> Raspas <input type="checkbox"/> Outro: _____			
A cama/local é limpa (sem esterco) e seca?		<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não			
Características da água de Abastecimento: _____					
ROTINA DE ORDENHA					
Os tetos são lavados com água?		<input type="checkbox"/> Sim		<input type="checkbox"/> Não	
Os tetos são secos com toalha de papel individual?		<input type="checkbox"/> Sim		<input type="checkbox"/> Não	
Os tetos são secados com toalhas de panos?		<input type="checkbox"/> Sim		<input type="checkbox"/> Não	
Realiza teste da caneca de fundo preto?		<input type="checkbox"/> Sim		<input type="checkbox"/> Não	
Realiza pré-dipping e pós-		<input type="checkbox"/> Sim		<input type="checkbox"/> Não	

dipping?	<input type="checkbox"/> Fabricado na Fazenda <input type="checkbox"/> Comercial Qual princípio ativo?_____ Qual conc.?_____	
Faz linha de ordenha?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Faz avaliação periódica da CCS individual de vacas?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não Com qual frequência?_____
Realiza análises de cultura e antibiograma do leite de vacas com mastite clínica?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Realiza teste periódico de CMT ou CCS de tanque?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não Com qual frequência?_____
Frequência de ordenha	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3
Intervalos de tempo entre as Ordenhas?	1 ^a - 2 ^a ; 2 ^a - 3 ^a ; 3 ^a - 4 ^a ____ : ____ hs / ____ : ____ hs / ____ : ____ hs;	
Qual o tempo médio de ordenha?	_____	
Local de ordenha	<input type="checkbox"/> Curral	<input type="checkbox"/> Sala de ordenha
Fornece alimento durante a ordenha?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
HIGIENE E LIMPEZA DO EQUIPAMENTO		
Limpeza adequada do equipamento de ordenha?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Utiliza sanitizante antes das ordenhas?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não Qual princípio ativo?_____
Equipamento de pré-dipping	<input type="checkbox"/> Com retorno	<input type="checkbox"/> Sem retorno
Espera o tempo de ação do pré-dipping (30 seg)?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
TRATAMENTOS		
Realiza terapia da vaca seca?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não Duração do período seco:_____ Princípio ativo utilizado:_____
Realiza segregação e descarte de animais cronicamente infectados?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Tratamento de casos clínicos de mastite?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não Princípio ativo utilizado:_____
Descarta o leite de vacas em tratamento com mastite clínica?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Descarta o leite de vacas em tratamento com medicamentos?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não

COLETA DE DADOS	
Registra os dados relativos à incidência de mastite clínica? (qual matriz manifestou a afecção e por quanto tempo)?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Registra os dados relativos à produção, à evolução do rebanho ou à movimentação entre as categorias animais?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não

CPA CENTRO PESQUISA EM ALIMENTOS		SOLICITAÇÃO DE ANÁLISES: - CULTURA E ANTIBIOGRAMA EM AMOSTRAS DE LEITE - PESQUISA DE MICRORGANISMOS CAUSADORES DE MASTITE - PCR - 12						LMB / LBM Laboratório de Microbiologia / Laboratório de Biologia Molecular			CÓD: FOR LMB-01 EDIÇÃO/REVISÃO: 00.00 DATA: JAN.2010 PÁGINA 1/1						
Nome completo (produtor):		RG:		CPF:													
Telefone:		Nome p/ contato:		E-mail para envio de resultados:													
Nome da Fazenda:								Município:		UF:		CEP:					
Endereço da Fazenda:								Município:		UF:		CEP:					
Endereço p/cobrança:								Município:		UF:		CEP:					
	Tipo de Análise	Condições da Amostra (T)	Nº Brincos	Nome do animal	Prod. diária	Tipo Coletado	Data de coleta	Substrato antib.	Data de análise de CCS	Resultado CCS	Data de análise de CMT	Escore de CMT	Data de última parte	Ordem de parte	Suspeita de Mastite:	*T°C Receb.	*Nº Laudo
1	<input type="checkbox"/> Cult. e Antib. <input type="checkbox"/> Id. Micro.-PCR	<input type="checkbox"/> AMB <input type="checkbox"/> REF <input type="checkbox"/> CONG.				<input type="checkbox"/> AE <input type="checkbox"/> AD <input type="checkbox"/> PE <input type="checkbox"/> PD <input type="checkbox"/> Pool		<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não				<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5		<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> Clínica <input type="checkbox"/> Subclínica		
2	<input type="checkbox"/> Cult. e Antib. <input type="checkbox"/> Id. Micro.-PCR	<input type="checkbox"/> AMB <input type="checkbox"/> REF <input type="checkbox"/> CONG.				<input type="checkbox"/> AE <input type="checkbox"/> AD <input type="checkbox"/> PE <input type="checkbox"/> PD <input type="checkbox"/> Pool		<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não				<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5		<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> Clínica <input type="checkbox"/> Subclínica		
3	<input type="checkbox"/> Cult. e Antib. <input type="checkbox"/> Id. Micro.-PCR	<input type="checkbox"/> AMB <input type="checkbox"/> REF <input type="checkbox"/> CONG.				<input type="checkbox"/> AE <input type="checkbox"/> AD <input type="checkbox"/> PE <input type="checkbox"/> PD <input type="checkbox"/> Pool		<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não				<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5		<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> Clínica <input type="checkbox"/> Subclínica		
4	<input type="checkbox"/> Cult. e Antib. <input type="checkbox"/> Id. Micro.-PCR	<input type="checkbox"/> AMB <input type="checkbox"/> REF <input type="checkbox"/> CONG.				<input type="checkbox"/> AE <input type="checkbox"/> AD <input type="checkbox"/> PE <input type="checkbox"/> PD <input type="checkbox"/> Pool		<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não				<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5		<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> Clínica <input type="checkbox"/> Subclínica		
5	<input type="checkbox"/> Cult. e Antib. <input type="checkbox"/> Id. Micro.-PCR	<input type="checkbox"/> AMB <input type="checkbox"/> REF <input type="checkbox"/> CONG.				<input type="checkbox"/> AE <input type="checkbox"/> AD <input type="checkbox"/> PE <input type="checkbox"/> PD <input type="checkbox"/> Pool		<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não				<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5		<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> Clínica <input type="checkbox"/> Subclínica		
6	<input type="checkbox"/> Cult. e Antib. <input type="checkbox"/> Id. Micro.-PCR	<input type="checkbox"/> AMB <input type="checkbox"/> REF <input type="checkbox"/> CONG.				<input type="checkbox"/> AE <input type="checkbox"/> AD <input type="checkbox"/> PE <input type="checkbox"/> PD <input type="checkbox"/> Pool		<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não				<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5		<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> Clínica <input type="checkbox"/> Subclínica		
7	<input type="checkbox"/> Cult. e Antib. <input type="checkbox"/> Id. Micro.-PCR	<input type="checkbox"/> AMB <input type="checkbox"/> REF <input type="checkbox"/> CONG.				<input type="checkbox"/> AE <input type="checkbox"/> AD <input type="checkbox"/> PE <input type="checkbox"/> PD <input type="checkbox"/> Pool		<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não				<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5		<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> Clínica <input type="checkbox"/> Subclínica		
8	<input type="checkbox"/> Cult. e Antib. <input type="checkbox"/> Id. Micro.-PCR	<input type="checkbox"/> AMB <input type="checkbox"/> REF <input type="checkbox"/> CONG.				<input type="checkbox"/> AE <input type="checkbox"/> AD <input type="checkbox"/> PE <input type="checkbox"/> PD <input type="checkbox"/> Pool		<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não				<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5		<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> Clínica <input type="checkbox"/> Subclínica		
9	<input type="checkbox"/> Cult. e Antib. <input type="checkbox"/> Id. Micro.-PCR	<input type="checkbox"/> AMB <input type="checkbox"/> REF <input type="checkbox"/> CONG.				<input type="checkbox"/> AE <input type="checkbox"/> AD <input type="checkbox"/> PE <input type="checkbox"/> PD <input type="checkbox"/> Pool		<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não				<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5		<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> Clínica <input type="checkbox"/> Subclínica		
10	<input type="checkbox"/> Cult. e Antib. <input type="checkbox"/> Id. Micro.-PCR	<input type="checkbox"/> AMB <input type="checkbox"/> REF <input type="checkbox"/> CONG.				<input type="checkbox"/> AE <input type="checkbox"/> AD <input type="checkbox"/> PE <input type="checkbox"/> PD <input type="checkbox"/> Pool		<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não				<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5		<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> Clínica <input type="checkbox"/> Subclínica		
11	<input type="checkbox"/> Cult. e Antib. <input type="checkbox"/> Id. Micro.-PCR	<input type="checkbox"/> AMB <input type="checkbox"/> REF <input type="checkbox"/> CONG.				<input type="checkbox"/> AE <input type="checkbox"/> AD <input type="checkbox"/> PE <input type="checkbox"/> PD <input type="checkbox"/> Pool		<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não				<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5		<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> Clínica <input type="checkbox"/> Subclínica		
12	<input type="checkbox"/> Cult. e Antib. <input type="checkbox"/> Id. Micro.-PCR	<input type="checkbox"/> AMB <input type="checkbox"/> REF <input type="checkbox"/> CONG.				<input type="checkbox"/> AE <input type="checkbox"/> AD <input type="checkbox"/> PE <input type="checkbox"/> PD <input type="checkbox"/> Pool		<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não				<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5		<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> Clínica <input type="checkbox"/> Subclínica		
13	<input type="checkbox"/> Cult. e Antib. <input type="checkbox"/> Id. Micro.-PCR	<input type="checkbox"/> AMB <input type="checkbox"/> REF <input type="checkbox"/> CONG.				<input type="checkbox"/> AE <input type="checkbox"/> AD <input type="checkbox"/> PE <input type="checkbox"/> PD <input type="checkbox"/> Pool		<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não				<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5		<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> Clínica <input type="checkbox"/> Subclínica		
14	<input type="checkbox"/> Cult. e Antib. <input type="checkbox"/> Id. Micro.-PCR	<input type="checkbox"/> AMB <input type="checkbox"/> REF <input type="checkbox"/> CONG.				<input type="checkbox"/> AE <input type="checkbox"/> AD <input type="checkbox"/> PE <input type="checkbox"/> PD <input type="checkbox"/> Pool		<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não				<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5		<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> Clínica <input type="checkbox"/> Subclínica		
15	<input type="checkbox"/> Cult. e Antib. <input type="checkbox"/> Id. Micro.-PCR	<input type="checkbox"/> AMB <input type="checkbox"/> REF <input type="checkbox"/> CONG.				<input type="checkbox"/> AE <input type="checkbox"/> AD <input type="checkbox"/> PE <input type="checkbox"/> PD <input type="checkbox"/> Pool		<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não				<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5		<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> Clínica <input type="checkbox"/> Subclínica		
16	<input type="checkbox"/> Cult. e Antib. <input type="checkbox"/> Id. Micro.-PCR	<input type="checkbox"/> AMB <input type="checkbox"/> REF <input type="checkbox"/> CONG.				<input type="checkbox"/> AE <input type="checkbox"/> AD <input type="checkbox"/> PE <input type="checkbox"/> PD <input type="checkbox"/> Pool		<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não				<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5		<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> 6	<input type="checkbox"/> Clínica <input type="checkbox"/> Subclínica		
OS CAMPOS MARCADOS COM (*) SÃO DE PREENCHIMENTO EXCLUSIVO DO CPA																	
*Responsável pelo recebimento: _____		*Solicitação nº _____		*Cadastramento: _____/_____/_____		*Responsável pelo cadastro: _____		*Entrada na seção: _____/_____/_____									
*Início das análises: _____		*Término das análises: _____		*Resultados: _____/_____/_____		Assinatura do solicitante: _____											

Obs.: - Amostras sem identificação e sem a ficha de solicitação preenchida serão descartadas.
 - Será cobrado metade do valor da análise para as amostras que, de conformidade com a metodologia empregada, não resultarem em formação de colônias microbianas;
 - Receberemos amostras de segunda à sexta das 08:00 às 16:00 horas, e prazo de entrega dos resultados é de 5 dias úteis e estes são enviados via e-mail.
 - Por favor, observe sempre na "box" de seu e-mail, pois alguns provedores podem classificar a mensagem enviada como um spam (vírus) e, automaticamente, descartá-la.

FIGURA 8. Modelo de solicitação de análises
 Fonte: Centro de Pesquisa em Alimentos (2011)