

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA

**Prova da Redutase Adaptada na Avaliação da
Susceptibilidade Antimicrobiana e Eficácia do Tratamento de
Vacas com Mastite Clínica**

Diego Medeiros Lima

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

PROVA DA REDUTASE ADAPTADA NA AVALIAÇÃO DA
SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA E EFICÁCIA DO
TRATAMENTO DE VACAS COM MASTITE CLÍNICA

DIEGO MEDEIROS LIMA

Sob a Orientação da Professora

Rita de Cássia Campbell Machado Botteon

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor pelo
Programa de Pós-graduação em Medicina
Veterinária, Área de Concentração,
Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ

Dezembro de 2014

636.2

L732p

T

Lima, Diego Medeiros, 1982-

Prova da redutase adaptada na avaliação da susceptibilidade antimicrobiana e eficácia do tratamento de vacas com mastite clínica / Diego Medeiros Lima - 2014.

104 f.: il.

Orientador: Rita de Cássia Campbell Machado Botteon.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Patologia e Ciências Clínicas.

Bibliografia: f. 71-101.

1. Mastite - Teses. 2. Bovino - Doenças - Diagnóstico - Teses. 3. Bovino - Doenças - Tratamento - Teses. 4. Microbiologia veterinária - Teses. I. Botteon, Rita de Cássia Campbell Machado, 1964-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Patologia e Ciências Clínicas. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

DIEGO MEDEIROS LIMA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor** pelo Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração, Ciências Clínicas.

TESE APROVADA EM: ____ / ____ / ____.

Rita de Cássia Campbell Machado Botteon - Prof.^a Dr.^a UFRRJ
(Orientadora)

Alice Maria Melville Paiva Della Libera - Prof.^a Dr.^a USP

José Carlos de Figueiredo Pantoja - Prof. Dr. UNESP

Maiara Garcia Blagitz - Prof.^a Dr.^a UNOESC

Miliane Moreira de Souza Soares - Prof.^a Dr.^a UFRRJ

À minha família, minha esposa e meus amigos
pela confiança e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas

Seria impossível listar todos aqueles que contribuíram para realização desse trabalho. Meu muito obrigado por toda a ajuda, colaboração, exemplos e ensinamentos transmitidos.

Às orientadoras

Agradeço especialmente à Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Campbell Machado Botteon. Fica aqui minha imensa gratidão a essa mente brilhante que me conduziu durante os últimos 8 anos.

Serei infinitamente grato pela sua ajuda, compreensão, paciência e amizade.

Agradeço também à Prof.^a Dr.^a Pamela L. Ruegg por me receber em seu laboratório e grupo de pesquisa, pelo incentivo e por acreditar na minha capacidade.

Aos produtores

Agradeço aos produtores pela colaboração, confiança e disponibilização dos animais para a realização deste trabalho.

Às vacas

Vocês foram a peça fundamental desse trabalho.

Às instituições

Meu muito obrigado à UFRRJ, PESAGRO, FAPERJ, CAPES e Universidade de Wisconsin / Madison nos EUA.

RESUMO

LIMA, Diego Medeiros. **Prova da redutase adaptada na avaliação da susceptibilidade antimicrobiana e eficácia do tratamento de vacas com mastite clínica.** 2014. 118 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Neste estudo objetivou-se determinar a associação entre os resultados da susceptibilidade antimicrobiana *in vitro*, pelo teste de disco difusão em ágar (TDD) e prova da redutase adaptada (PRA), de patógenos oriundos de vacas com mastite clínica (MC) e resultados de tratamento. Foram coletadas 227 amostras de leite, de quartos mamários de vacas com mastite clínica no momento do diagnóstico da MC (PRÉ) e após o fim do tratamento (PÓS). As vacas foram tratadas com antimicrobianos intramamários comerciais contendo: gentamicina (150 mg), cefoperazone (250 mg), espiramicina (200 mg) com neomicina (200 mg), cefalexina (100 mg) com neomicina (100 mg), cloxacilina (200 mg) com ampicilina (75 mg) ou cefquinoma (89 mg), segundo a frequência indicada pelos fabricantes. Dois protocolos de tratamento foram realizados: protocolo 1 (P1), duração de 3 dias, com os resultados avaliados 4 dias após o fim do tratamento; protocolo 2 (P2), tratamento diário, no máximo por 9 dias, até um dia após o desaparecimento dos sinais clínicos, com os resultados avaliados 14 dias após o fim do tratamento. A susceptibilidade antimicrobiana das amostras PRÉ foi testada pela PRA e dos agentes isolados, pelo TDD. A cura clínica (CC) foi definida quando o quarto mamário não apresentou sinais da MC, entre o fim do tratamento e o momento da coleta da amostra PÓS. A cura bacteriológica (CB) foi definida para o quarto mamário cuja amostra PÓS resultou em ausência de crescimento microbiano. A taxa de CC, no P1, foi maior para casos da MC causados por patógenos sensíveis (81%) quando comparados com casos causados por patógenos resistentes (30%), avaliados pela PRA. Não houve diferença significativa entre as taxas de CC para casos da MC causados por patógenos sensíveis ou resistentes, quando avaliados pelo TDD no P1 ou pela PRA no P2. Uma maior taxa de CB foi obtida para casos da MC causados por patógenos sensíveis (67%) quando comparados com casos causados por patógenos resistentes (0%), avaliados pela PRA no P2. As taxas de CB não foram significativamente diferentes para casos da MC causados por patógenos sensíveis ou resistentes, avaliados pelo TDD no P1 ou pela PRA no P1. A PRA apresentou acurácia e sensibilidade semelhantes ao TDD no prognóstico da CC e CB, entretanto apresentou aproximadamente o dobro da especificidade do TDD em prever os resultados de tratamento. A simplicidade do método e a rápida obtenção dos resultados foram vantagens importantes da utilização da PRA sobre o TDD. Apesar da necessidade de mais estudos, a utilização da PRA na orientação do tratamento contra MC pode ser recomendada.

Palavras-chave: mastite, susceptibilidade antimicrobiana, prova da redutase, tratamento.

ABSTRACT

LIMA, Diego Medeiros. **Adapted reductase test for determining antimicrobial susceptibility and treatment outcomes in cows with clinical mastitis**. 2014. 118 p. Thesis (PhD in Veterinary Medicine, Clinical Science). Institute of Veterinary, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

The objectives of the present study were to determine the association between results of *in vitro* antimicrobial susceptibility testing, by means of disk diffusion test (DDT) and adapted methylene blue reductase test (ART), of pathogens isolated from cows with clinical mastitis (CM) and treatment outcomes. Milk samples (n = 227) were collected from the affected quarters of cows at the onset of CM (PRE) and after the end of treatment (POST), according to performed protocol. Cows were treated using an intramammary product containing: gentamicin (150 mg), cefoperazone (250 mg), spiramycin (200 mg) and neomycin (200 mg), cefalexin (100 mg) and neomycin (100 mg), cloxacillin (200 mg) and ampicillin (75 mg), or cefquinome (89 mg), with frequency of treatment according to the manufacturer's instructions. Two treatment protocols were performed: protocol 1 (P1), infusion for 3 days and results assessed 4 days after the end of treatment; protocol 2 (P2), daily infusion up to 9 days and results assessed 14 days after the end of treatment. PRE samples were tested for antimicrobial susceptibility by means of ART and bacterial isolates from PRE samples by means of DDT. Clinical cure was defined as absence of symptoms of CM, from any moment between the last infusion and the day POST samples was collected. Bacteriological cure was defined as absence of pathogens in the POST sample. Using P1, CC rate was greater for cases caused by susceptible isolates (81%) as compared with cases caused by resistant isolates (30%), tested by means of ART. CC rates were not significantly different for cases caused by susceptible or resistant bacteria, neither when tested by means of DDT using P1, nor of ART using P2. BC rate was greater for cases caused by susceptible isolates (67%) as compared with cases caused by resistant isolates (0%), tested by means of ART using P2. BC rates were not significantly different for cases caused by susceptible or resistant bacteria, neither when tested by means of DDT using P1, nor of ART using P1. Although ART showed accuracy and sensitivity similar to DDT as predictors of CC and BC, its specificity was approximately 2 times greater than DDT specificity to predict the treatment outcomes. The simplicity of the method and the quick way the results were obtained were important advantages of PRA over ADD. In spite of the need of further research, the use of PRA to guide intramammary mastitis treatment may be recommended based on results of this study.

Key words: mastitis, antimicrobial susceptibility testing, treatment, methylene blue reductase test

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 01: Interpretação de resultados obtidos ao California Mastitis Test (CMT) e estimativa da contagem de células somáticas (CCS) no leite.	14
Quadro 02: Interpretação dos resultados da prova da redutase pelo tempo de redução do azul de metileno em função da carga microbiana.	26
Quadro 03: Relação entre o número de bactérias presentes no leite e o tempo de redução do azul de metileno.	26
Quadro 04: Critério utilizado para definir a susceptibilidade antimicrobiana, pelo teste de disco difusão em ágar, para um antimicrobiano intramamário cuja fórmula é composta por dois antimicrobianos.	38
Quadro 05: Critério utilizado para definir a susceptibilidade antimicrobiana geral, pelo teste de disco difusão em ágar, de bactérias oriundas de cultura mista a antimicrobianos intramamários comerciais.	39
Quadro 06: Esquema simplificado do cálculo da validade de um teste em relação ao teste padrão ouro. Adaptado de Gordis (2004).	40

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 01: Contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) do leite do tanque de expansão de cinco propriedades no município de Resende, RJ em 2012 e 2014	43
Tabela 02: Diagnóstico microbiológico de amostras de leite provenientes de 204 quartos mamários de vacas com mastite clínica em cinco rebanhos leiteiros no Município de Resende-Rio de Janeiro	46
Tabela 03: Agentes microbianos isolados de amostras de leite provenientes de 138 quartos mamários de vacas com mastite clínica em cinco rebanhos leiteiros no Município de Resende-Rio de Janeiro, segundo origem do agente e resultado na cultura microbiológica	47
Tabela 04: Diagnóstico microbiológico de amostras de leite provenientes de 21 quartos mamários de vacas com mastite clínica, em que se obteve isolamento de dois agentes etiológicos (infecção/cultura mista), em cinco rebanhos leiteiros no Município de Resende-RJ	48
Tabela 05: Sensibilidade antimicrobiana <i>in vitro</i> (teste de disco difusão em ágar) de bactérias Gram positivas e Gram negativas isoladas de amostras de leite de vacas com mastite clínica em cinco rebanhos bovinos no município de Resende, RJ	51
Tabela 06: Sensibilidade antimicrobiana, pelo teste de disco difusão em ágar, de bactérias isoladas de amostras de leite de vacas com mastite clínica	51
Tabela 07: Sensibilidade antimicrobiana de amostras de leite de vacas com mastite clínica, avaliada pela prova da redutase adaptada (PRA) para seis antimicrobianos intramamários, em relação ao resultado na cultura microbiológica	54
Tabela 08: Sensibilidade antimicrobiana de amostras de leite de vacas com mastite clínica, avaliada pela prova da redutase adaptada (PRA) e teste de disco difusão em ágar (TDD) para diferentes antimicrobianos	55
Tabela 09: Cura clínica em vacas com mastite clínica, tratadas por três dias consecutivos e avaliadas quatro dias após o fim do tratamento (Protocolo 1) ou até um dia após o desaparecimento dos sinais clínicos e avaliadas 14 dias após o fim do tratamento (Protocolo 2), em função da caracterização do agente isolado em cultura pura de amostras de leite coletadas antes do início do tratamento	61
Tabela 10: Cura bacteriológica em vacas com mastite clínica, tratadas por três dias consecutivos e avaliadas quatro dias após o fim do tratamento (Protocolo 1) ou até um dia após o desaparecimento dos sinais clínicos e avaliadas 14 dias após o fim do tratamento (Protocolo 2), em função da caracterização do agente isolado em cultura pura de amostras de leite coletadas antes do início do tratamento	63

Tabela 11: Cura clínica em vacas com mastite clínica, tratadas por três dias consecutivos (Protocolo 1) ou até um dia após o desaparecimento dos sinais clínicos (Protocolo 2), em função da susceptibilidade antimicrobiana obtida a partir da amostra de leite coletada antes do início do tratamento, pela prova da redutase adaptada (PRA) e teste de disco difusão em ágar (TDD)	65
Tabela 12: Testes para determinar a validade da susceptibilidade antimicrobiana, avaliada através da prova da redutase adaptada (PRA) e teste de disco difusão em ágar (TDD), em relação a cura clínica obtida após tratamento antimicrobiano intramamário de casos de mastite clínica	65
Tabela 13: Cura bacteriológica em vacas com mastite clínica, tratadas por três dias consecutivos (Protocolo 1) ou até um dia após o desaparecimento dos sinais clínicos (Protocolo 2), em função da susceptibilidade antimicrobiana obtida a partir da amostra de leite coletada antes do início do tratamento, pela prova da redutase adaptada (PRA) e teste de disco difusão em ágar (TDD)	67
Tabela 14: Testes para determinar a validade da susceptibilidade antimicrobiana, avaliada através da prova da redutase adaptada (PRA) e teste de disco difusão em ágar (TDD), em relação a cura bacteriológica obtida após tratamento antimicrobiano intramamário de casos de mastite clínica	68

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Teste da caneca de fundo escuro para diagnóstico da mastite clínica em que se evidencia alterações macroscópicas do leite.	30
Figura 2: Coleta de amostra de leite de um quarto mamário com mastite clínica.	31
Figura 3: Teste de disco difusão em ágar para uma cultura de <i>Streptococcus agalactiae</i> . Foram observadas (A) sensibilidade para enrofloxacina (5 µg) e (B) resistência para tetraciclina (30 µg).	34
Figura 4: Material utilizado na realização da prova da redutase adaptada. (A) Luvas de látex e gaze embebida em álcool 70%, (B) tubo tipo Falcon contendo 40 mL de leite, (C) pipeta automática e ponteiras, (D) tubos para coleta de sangue, estéril e capacidade para 5 mL, (E) tubo tipo Falcon contendo solução de azul de metileno (0,02%), (F) tubo tipo Falcon para depósito de antimicrobiano intramamário e (G) tubo de antimicrobiano intramamário.	35
Figura 5: Prova da redutase adaptada no primeiro minuto após o início do teste. Observa-se que as amostras de leite no tubo controle (Co) e nos testes contendo gentamicina (A), cefoperazone (B), as associações espiramicina com neomicina (C), cefalexina com neomicina (D), e cloxacilina com ampicilina (E) apresentam-se com o corante na forma não reduzida.	36
Figura 6: Prova da redutase adaptada 8 horas após início do teste. A redução no tubo controle (Co) ocorreu em 5 horas, e nos tubos testes contendo as associações espiramicina com neomicina (C) e cefalexina com neomicina (D), em 7 horas (indicando sensibilidade intermediária). A redução do corante nos tubos testes contendo gentamicina (A), cefoperazone (B) e cloxacilina com ampicilina (E) não foi observada até o momento	36
Figura 7: Prova da redutase adaptada 3 horas após início do teste. O azul de metileno foi reduzido nos tubos testes contendo gentamicina (A), cefoperazone (B), espiramicina com neomicina (C), cefalexina com neomicina (D), e cloxacilina com ampicilina (E) no mesmo tempo em que a redução ocorreu no tubo controle (Co).	37

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus centígrados
AM	Azul de metileno
BHI	Caldo infusão de cérebro e coração
CBT	Contagem bacteriana total
CCS	Contagem de células somáticas
céls./mL	Células por mililitro
CMT	California Mastitis Test
ECN	Estafilococos coagulase negativa
IN	Instrução Normativa
IV	Instituto de Veterinária
Kg	Quilograma
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MC	Mastite clínica
MSC	Mastite subclínica
PRA	Prova da redutase adaptada
RJ	Rio de Janeiro
TDD	Teste de disco difusão em ágar
TRAM	Tempo de redução do azul de metileno
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Mastite	3
2.1.1 Importância.....	3
2.1.2 Definição e formas	4
2.1.3 Etiologia bacteriana.....	6
2.1.4 Diagnóstico.....	12
2.1.5 Tratamento	16
2.1.6 Controle e profilaxia.....	18
2.1.7 Principais antimicrobianos utilizados na terapia contra mastite bovina	19
2.2 Resistência Bacteriana	22
2.3 Prova da Redutase	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Local e Características das Propriedades.....	29
3.2 Coleta de Amostras de Leite do Tanque de Expansão	29
3.3 Coleta de Amostras de Leite de Quartos Mamários com Mastite Clínica.....	30
3.4 Protocolos de Tratamento	31
3.5 Isolamento e Identificação dos Patógenos.....	32
3.6 Susceptibilidade Antimicrobiana - Teste de Disco Difusão em Ágar	33
3.7 Susceptibilidade Antimicrobiana - Prova da Redutase Adaptada	34
3.8 Avaliação dos Resultados.....	37
3.9 Análises Estatísticas	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 Características da Produção.....	41
4.2 Características dos Casos da Mastite Clínica	44

4.3 Agentes isolados	45
4.4 Susceptibilidade Antimicrobiana - Teste de Disco Difusão em Ágar	50
4.5 Susceptibilidade Antimicrobiana – Prova da Redutase Adaptada.....	53
4.6 Características dos Protocolos de Tratamento	57
4.7 Cura Clínica	59
4.8 Cura Bacteriológica	61
4.9 Resultados de Tratamento de Acordo com a Susceptibilidade Antimicrobiana Avaliada através da PRA e TDD	64
5 CONCLUSÕES.....	70
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXO - Questionário Aplicado às Propriedades Leiteiras	103

1 INTRODUÇÃO

A mastite, definida como a inflamação da glândula mamária, é a doença economicamente mais importante em rebanhos leiteiros de todo o mundo. Caracteriza-se não somente pela redução da capacidade secretora da glândula mamária, mas também por alterações na composição e características físico-químicas do leite. O risco da veiculação de microrganismos patogênicos e/ou suas toxinas, e a possível presença de resíduos de antimicrobianos no leite devido ao tratamento, reforçam a importância da mastite em saúde pública.

O diagnóstico da mastite clínica (MC) é simples, em função das alterações macroscópicas que acarreta na glândula mamária e/ou no leite. Na mastite subclínica (MSC), a forma mais prevalente, não são observadas alterações no leite ou anormalidades na glândula mamária, sendo necessários testes auxiliares para o seu diagnóstico. O isolamento bacteriano é o teste padrão ouro para diagnóstico de mastite, que acompanhado do teste de susceptibilidade *in vitro* compõem umas das ferramentas fundamentais na orientação do tratamento, porém para muitos produtores tornam-se caros e demorados, sendo pouco realizados em rebanhos com grande número de animais infectados. Além disso, a relevância clínica dos testes de susceptibilidade *in vitro* tem sido questionada não só pelo alto custo dos exames e o tempo necessário para disponibilização dos resultados, mas também pela baixa associação entre os resultados nos testes e o sucesso no tratamento.

O leite, por sua riqueza em nutrientes, é um excelente meio para o crescimento de microrganismos e a multiplicação destes é rápida, se a temperatura for adequada. O crescimento de microrganismos no leite provoca o consumo de oxigênio e produção de substâncias redutoras. Através de uma substância indicadora, é possível avaliar a variação do potencial óxido-redutor. O azul de metileno (AM) é um corante catiônico usado como indicador desse potencial. Quando introduzido em um meio contendo bactérias, o AM age como aceptor de elétrons, é reduzido e torna-se incolor. A velocidade de redução do corante é proporcional à carga microbiana e atividade metabólica dos microrganismos.

A prova da redutase (PR) permite estimar, de forma simples e rápida, a qualidade bacteriológica do leite em função da taxa metabólica dos microrganismos que produzem substâncias redutoras. O resultado é dado em horas e não pelo número de bactérias, embora haja uma correlação entre o tempo de redução e o número de bactérias da amostra.

Pressupondo que antimicrobianos adicionados ao leite possam limitar ou impedir o crescimento das bactérias sensíveis, resultando assim, em maior tempo de redução do corante, foi proposta a adaptação da PR para avaliar a susceptibilidade *in vitro* de bactérias associadas à MC e MSC, obtendo-se uma alta concordância (88,2%) entre os resultados avaliados pela PRA e pelo antibiograma.

Com base nesses resultados, no presente estudo objetivou-se: 1) identificar os principais agentes etiológicos envolvidos, e o perfil de susceptibilidade antimicrobiana das bactérias isoladas de casos de MC em rebanhos leiteiros no Município de Resende – Rio de Janeiro; 2) avaliar a eficácia do tratamento da MC mediante associação entre os resultados de susceptibilidade antimicrobiana *in vitro*, avaliada pelo teste de disco difusão em ágar (TDD) e PRA, de patógenos oriundos de vacas com MC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mastite

2.1.1 Importância

A mastite considerada uma das doenças infecciosas mais frequentes em gado de leite é a principal causa do uso de antimicrobianos em vacas leiteiras adultas (POL; RUEGG, 2007a), apresentando implicações em saúde pública, devido à possibilidade da presença de resíduos desses antimicrobianos no leite (ALLISON, 1995).

As perdas na produção de leite atribuídas às mastites são elevadas e variam de acordo a intensidade do processo inflamatório, com a prevalência da doença no rebanho, com a patogenicidade dos agentes envolvidos e com o estágio de lactação (BRANT; FIGUEIREDO, 1994). Especialmente, quando uma porcentagem significativa do rebanho é acometida, as perdas de produção podem ser drásticas (REBHUN, 2000), com redução da produção em até 50%, além da redução na vida produtiva do animal (LADEIRA, 2007).

Estudos apontam diferentes valores para a prevalência da MC em rebanhos no Brasil: 7,4% em São Paulo (BUENO et al., 2002); 5,8% em Mato Grosso (MARTINS et al., 2010) e Pernambuco (SÁ et al., 2000); 4,6% no Pará (OLIVEIRA et al, 2011); 1,2% no Rio Grande do Sul (RIBEIRO et al., 2006). Os prejuízos estimados são de 2,8 bilhões de litros de leite/ano (FONSECA; SANTOS, 2000).

Impactos econômicos anuais de aproximadamente R\$ 73.000, 160.000, e 278.000 para propriedades apresentando médias anuais de 1, 7 e 15% de prevalência da doença, respectivamente, foram quantificados e analisados no Brasil. As diferenças foram resultantes do maior volume de leite descartado e aumento da quantidade de casos clínicos tratados, que aumentaram os gastos com mão-de-obra e medicamentos, além da redução da produção (LOPES et al., 2012). A possibilidade de recorrência da doença pós-tratamento, e descarte ou morte do animal são outros fatores que influenciam as perdas econômicas (PINZÓN-SÁNCHEZ; RUEGG, 2011).

A mastite, de qualquer forma, provoca a redução da capacidade secretora da glândula mamária e alterações na composição e características físico-químicas do leite (HARDING, 1995; TRONCO, 2003). Além disso, o risco de veiculação de microrganismos patogênicos

e/ou suas toxinas através do leite reforçam a importância das mastites e suas implicações em saúde pública (FORSYTHE, 2002).

A forma subclínica em geral é a mais prejudicial pela elevada prevalência nos rebanhos e por não ser evidenciada facilmente, havendo a necessidade de métodos específicos de diagnóstico (BRITO; BRITO, 1998a; MARTINS et al., 2010).

Durante a evolução da mastite há um influxo maior de células de defesa para a glândula mamária (NICKERSON, 1994). Estas células estão normalmente presentes no leite de úberes sadios em número reduzido (entre 50 e 200 mil céls./mL). Na dependência da severidade e extensão da infecção intramamária e, do tipo de microrganismo envolvido, as CCS podem variar de 200 a 5.000×10^3 céls./mL de leite (KITCHEN, 1981).

O aumento da CCS e as alterações na composição do leite estão diretamente relacionadas à superfície do tecido mamário afetado pela reação inflamatória. Portanto, existe uma correlação negativa entre a CCS e as concentrações de lactose, caseína e gordura no leite, e positiva entre CCS e proteínas séricas, soroalbuminas, imunoglobulinas, cloro e sódio (SCHALLIBAUM, 2001).

2.1.2 Definição e formas

O termo mastite refere-se à inflamação da glândula mamária, geralmente de caráter infeccioso. Caracteriza-se por alterações físicas e químicas no leite, e por alterações do tecido glandular (RADOSTITS et al., 2002), podendo ser classificada como clínica ou subclínica, segundo os sintomas apresentados, e como superaguda, aguda, subaguda ou crônica em decorrência da sua evolução (PHILPOT; NICKERSON, 2002).

A MC manifesta-se por sinais evidentes como edema, hipertermia, endurecimento e/ou hiperalgesia na glândula mamária, além da alteração das características do leite e pode ou não estar acompanhada de reações sistêmicas, como perda de apetite, apatia e às vezes, podendo evoluir para o óbito da vaca (ROSENBERGER, 1993). O leite pode estar aquoso, contendo grumos além de fibrina, soro, sangue e pus (FONSECA; SANTOS, 2000).

Após um caso de MC, a produção de leite sofre queda, sendo que as maiores perdas ocorrerem dentro das duas semanas seguintes e gradualmente se equilibra dentro de dois meses. No entanto, vacas que apresentam MC não conseguem recuperar o seu potencial de produção anterior (BAR et al., 2007).

A forma clínica também pode ser classificada de acordo com a severidade dos sinais clínicos como leve (apenas leite com aparência anormal), moderada (leite e quarto mamário com aparências anormais) ou severa (sinais sistêmicos da doença na vaca) (WENZ et al., 2001).

As formas superaguda e aguda manifestam-se por sinais locais de inflamação de aparecimento repentino, mudanças no aspecto do leite e diminuição da produção leiteira, além de sinais sistêmicos como aumento da temperatura retal, prostração e desidratação, podendo ocorrer choque e morte (DODD, 1983; MARQUES, 2003).

Na forma subaguda os sinais incluem poucas alterações no leite. O quarto afetado pode ficar levemente inflamado e sensível ao toque. Os casos de longa duração que podem se estabelecer em decorrência das formas clínicas ou pode iniciar-se com uma infecção subclínica caracterizam a mastite crônica (PHILPOT; NICKERSON, 2002).

Na forma subclínica não se observam alterações macroscópicas no leite e não há sinais visíveis de inflamação do úbere (CULLOR et al., 1994), sendo necessária a utilização de testes auxiliares para seu diagnóstico (MARGATHO et al., 1998). Fonseca e Santos (2000) destacaram como alterações na composição do leite decorrentes da mastite: o aumento da CCS, dos teores de cloreto, sódio e proteínas séricas e, diminuição dos teores de caseína, lactose e gordura.

Outra forma de classificação de grande interesse clínico e epidemiológico diz respeito aos locais onde os agentes estão, preferencialmente, localizados e podem ser isolados, a sua forma de transmissão e o tipo de infecção que provocam como: contagiosa e ambiental (PHILPOT; NICKERSON, 1991; BRITO; BRITO, 1998b; FONSECA; SANTOS, 2000).

A mastite contagiosa é causada por patógenos cujo principal habitat é a superfície da pele e tetos onde podem permanecer desde semanas a anos, sendo transferidos de um animal para outro principalmente através dos equipamentos de ordenha, das mãos dos ordenhadores e dos materiais utilizados na secagem dos tetos (PHILPOT; NICKERSON, 2002). Tem sido estudada a participação de moscas como agentes transmissores da mastite contagiosa (HACHEM, 2005).

A mastite contagiosa caracteriza-se por baixa incidência de casos clínicos, alta incidência de casos subclínicos, geralmente de longa duração ou crônica, apresentando alta CCS (FONSECA; SANTOS, 2000). Ribeiro et al. (2004) observaram na mastite contagiosa a prevalência de 97,1% de casos subclínicos frente a 2,9% de casos clínicos.

A mastite ambiental caracteriza-se pela alta incidência de casos clínicos, geralmente de curta duração e manifestação leve, causando consideráveis prejuízos econômicos ao sistema de produção, que dependendo da intensidade do quadro clínico pode resultar na morte da vaca (FONSECA; SANTOS, 2000; WENZ et al., 2001).

Diversos agentes que habitam preferencialmente o ambiente das vacas leiteiras e as mãos dos ordenhadores (BRITO; BRITO, 1998b) são importantes na epidemiologia da mastite ambiental. Os tetos são expostos à infecção principalmente no intervalo entre as ordenhas (PHILPOT; NICKERSON, 2002).

O confinamento predispõe a ocorrência da mastite ambiental quando há aumento de umidade e acúmulo de matéria orgânica (HACHEM, 2005). Visto que os patógenos estão disseminados por todo o ambiente da vaca, deduz-se que é praticamente impossível erradicar esse tipo de mastite do rebanho (SMITH; HOGAN, 1998) e todas as categorias de animais estão sob risco (PHILPOT; NICKERSON, 2002).

2.1.3 Etiologia bacteriana

A etiologia da mastite é complexa e a doença pode ser relacionada às causas alérgicas, fisiológicas, metabólicas e traumáticas, sendo mais comum a de origem infecciosa. Vários são os agentes infecciosos da mastite bovina, sendo citadas na literatura acima de 130 espécies de microrganismos envolvidos (RIBEIRO et al., 2003), incluindo bactérias, fungos, leveduras, algas e vírus (WATTS, 1998).

Apesar de diferentes agentes possíveis, no Brasil a etiologia bacteriana assume um lugar de destaque na epidemiologia do processo infeccioso, com predominância de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, estafilococos coagulase negativa (ECN), *Streptococcus dysgalactiae* e *Escherichia coli* (OLIVEIRA et al., 2009; MARTINS et al., 2010; LANGONI et al., 2011). O esfíncter do teto comumente é a porta de entrada dos agentes ao interior da glândula.

As principais bactérias causadoras de mastites possuem comportamentos distintos quanto ao habitat, forma de colonização do úbere, potencial de infecção e reações do hospedeiro (FERNANDES, 2006).

Mastites ocasionadas por *Staphylococcus* spp. têm sido relatadas em todo o mundo, sendo esse gênero dividido em estafilococos coagulase positiva e ECN, segundo sua habilidade em coagular o plasma (PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009).

No Brasil, o *S. aureus* destaca-se pela importância como um dos principais microrganismos causadores da MSC (MARTINS et al., 2010; LANGONI et al., 2011; MOTA et al., 2012). Esta espécie é conhecida por promover infecções de longa duração, com tendência a se tornarem crônicas, com baixa taxa de cura e chances de recorrência (WILSON et al., 1999; LAGO et al., 2011).

A capacidade de formar focos infecciosos encapsulados nas porções altas do úbere, evita a detecção da bactéria pelo sistema imune e impede o alcance do antimicrobiano. Além disso, a bactéria pode evadir-se da ação do antimicrobiano permanecendo no interior de neutrófilos, o que contribui para a baixa resposta aos tratamentos e habilidade de estabelecer infecções crônicas (BANNERMAN et al. 2004; PETERSSON-WOLFE et al., 2010). Além da alta prevalência nos rebanhos, o *S. aureus* apresenta resistência a diversos antibióticos (ZANETTE et al., 2010).

A relevância do *S. aureus* foi destacada pela longa duração da infecção causada por esta bactéria, podendo levar o curso da doença à cronicidade, de difícil tratamento, comprometimento da qualidade do leite e redução da produção de leite (BANDOCH; MELO, 2011).

Existe uma série de fatores que influenciam a taxa de cura para vacas infectadas por *S. aureus*. Em geral, o tratamento pode ser bem sucedido quando as infecções são de curta duração (menos de duas semanas) (OWENS et al., 1997), em vacas jovens e no início da lactação. Além disso, o uso da terapia intramamária prolongada foi associado ao aumento na taxa de cura (DELUYKER et al., 2001, RUEGG; ARAÚJO, 2002; BARKEMA et al., 2006).

Os ECN têm como habitat a pele do teto, podendo algumas espécies colonizar o canal do teto (BIGGS, 2009). *Staphylococcus epidermidis*, *S. chromogenes* e *S. simulans* são encontrados com alta frequência no leite (THORBERG, 2008). O isolamento de ECN em uma amostra de leite, nem sempre significa que estes sejam responsáveis pela infecção, podendo haver contaminação da amostra com microrganismos que se encontram na pele dos tetos e do úbere (BIGGS, 2009).

As infecções causadas pelos ECN são de baixa patogenicidade e geralmente desenvolvem pequeno aumento da CCS (BIGGS, 2009). São patógenos comuns em casos

clínicos e subclínicos (COSTA et al., 1995) e tanto a taxa de cura espontânea quanto a resposta ao tratamento intramamário apresentam respostas positivas (WILSON et al., 1999).

O gênero *Streptococcus* possui diversas espécies patogênicas causadoras da MC e subclínica em vacas (MEDEIROS; SOUZA, 2009, LANGONI et al., 2011; PINZÓN-SÁNCHEZ; RUEGG, 2011).

O *Streptococcus agalactiae* é a principal espécie envolvida em plantéis leiteiros em que não há um programa eficiente de controle de mastite e sanidade (HIRSH; ZEE, 2003).

A infecção por *S. agalactiae* frequentemente se apresenta na forma subclínica com baixa taxa de cura espontânea (WILSON et al., 1997) e altas CCS (FONSECA; MACHADO, 1994), além do elevado número de bactérias no leite (SANTOS; FONSECA, 2007).

A transmissão normalmente ocorre pela falta de higiene dos manipuladores, ambiente e equipamentos (RADOSTITS et al., 2002). *S. agalactiae* não sobrevive fora do úbere e de lesões nos tetos por mais de três semanas e podem ser isolados das mãos de ordenhadores até dez dias após a ordenha (FERNANDES, 2006). Vacas com mastite por *S. agalactiae* desempenham o papel de reservatório da bactéria no rebanho e a ordenha é considerada o momento de maior transmissão da bactéria.

Em uma comparação entre a eficácia do tratamento com antimicrobianos, vacas infectadas por *S. agalactiae*, apresentaram maior taxa de cura comparada com vacas infectadas por outros patógenos (WILSON et al., 1999). Assim, quando o diagnóstico é precoce são raros os casos de perda do quarto afetado, devido à boa resposta ao tratamento antimicrobiano intramamário durante a lactação (FONSECA, 1996).

Devido ao estreito habitat e a alta taxa de cura através do tratamento intramamário, o *S. agalactiae* é possível de ser erradicado do rebanho (SANTOS; FONSECA, 2007). O programa de controle é baseado em cultura microbiológica e tratamento intramamário de todos os quartos infectados. Vacas não responsivas devem ser separadas do rebanho ou descartadas. Em um estudo com 12 rebanhos positivos para *S. agalactiae*, após 30 dias de controle do patógeno, a prevalência média de infecção teve uma redução de 41,6% para 9,3% (ERSKINE; EBERHART, 1990).

Mycoplasma spp. até pouco tempo era considerado o agente contagioso menos comum em mastite bovina, no entanto, tem sido bastante isolado em fazendas de grandes dimensões no Estados Unidos, estando associado à aquisição de animais infectados e falhas no manejo de segregação e descarte dos animais infectados dentro do rebanho (LOMBARD et al., 2008).

No Brasil, a mastite por micoplasma foi identificada em rebanhos do Paraná e São Paulo em 5,8% dos animais com MC (PRETTO et al., 2001). As infecções podem se apresentar na forma clínica, subclínica (GONZÁLEZ, 2006) ou crônica e sem a presença de sinais clínicos (RADOSTITS et al., 2002), podendo afetar vacas de todas as idades e em qualquer fase da lactação estão susceptíveis à infecção (GONZÁLEZ; WILSON, 2003).

Pelo fato do *Mycoplasma* spp. não ser detectado em culturas microbiológicas de rotina, pode-se suspeitar desse agente quando a produção diminui bruscamente e as culturas microbiológicas de casos de mastites clínicas são negativas (LÉVESQUE, 2004). O tratamento é difícil uma vez que poucos antibióticos são eficazes (BLOWEY, 1999). Apesar de algumas vacas recuperarem a produção na lactação seguinte muitas permanecem como portadores assintomáticos (GONZÁLEZ; WILSON, 2003). Se o agente for detectado no leite do tanque todas as vacas do rebanho devem ser examinadas, sendo aconselhável o descarte das vacas infectadas de modo a erradicar este agente do rebanho (LÉVESQUE, 2004).

O *Corynebacterium bovis*, frequentemente isolado em casos de mastite, é um agente contagioso de severidade moderada (LÉVESQUE, 2004) e tem como habitat, o canal do teto (BIGGS, 2009). É um dos agentes mais prevalentes nos casos de infecção subclínica (HUXLEY et al., 2003), sendo associado ao significativo aumento na CCS, e também citado como um dos principais microrganismos associados a MC no Brasil (MARTINS et al., 2010). Além disso, o *C. bovis* pode ter algum efeito de proteção contra outras bactérias (BLAGITZ et al, 2013).

No ágar sangue, as colônias de *C. bovis* apresentam-se pequenas (pulverulentas) e geralmente crescendo em 48 horas. Por isso, quando existe um crescimento significativo de outros agentes na mesma placa, facilmente esta bactéria pode não ser observada (BIGGS, 2009).

O aumento na prevalência de infecções intramamárias por *C. bovis* em uma propriedade tem sido considerado como um indicativo da ausência ou ineficiência da antissepsia dos tetos após a ordenha (HALTIA et al., 2006). Medidas preventivas, como uma eficiente desinfecção dos tetos e o correto tratamento das vacas no período seco, normalmente são suficientes para controlar infecção por este agente (LÉVESQUE, 2004).

As infecções causadas por estreptococos não agalactiae têm natureza variada devido às distintas características dos agentes pertencentes a esse grupo. Essas bactérias são definidas como estreptococos ambientais, sendo os *S. uberis*, *S. bovis* e *S. dysgalactiae* isolados mais

frequentemente de quartos mamários com mastite (MEDEIROS; SOUZA, 2009, LANGONI et al., 2011). Também são isolados frequentemente de lesões da pele do úbere, podendo também ser menos incidentes na pele sadia, sendo, geralmente, isolados do ambiente em que as vacas se encontram (ZADOKS et al., 2005; ABUREEMA et al., 2014). Podem sobreviver fora da glândula mamária, em ordenhadeiras mal higienizadas e pelos dos animais. A transmissão é principalmente de origem ambiental, porém em alguns casos, é possível a transmissão vaca-vaca ou através de uma fonte ambiental comum (ABUREEMA et al., 2014).

Diferentes linhagens de *S. uberis* apresentam não somente padrão epidemiológico ambiental, como também padrão contagioso. O *S. dysgalactiae* também exhibe padrões alternados sobre a fonte de infecção (SANTOS; FONSECA, 2007).

A taxa de cura espontânea para MC causada por estreptococos ambientais (geralmente *S. uberis* e *S. dysgalactiae*) pode ultrapassar 50%, mas recidivas podem ocorrer se as vacas não receberem a terapia com antibiótico apropriado (MORIN et al., 1998). Estudos recentes apresentaram taxa de cura bacteriológica entre 49 e 61% dos casos clínicos tratados (MILNE et al., 2005; PINZÓN-SÁNCHEZ; RUEGG, 2011).

Aproximadamente 50% das infecções causadas por estreptococos ambientais são iniciadas durante o período de vaca seca (TODHUNTER et al., 1995) e seu isolamento indica falha no processo de ordenha, seja ela manual ou mecânica (GONÇALVES, 2006). Por isso, a atenção para as possíveis fontes ambientais de infecção, boa higiene de ordenha e tratamento intramamário adequando permanecem como importantes medidas para o controle da transmissão dos estreptococos ambientais (ABUREEMA et al., 2014).

Os principais coliformes causadores de mastites são *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Serratia* spp. e *Enterobacter* spp. (BLOWEY, 1999). São as bactérias Gram negativas mais frequentemente incriminadas como causadoras de mastites ambientais. Esses agentes têm origem no trato intestinal dos animais e podem ser encontrados nas fezes que contaminam as camas, o solo e a água (LÉVESQUE, 2004).

A *E. coli* é considerada o agente ambiental mais prevalente nas mastites, resultando em aparições não sazonais (HIRSH; ZEE, 2003), especialmente quando o ambiente apresenta má ventilação e superlotação (BIGGS, 2009).

Os sinais sistêmicos que ocorrem nas mastites clínicas por *E. coli* devem-se essencialmente aos lipopolissacarídeos da parede, também chamados de endotoxinas, que são liberadas quando o sistema imune destrói as bactérias invasoras. As endotoxinas provocam

alterações na permeabilidade vascular e consequente aumento de células somáticas na glândula mamária e no leite, resultando em edema, depressão, toxemia e outros sinais típicos (de endotoxemia) de mastite aguda ou hiperaguda (RIBEIRO et al., 2008), podendo ser fatal (BIGGS, 2009).

A *Klebsiella* spp. pertence à família Enterobacteriaceae (HENTON, 2004). As espécies identificadas no leite são *Klebsiella pneumoniae* e *K. oxytoca* (ZADOKS; MUNOZ, 2007). *K. pneumoniae* tem sido reportada em diferentes países como causa de surtos de mastites clínicas, principalmente nas duas primeiras semanas de lactação, promovendo alterações semelhantes às causadas por *E. coli* (RIBEIRO et al., 2008).

Este agente geralmente está presente na cama de serragem, em locais úmidos e quentes (BLOWEY, 1999), podendo estar presente na comida, na água e na pele dos membros e dos tetos da vaca (ZADOKS et al, 2008a), sendo associada à contaminação fecal (ZADOKS et al., 2008b). Munoz et al (2006) observaram que mais de 80% das amostras fecais eram positivas para *Klebsiella* spp.

Das espécies de *Serratia* causadoras da mastite, *S. marcescens* tem sido a mais prevalente (TODHUNTER et al., 1991). Esta bactéria Gram negativa tem sido isolada da água, solo, comida, cama (YU, 1979) e da solução contaminada usada para desinfecção dos tetos (VAN DAME, 1982). Vacas com mastite causada por *Serratia* spp. tipicamente apresentam sintomas clínicos leves e na forma subclínica, com tendência a se tornarem crônicas (TODHUNTER et al., 1991). Uma preocupação associada às mastites causadas por esta bactéria é o fato de terem demonstrado ser resistentes a um grande número de antibióticos (VAN DAME, 1982). No entanto, é frequente ocorrer a eliminação espontânea do agente (TODHUNTER et al., 1991).

O uso de antimicrobianos no tratamento de vacas com mastite leve ou moderada por coliformes tem sido questionado pela elevada taxa de cura espontânea e baixa eficácia de antimicrobianos contra bactérias Gram negativas (PYÖRÄLÄ; PYÖRÄLÄ, 1998). No entanto, um estudo indicou resultados clínicos mais favoráveis para vacas com MC grave por coliformes que receberam ceftiofur, por via intramuscular, em comparação com vacas que receberam apenas a terapia de suporte (ERSKINE et al., 2002).

Pseudomonas spp. são bactérias não fermentadoras de lactose que causam mastites clínicas severas ou crônicas (BIGGS, 2009). *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa* são as espécies mais isoladas (NAM et al., 2009), sendo responsáveis por menos

de 1% das infecções intramamárias (KAWAI et al., 2008). A maioria dos casos evolui em dias ou semanas, ocorrendo frequentemente recidivas. É um dos agentes em que se têm verificado um aumento das multirresistências, o que dificulta o tratamento (GEORGE et al., 2008). Está fortemente associado à contaminação da água utilizada na lavagem dos tetos e da máquina de ordenha (KAWAI et al., 2008).

A *Trueperella pyogenes*, recentemente reclassificada a partir do *Arcanobacterium pyogenes* (YASSIN et al., 2011), é uma bactéria conhecida por causar infecções mamárias caracterizadas por processos purulentos de difícil tratamento. A mastite por *T. pyogenes* geralmente caracteriza-se por dor, edema, formação de nódulos e abscessos isolados ou múltiplos, e leite com aspecto denso, purulento e odor desagradável. Ocasionalmente são observados agalaxia e sinais sistêmicos, como febre, e anorexia (COSTA et al., 2000). A infecção mamária é frequente em locais com excesso de umidade, acúmulo de sujidades e matéria orgânica, particularmente no ambiente da pré e pós-ordenha (DOMINGUES et al., 2008), caracterizando o microrganismo como agente ambiental (RADOSTITS et al., 2007). Em muitos casos, os tratamentos com antimicrobianos não são efetivos, apresentando prognóstico ruim (HOGAN et al., 1999).

2.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico de MC é simples em função das alterações macroscópicas que acarreta na glândula mamária e no leite. Entretanto mastites subclínicas não são diagnosticadas pelos métodos rotineiros de exame clínico (inspeção, palpação e alterações do leite) (RADOSTITS et al., 2002), havendo a necessidade do uso de diferentes métodos para o seu diagnóstico (QUINN et al., 1994; SANTOS; FONSECA, 2007).

O teste da caneca de fundo escuro que consiste na eliminação dos primeiros jatos de leite em uma caneca ou coador com fundo escuro é um dos métodos mais indicados e utilizados para diagnóstico da MC. Ele permite a detecção do leite clinicamente anormal pela presença de alterações como grumos, coágulos, pus, sangue e aparência aquosa (MARGATHO et al., 1998).

Alterações físicas tais como dor, rubor, edema e presença de nódulos no úbere são importantes sinais que podem ser encontrados em casos da MC através da palpação e

inspeção visual (SANTOS; FONSECA, 2007). Em casos severos é observada a presença de sinais sistêmicos como depressão, anorexia, desidratação, ou febre (OLIVEIRA et al., 2013).

O aumento na CCS é a principal característica utilizada para o diagnóstico da MSC. Testes como contagem microscópica direta em lâminas (PILLA et al., 2012), California Mastitis Test (CMT), Wisconsin Mastitis Test (WMT) (SANTOS; FONSECA, 2007) e contagem eletrônica têm sido empregados para avaliar a quantidade de células somáticas do leite (OLIVEIRA et al., 2013). Dentre estes destacam-se o CMT, pela ampla utilização e praticidade, e a contagem eletrônica pela precisão da técnica.

Células somáticas são todas as células presentes no leite, incluindo os leucócitos mobilizados da corrente sanguínea para o tecido mamário diante de alterações na permeabilidade capilar e células de descamação do epitélio glandular (HARMON, 1994).

Em animais livres de infecção há um pequeno número de células somáticas no leite, com contagens de 50 a 200 mil céls./mL (KITCHEN, 1981; PAAPE et al., 2000). A ocorrência de infecção provoca a liberação de substâncias químicas, que induz a migração de células do sangue para o interior da glândula, com a finalidade de combater os agentes patogênicos. Na presença de inflamação são comuns contagens acima de 500 mil céls./mL de leite (PHILPOT; NICKERSON, 1991), predominando neutrófilos, seguidos por macrófagos e linfócitos, sem alteração no número de células epiteliais (PAAPE et al., 2000).

A CCS no leite pode ser influenciada por fatores como época do ano, raça, estágio de lactação, produção, número de lactações, estresse, nutrição, clima e doenças intercorrentes, mas especialmente pela presença de infecções intramamárias, sendo um indicador bastante confiável de saúde da glândula mamária (OSTRENSKY, 1999; VIANA, 2000).

A contagem eletrônica de células somáticas no leite é um método amplamente usado para o diagnóstico da MSC em regiões de pecuária leiteira desenvolvida e o parâmetro mais empregado para avaliação da qualidade do leite, fazendo parte do conjunto de atributos essenciais para aceitação do leite pela indústria (BRASIL, 2002).

A CCS no leite de animais individuais ou do tanque é uma ferramenta valiosa como indicador de saúde da glândula mamária de vacas individualmente, sendo usada para estimar a proporção de quartos mamários e de animais infectados no rebanho (COOK et al., 2002), na estimativa das perdas de produção (MÜLLER, 2002).

O CMT é realizado mediante coleta de uma amostra de 2 mL de leite acondicionada em uma bandeja própria sendo em seguida adicionado, na mesma proporção, um detergente

aniônico (alquil-lauril sulfato de sódio) (ALMEIDA et al., 2005). Após homogeneização, a interpretação da infecção baseia-se na observação visual da reação que se processa entre o reagente e o material genético das células somáticas, formando um gel, cuja textura é proporcional ao número de células somáticas presentes no leite. O resultado é dado como negativo (-), suspeito (traços), fracamente positivo (+), positivo (++) e fortemente positivo (+++) (SCHALM; NOORLANDER 1957).

O CMT é um dos testes mais usados mundialmente para o diagnóstico da MSC, tendo a vantagem de poder ser empregado no momento da ordenha (SANTOS; FONSECA, 2007). A correlação positiva e significativa entre a CCS e o CMT tem sido relatada (JORGE et al., 2005; REYES et al., 2005), permitindo fazer uma correspondência aproximada do escore ao CMT e valores da CCS (RUEGG, 2003) (Quadro 01).

Quadro 01: Interpretação de resultados obtidos ao California Mastitis Test (CMT) e estimativa da contagem de células somáticas (CCS) no leite.

Escore no CMT	Interpretação	CCS (céls./mL)
Negativo	A mistura mantém-se líquida, sem evidência de precipitação.	0 – 200.000
Traços	Precipitado ligeiro que desaparece com o movimento contínuo.	200.000 – 500.000
1 (+)	Formação de precipitado, mas nenhuma tendência à formação de gel.	400.000 – 1.500.000
2 (++)	A mistura engrossa imediatamente e move-se em direção do centro.	800.000 – 5.000.000
3 (+++)	Formação grossa de gel e a superfície torna-se convexa no centro.	> 5.000.000

Adaptado de Ruegg (2003).

O uso do CMT como instrumento de diagnóstico da MSC tem sido questionado por ser subjetivo (MARTIN et al., 1994, CASURA et al., 1995), com possibilidade de produzir resultados falso-positivos ou falso-negativos (MARTIN et al., 1994; RIBEIRO et al., 2003). Contudo, diferentes estudos (DELLA LIBERA et al., 2001, SARGEANT et al., 2001; BARBOSA et al., 2002; DELLA LIBERA et al., 2009) atestam a sensibilidade do CMT em identificar quartos mamários com MSC ou sadios quando o resultado é interpretado como negativo ou positivo (qualquer reação positiva).

O CMT apresenta-se como um importante instrumento na avaliação de quartos mamários individuais pela sua praticidade, baixo custo e vantagem em fornecer resultados imediatos, mesmo em regiões onde os métodos automatizados estão disponíveis (CASURA et al., 1995, ENEVOLDSEN et al., 1995), além da possibilidade de identificar animais sob risco, selecionar amostras para exame laboratorial e servir de base para a implantação de linha de ordenha (PHILPOT; NICKERSON 1991).

Alterações da composição físico química do leite, como pH, condutividade elétrica e teor de cloretos, podem auxiliar no diagnóstico da mastite, porém tem aplicação limitada comparando-se com métodos baseados na CCS (MARQUES, 2003).

A cultura bacteriana geralmente é feita em vacas selecionadas a partir da CCS ou de casos clínicos. A cultura de leite individual é utilizada na identificação das espécies bacterianas envolvidas no processo infeccioso (OLIVEIRA et al., 2013).

O isolamento bacteriano além de útil para confirmar o diagnóstico clínico pode indicar medidas específicas de controle e manejo (BRITO et al., 1999) com o objetivo de reduzir a exposição aos patógenos, prevenir danos ao úbere e resultar na utilização racional da terapia antimicrobiana (DODD, 1983).

O isolamento bacteriológico é decisivo, porém apresenta limitações devido à exigência de exames laboratoriais, tempo requerido para a cultura e custos. Adicionalmente, os testes bacteriológicos não são totalmente confiáveis (MCDOUGALL et al., 2001; PYÖRALLÄ, 2003). A ocorrência da mastite pode não ser acompanhada pelo isolamento do agente etiológico por várias razões: em casos em que a infecção já foi eliminada ou a bactéria ainda não está sendo eliminada (eliminação intermitente) e o agente não é identificado pelos exames laboratoriais de rotina, como o *Mycoplasma* spp. (PHILPOT; NICKERSON, 2002); algumas enzimas e proteínas lácteas (lisozima e lactoferrina) podem dificultar a detecção do patógeno e a infecção pode ser suportada por endotoxinas bacterianas e compostos bioativos liberados pelas células inflamatórias que podem prejudicar a sobrevivência bacteriana (MCDOUGALL et al., 2001; RUEGG; REINEMANN, 2002; PYÖRALLÄ, 2003).

Várias simplificações como a utilização de meios de cultura especiais e a criação de esquemas de identificação presuntiva vêm sendo estudadas (FIGUEIREDO, 1995).

Existe uma grande discussão em torno do emprego do diagnóstico laboratorial de mastites na rotina de granjas leiteiras, principalmente no que se refere ao alto custo do exame e a urgência na escolha da consulta terapêutica. O longo tempo entre o envio da amostra e

obtenção dos resultados de isolamento e susceptibilidade dificulta a decisão no tratamento pelo produtor. Neste período, dependendo da evolução do quadro clínico, poderá ocorrer comprometimento irreversível da glândula mamária (FERNANDES, 2006).

2.1.5 Tratamento

O diagnóstico precoce e o tratamento adequado podem restabelecer a produção de leite do quarto mamário na mesma lactação, com aumento significativo da produção das tetas tratadas (DOMINGUES, 1993). No entanto, em alguns casos, MC continua a ser uma doença cujo tratamento pode ser frustrante. Algumas vacas morrem, perdem a funcionalidade do quarto afetado ou retornam à lactação com produção reduzida, apesar do tratamento agressivo e caro. Outras vacas apresentam recorrências de MC após o tratamento ou CCS persistentemente elevadas (MORIN, 2004).

Um importante objetivo dos programas de controle de mastites é encurtar a duração da infecção. Diversos estudos têm sido realizados sobre o tratamento das mastites subclínicas durante a lactação, que embora possa apresentar altas taxas de cura bacteriológica (REIS et al., 2003; OLIVER et al., 2004), não apresentam resultados significativos para aumento de produção ou benefícios econômicos (ZAFALON et al., 2007).

A terapia antimicrobiana visa auxiliar as defesas do hospedeiro na eliminação dos patógenos (ERSKINE et al., 1993). A administração intramamária de antimicrobianos é a via mais frequentemente utilizada no tratamento contra mastite (POL; RUEGG, 2007a).

A superioridade do tratamento sistêmico sobre o tratamento intramamário nunca foi comprovada em ensaios clínicos comparativos. No entanto, há evidências de que o tratamento sistêmico pode ser mais eficiente em mastites causadas por *S. aureus* (DELUYKER et al. 1999; KNIGHT et al. 2000; TAPONEN et al., 2003).

A identificação do patógeno causador da mastite é essencial para a adequada seleção da terapia antimicrobiana a ser instituída (ERSKINE et al., 2003). Outro fator importante para o sucesso da terapia é o conhecimento do perfil de susceptibilidade dos patógenos determinado por meio de testes de susceptibilidade *in vitro* (GENTILINI et al., 2002). No entanto, no caso específico de mastite, este procedimento nem sempre é passível de ser adotado, sobretudo pela morosidade associada ao processo.

É frequente a decisão de tratamento imediatamente após a detecção de infecção clínica, bem como a administração de antimicrobianos de forma preventiva, no período de secagem dos animais (NUNES et al., 2007) e raramente o veterinário tem informação sobre a identificação do agente patogênico e respectivo padrão de susceptibilidade para guiá-lo na decisão terapêutica (OWENS et al., 1997). Nestas circunstâncias, a seleção de uma determinada droga deve se basear na experiência prévia sobre os agentes causadores da infecção e sua susceptibilidade a antimicrobianos (KUNIN, 1993; MARTINEZ et al., 1996).

Fatores relacionados às características do indivíduo, da infecção e do tratamento têm grande influência na taxa de cura (BARKEMA et al., 2006; MOTA et al., 2010).

Vários fatores podem interferir na cura bacteriológica quando se utiliza a terapia com antibióticos, seja devido ao estágio da ocorrência da infecção ou à presença de bactérias em abscessos, além da incapacidade de defesa das células (DINIZ et al., 1998).

A duração do tratamento é citada como um dos fatores mais importantes para o aumento da taxa de cura bacteriológica. Tratamentos de maior duração foram associados com maiores chances de cura (SOL et al., 2000), porém é necessário avaliar os custos e retornos econômicos para justificar seu uso (RODRIGUES, 2008).

Falhas de tratamento são geralmente atribuídas à baixa eficácia da droga, quando na verdade, fatores da vaca, do patógeno, ou a droga utilizada, deveriam ser responsabilizados (MORIN, 2004; MOTA et al., 2010).

Embora não haja alta correlação entre o resultado do teste *in vitro* aos antimicrobianos e a eficácia terapêutica *in vivo* (HOE; RUEGG, 2005; APPARAO et al., 2009), o antibiograma é um dos principais norteadores do uso desses fármacos na prática médica (MARTINEZ et al., 1996).

No antibiograma os medicamentos não sofrem interferência de fatores fisiológicos como presença de leite, reação tecidual e mecanismos de defesa do organismo que impede a penetração e concentração adequada da droga em todos os sítios de infecção, além do veículo utilizado no tratamento, que pode reduzir ou aumentar a eficiência dos antimicrobianos *in vivo* (PHILPOT, 2002). Somam-se a esses fatores, outros como, a via de aplicação, a assepsia, a dose, o intervalo e a duração do tratamento (COSTA et al., 2001). Além disso, alguns patógenos como *Trueperella pyogenes*, *Bacillus* spp., *Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Pasteurella* spp., *Proteus* spp., *Prototheca* spp. (alga), *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp. apresentam improvável resposta à terapia antimicrobiana (WAGNER; ERSKINE, 2009).

2.1.6 Controle e profilaxia

Um adequado manejo de ordenha pode diminuir o número de animais acometidos, reduzir a taxa de novas infecções, reduzir a CCS do tanque e melhorar a qualidade do leite com benefícios diretos aos produtores, indústria e consumidores (RUPP et al., 2000).

Várias medidas são propostas para controlar a mastite e em consequência diminuir os impactos econômicos na atividade leiteira (MÜLLER, 1999). Diminuir a duração das infecções existentes e evitar a ocorrência de novas infecções são dois objetivos que devem ser perseguidos quando um programa de controle da mastite é adotado (DODD, 1983). Para isso foi elaborado um programa básico de controle de mastite que se convencionou chamar de programa dos 5 pontos. O programa envolve as seguintes práticas: 1) Utilização correta do equipamento de ordenha em bom funcionamento; 2) Bom manejo de ordenha com ênfase na desinfecção dos tetos pós-ordenha; 3) Tratamento imediato de todos os casos de MC; 4) Tratamento de todas as vacas durante o período seco; 5) Descarte de vacas com mastite crônica (NMC, 1987).

A adoção de boas práticas de ordenha tem resultado na redução considerável da prevalência de bactérias de origem contagiosa e conseqüentemente, elevado a prevalência de bactérias de origem ambiental em muitas fazendas de produção leiteira (SMITH et al., 1985). Esse fato determinou um ponto vulnerável no programa dos 5 pontos, implicando na necessidade de se acrescentar a prática da higiene do local de permanência dos animais (LARANJA; MACHADO, 1994). Neste contexto, espera-se obter uma CCS abaixo de 200.000 céls./mL de leite, menos de 2% de episódios clínicos ao mês e acima de 85% das vacas livres de MSC (MÜLLER, 1999).

Com o objetivo de evitar a transmissão da doença para vacas com úberes sadios, através de utensílios ou do próprio ordenhador, é recomendado que as vacas sejam ordenhadas em uma sequência estabelecida a partir do histórico clínico do rebanho: iniciando com as vacas de primeira lactação, seguidas pelas mais velhas que nunca tiveram mastite, vacas que já tiveram mastite, mas foram curadas e por último as vacas com mastite (SILVA et al., 2002), porém essa prática só é viável em rebanhos pequenos.

Durante e logo após a ordenha são os momentos mais críticos para a manutenção da saúde da glândula mamária, visto que o risco de novas infecções está diretamente associado com a intensidade de contaminação da extremidade do teto (SANTOS, 2002). Neste contexto,

são importantes a higiene do ordenhador, e os cuidados com os equipamentos de ordenha que podem facilitar a transmissão de patógenos entre vacas e entre quartos do úbere (DINGWELL et al., 2004).

2.1.7 Principais antimicrobianos utilizados na terapia contra mastite bovina

Agentes antimicrobianos são compostos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de bactérias. Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (WALSH, 2003).

Os antibióticos de origem natural e seus derivados semissintéticos compreendem a maioria dos antimicrobianos em uso clínico e podem ser classificados em β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, oxapeninas e monobactamas), tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos (glicopeptídeos, lipodepsipeptídeos), entre outros (lincosamidas, cloranfenicol, rifamicinas, etc.).

Os antimicrobianos β -lactâmicos são agentes bactericidas e tem como principal modo de ação a inibição da síntese da parede celular e indução da autólise bacteriana (SUÁREZ; GUDIOL, 2009). Possuem atividade contra bactérias Gram positivas e negativas, boa eficácia clínica e excelente perfil de segurança, uma vez que atuam sobre a parede celular, única em bactérias. Constituem a primeira classe de derivados de produtos naturais utilizados no tratamento terapêutico de infecções bacterianas e atualmente, várias décadas após a descoberta da penicilina, este grupo ainda contém os agentes mais comumente utilizados na prática clínica (SUÁREZ; GUDIOL, 2009).

Todos os agentes β -lactâmicos têm um elemento estrutural comum, o anel azetidínico de quatro membros, ou anel β -lactâmico. Na maioria deles, o anel central β -lactâmico é fundido a outro anel de cinco (tiazolidínico) ou seis (di-hidrotiazínico) membros, formando as penicilinas ou cefalosporinas, respectivamente (VON NUSSBAUM et al., 2006).

A cloxacilina é um antimicrobiano pertencente ao grupo das penicilinas utilizada no tratamento contra mastites bovinas devido ao espectro antimicrobiano, tanto para as bactérias Gram positivas como para as negativas (AURELI et al., 1996; BECKER et al., 2004).

Das aminopenicilinas, a ampicilina foi o primeiro antimicrobiano semissintético derivado da penicilina G. A amoxicilina, outra aminopenicilina, é obtida pela hidroxilação da cadeia fenólica lateral da ampicilina (LEVISON; JAWETZ, 1998).

As cefalosporinas são os antimicrobianos em maior uso clínico, sendo subdivididas em cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta gerações, em função do espectro de ação. O sistema bicíclico das cefalosporinas é menos tensionado em comparação ao das penicilinas, o que contribui para a maior estabilidade frente à reação de abertura intramolecular do anel β -lactâmico pela cadeia lateral (SUÁREZ; GUDIOL, 2009).

As cefalosporinas de primeira geração são consideradas fármacos de menor atividade em relação às penicilinas. Elas apresentam boa atividade frente a bactérias Gram positivas em termos gerais, porém suas sucessivas gerações perderam um pouco dessa atividade, em benefício do aumento da atividade contra bacilos Gram negativos, com algumas exceções (SUÁREZ; GUDIOL, 2009).

As cefalosporinas de segunda geração, em geral, apresentam atividade variada frente a bactérias Gram positivas, porém atividade superior frente a bactérias Gram negativas. A terceira e a quarta gerações das cefalosporinas apresentam um considerável incremento na potência e no espectro de ação, particularmente frente a bactérias Gram negativas (PATRICK, 1995; SUÁREZ; GUDIOL, 2009).

A cefalexina (primeira geração), cefoperazone e ceftiofur (terceira geração) e cefquinoma (quarta geração) são cefalosporinas utilizadas no tratamento contra mastite bovina (HORNISH; KOTARSKI, 2002; CARRACEDO, 2009; SPINOSA et al., 2011).

Os aminoglicosídeos apresentam efeito bactericida por ligarem-se especificamente à subunidade 30S dos ribossomos bacterianos, impedindo o movimento do ribossomo ao longo do RNA mensageiro (RNAm) e, conseqüentemente, interrompendo a síntese de proteínas. Eles são transportados através da membrana citoplasmática por um mecanismo dependente de oxigênio, motivo pelo qual não exibem atividade contra microrganismos anaeróbios. Esses agentes são efetivos contra bactérias Gram positivas e negativas aeróbicas, e apresentam efeito sinérgico com β -lactâmicos (DURANTE-MANGONI et al., 2009).

Os aminoglicosídeos estreptomicina, gentamicina e a neomicina agem interferindo na síntese protéica bacteriana promovendo a formação de proteínas defeituosas, alterando a permeabilidade celular, levando à morte da célula bacteriana (SPINOSA, et al., 2011).

Os macrolídeos são bacteriostáticos, que atuam pela ligação com o RNA ribossomal 23S da subunidade 50S, interferindo na extensão da cadeia peptídica durante a translação e bloqueando a síntese de proteínas bacterianas (BRÖTZ-OESTERHELT; BRUNNER, 2008). A espiramicina é um antimicrobiano com ação contra bactérias Gram negativas, porém sendo utilizada principalmente contra Gram positivas, e que em altas concentrações e perante microrganismos sensíveis atua como bactericida (BRISSON-NOËL et al., 1988).

As tetraciclinas são antimicrobianos bacteriostáticos de amplo espectro e bastante eficazes frente a diversas bactérias aeróbicas Gram positivas e Gram negativas causadoras da mastite (ERSKINE et al., 2002; MAKOVEC; RUEGG, 2003a). Agem inibindo a síntese de proteínas através da ligação com a subunidade 30S dos ribossomos, impedindo que o RNA transportador (RNAt) se fixe ao ribossomo. Como resultado, a adição de novos aminoácidos para o aumento da cadeia proteica é bloqueada. A liberação de proteínas também é inibida (VON NUSSBAUM et al., 2006; BRÖTZ-OESTERHELT; BRUNNER, 2008).

Os glicopeptídeos agem na inibição da biossíntese de parede celular bacteriana pela complexação com o resíduo dipeptídico terminal D-Ala-D-Ala das cadeias peptídicas que constituem a parede celular. Esta complexação impede que o substrato esteja disponível para a ação da transpeptidase inibindo, portanto, a reação de transpeptidação (WALSH, 2003; PACE; YANG, 2006). A bacitracina (glicopeptídeo), com ação bactericida contra cocos Gram positivos e bacilos (JAWATZ, 1995), composto de uma mistura de diversos polipeptídios estreitamente relacionados que interfere na biossíntese da parede celular bacteriana através da inibição da pirofosfatase envolvida no transporte de precursores peptidoglicanos através de membranas (EMEA, 2001; CHAMBERS, 2001).

As sulfonamidas, também conhecidas como sulfas, foram testadas pela primeira vez nos anos 1930 como fármacos antibacterianos. O sulfametoxazol bloqueia a enzima dihidropteroato sintetase, presente apenas nas bactérias, enquanto o trimetoprim inibe a dihidrofolato redutase. Ambas as enzimas atuam na via de biossíntese do *N5,N10*-metileno-tetra-hidrofolato, importante cofator que fornece uma unidade de carbono na biossíntese de bases pirimidínicas constituintes dos ácidos nucleicos. A atuação destes fármacos é sinérgica no bloqueio de dois diferentes passos na via bioquímica de formação deste cofator essencial (PATRICK, 2005).

2.2 Resistência Bacteriana

A resistência é a capacidade inerente ou adquirida da bactéria em não sofrer os efeitos inibitórios dos agentes antimicrobianos, por diversos mecanismos, entre eles, uma rápida biotransformação do antimicrobiano diminuindo o efeito nocivo, ou modificando o sítio de ação do antibiótico de modo a não afetar a função bacteriana (OLIVEIRA, 2006).

Infecções por bacterianas resistentes diminuem as opções terapêuticas, aumentam os custos no tratamento, e podem contribuir para o aumento da mortalidade (LEVY, 1992).

As bactérias podem ser intrinsecamente resistentes a uma classe antimicrobiana específica devido à falta de sítios de ligação ou outras características farmacológicas. A resistência intrínseca é natural a todos os membros de um grupo de bactérias e poderia ser um problema clínico significativo em algumas circunstâncias. A resistência antimicrobiana também pode ser adquirida, seja por mutações cromossômicas ou por troca de material genético (NEU, 1992).

Alguns autores consideram que o uso de antimicrobianos em concentrações subterapêuticas em animais induz o aparecimento de cepas selecionadas de bactérias, eventualmente resistentes. A multiplicação de populações resistentes, junto com o potencial de resistência cruzada, leva ao desenvolvimento de colônias resistentes a uma variedade de agentes antimicrobianos. Se tais bactérias forem transferidas aos homens através do consumo de alimentos, podem, em última análise, colonizar novos hospedeiros ou transferir essa característica para outras bactérias (MANIE, 1997, DENOBILE, 2004).

As bactérias têm desenvolvido vários mecanismos de resistência, e numa determinada bactéria vários mecanismos podem ser responsáveis pela resistência a um único antimicrobiano. As bactérias podem adquirir genes que codificam enzimas que inativam o antimicrobiano antes dele ter efeito. Este é o principal mecanismo de resistência contra agentes β -lactâmicos e aminoglicósidos (TENOVER, 2006). A produção de β -lactamases representa o principal mecanismo de resistência aos agentes β -lactâmicos, especialmente em bactérias Gram negativas (embora algumas Gram positivas e anaeróbicas possam produzi-la). Essas enzimas são capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico e, por conseguinte, inativar a ação do agente antimicrobiano. Neste caso, a modificação molecular responsável pelo aumento da resistência às β -lactamases foi a introdução de grupamentos volumosos no carbono carbonílico da cadeia lateral em penicilinas semissintéticas (metecilina, oxacilinas), que

impedem o acesso dos antimicrobianos ao sítio ativo da enzima β -lactamase (SUÁREZ; GUDIOL, 2009).

Bombas de efluxo que expulsam o antimicrobiano do meio intracelular para o extracelular (tetraciclina e macrolídeos), genes que modificam ou substituem o sítio de ação da droga (penicilina, macrolídeos e quinolonas), redução da permeabilidade da membrana celular para a droga (β -lactâmicos e tetraciclina) e proteção do alvo da droga (tetraciclina e quinolonas) são outros mecanismos de resistência que as bactérias podem adquirir (SCHWARZ; CHASLUS-DANCLA, 2001; TENOVER, 2006).

Oliveira et al. (2002) demonstraram grande percentual de resistência para *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de leite de vacas com MC e subclínica procedentes da Região Agreste de Pernambuco, concluindo que os isolados apresentaram-se resistentes à penicilina e tetraciclina e apontaram o uso incorreto e indiscriminado de produtos com essas bases farmacológicas como os responsáveis por esta situação.

Existe atualmente uma diversidade de métodos laboratoriais usados para determinar o perfil susceptibilidade *in vitro* das bactérias aeróbias aos agentes antimicrobianos (CONSTABLE; MORIN, 2003).

O TDD (BAUER et al., 1966) baseia-se na interpretação da medida do diâmetro da zona de inibição formada ao redor do disco contendo o antimicrobiano em teste. Resultados confiáveis são obtidos com teste que usam o princípio de metodologia padronizada e medidas do diâmetro do halo de inibição correlacionados às concentrações inibitórias mínimas com cepas reconhecidamente sensíveis e resistentes a diversos agentes antimicrobianos (CLSI, 2012).

A interpretação e a classificação do TDD são baseadas na resposta *in vitro* de uma bactéria a um agente antimicrobiano em concentrações correspondentes às concentrações sanguíneas ou teciduais alcançadas com doses normalmente prescritas no tratamento contra essa bactéria. Os resultados são qualitativos e dados como: 1) sensível, predizendo que o microrganismo é inibido na dose recomendada para tratamento; 2) intermediário, incluindo microrganismos cuja resposta ao tratamento pode ser menor do que a resposta para microrganismos sensíveis, havendo melhores resultados onde as drogas se concentram fisiologicamente ou com a utilização de uma dosagem mais alta da droga; e 3) resistente, incluindo microrganismos que não são inibidos pela concentração da droga normalmente alcançada com a dose prescrita habitualmente (CLSI, 2012).

O TDD tem sido um dos mais utilizados nos casos de mastite, pela sua praticidade, baixo custo, repetibilidade entre laboratórios e flexibilidade no tipo e número de antimicrobianos que podem ser testados (WALKER et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2011; SAINI et al., 2011).

O teste de microdiluição em placa é um método quantitativo, no qual uma placa plástica contendo 96 poços é utilizada para testar até 12 agentes antimicrobianos em até 8 diluições distintas. O teste pode ser automatizado e as placas podem ser personalizadas conforme necessidade. Testes de microdiluição em placa são mais caros do que os de disco difusão, além de não ter a flexibilidade da escolha dos agentes antimicrobianos testados, no entanto, uma ampla variedade de concentrações pode ser testada (WALKER, 2006).

No teste de diluição em ágar, antimicrobianos são incorporadas ao meio de ágar sólido ou semi-sólido em progressão geométrica de concentrações, e um inóculo bacteriano definido em caldo ou em NaCl 0,09% é aplicado sobre a superfície. A menor concentração de antimicrobiano que causar ausência de crescimento, a olho nu, é considerada a concentração inibitória mínima para o agente bacteriano. O teste é preciso e produz resultados quantitativos, embora seja trabalhoso e caro (WALKER, 2006).

2.3 Prova da Redutase

O leite por sua riqueza de nutrientes é um meio de cultura ideal para a maioria dos microrganismos e a multiplicação destes é rápida, se a temperatura for adequada para o crescimento (COUSINS; BRAMLEY, 1987).

O crescimento de microrganismos no leite provoca o consumo do oxigênio presente no meio. Esse fenômeno leva à produção de substâncias redutoras, diminuindo o potencial óxido-reductor (O-R). Através de uma substância indicadora, é possível avaliar a diminuição do potencial de O-R. O AM é um corante catiônico solúvel em água ou álcool de fórmula molecular $C_{16}H_{18}CLN_3S$ e massa molar 319.85 g/mol, usado como corante bacteriológico e indicador de O-R. O AM em sua forma oxidada é azul (AM^+) e facilmente reduzido a sua forma hidrogenada (azul de leucometileno, LM^+) que é incolor. Quando introduzido em uma cultura bacteriana, AM age como aceptor de elétrons, reduzindo-se e tornando-se incolor (LEVINE, 1983). Em geral, o tempo de redução é inversamente proporcional ao número de bactérias presentes na amostra no início da incubação (BRITO et al., 2007), o que possibilita a

determinação da concentração bacteriana pela determinação do tempo de descoloramento (PLASZEZESKI et al., 2005).

A prova da redutase utilizando o AM ou a resazurina constitui um método indireto bastante simples e rápido para estimar a qualidade higiênica e bacteriológica do leite cru, em função da taxa metabólica dos diversos microrganismos que produzem substâncias redutoras no leite (VIEIRA et al., 2005).

O resultado da prova da redutase é dado em horas e não pelo número de bactérias embora haja uma correlação entre o tempo de redução do azul de metileno (TRAM) e o número de bactérias da amostra (NADER FILHO et al., 1983).

As condições para estimar o número de bactérias pela prova da redutase são padronizadas, porém nem todas as espécies de bactérias possuem a mesma atividade redutora. A correlação entre a contagem total de microrganismos aeróbios, obtida por plaqueamento em *Plate Count Agar* (PCA) e pelo sistema Petrifilm®, e a relação dessas duas metodologias com as respostas da prova da redutase foi investigada por Carvalho et al. (2002). Pelos resultados, as metodologias para a contagem total de microrganismos aeróbios, contagem de coliformes totais e a prova da redutase mostraram ser equivalentes.

Embora com limitações, a prova da redutase era aplicada para a maioria dos casos e, sua simplicidade e baixo custo justificavam sua recomendação como parâmetro geral para avaliar a qualidade do leite (VALLE, 1985), sendo pouco sensível para um produto de boa qualidade e com reduzido número de microrganismos (BRITO et al., 2007).

A IN 51/2002 prevê, como provas de qualidade do leite cru, tanto a contagem padrão em placas (mesófilos) como também a possibilidade do uso da prova da redutase. Os parâmetros estabelecidos para o TRAM na prova para o leite cru tipos A, B e C são 5 horas; 3 horas e 30 minutos e 90 minutos respectivamente (BRASIL, 2002).

Para avaliação da qualidade pela prova da redutase preconiza-se o seguinte procedimento: 1) Pipetar 10 mL da amostra de leite em um tubo de ensaio; 2) Adicionar 1 mL de solução de azul de metileno (0,02%) e homogeneizar; 3) Encaminhar imediatamente ao banho-maria a 37°C (tempo zero); 4) Efetuar a leitura no momento de descoloração (mudança de cor da amostra, de azul para branco) e anotar o tempo final. Para estimativa do número de bactérias presentes na amostra utiliza-se os critérios apresentados nos quadros a seguir (Quadros 02 e 03).

Quadro 02: Interpretação dos resultados da prova da redutase pelo tempo de redução do azul de metileno em função da carga microbiana.

Leite	Tempo de redução	Nº de bactérias (estimado)
Leite tipo A	Mínimo 5 horas	Máximo 10^4 UFC/mL
Leite tipo B	Mínimo 3 horas e 30 minutos	Máximo 5×10^5 UFC/mL
Leite tipo C	Mínimo 90 minutos	Não há previsão

Fonte: IN 51 / 2002 (BRASIL, 2002). UFC = unidades formadoras de colônia.

A presença de antimicrobianos em amostras de leite foi identificada como um fator responsável por alterar o resultado da prova da redutase (RODRIGUES et al., 1993; BRANCHER; FAGUNDES, 1998).

Rodrigues et al. (1993) avaliaram diferentes testes para verificar a capacidade de redução dos corantes AM e resazurina pelo *S. thermophilus*, frente a várias diluições de ampicilina, cefalosporina, oxitetraciclina, estreptomicina, quemicitina, espectinomicina e gentamicina. As amostras esterilizadas contendo diferentes diluições dos antibióticos foram analisadas quanto ao potencial de redução dos corantes com e sem aquecimento. Os resultados demonstraram a grande capacidade de detecção de pequenas quantidades dos antibióticos, tanto pelo método de resazurina, como pelo do AM. Os autores sugeriram que este teste poderia ser utilizado pelos serviços de inspeção e pelas próprias indústrias, para avaliação da qualidade e presença de antibióticos no leite.

Quadro 03: Relação entre o número de bactérias presentes no leite e o tempo de redução do azul de metileno.

Tempo de redução	Nº aproximado de bactérias (UFC/mL)
< 20 minutos	> 20.000.000
20 - 120 minutos	4.000.000 – 20.000.000
2 - 5,5 horas	500.000 – 4.000.000
5,5 - 8 horas	100.000 – 500.000
> 8 horas	< 100.000

Fonte: Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (2009). UFC = unidades formadoras de colônia.

Brancher e Fagundes (1998) avaliaram a prova da redutase, utilizando o AM como indicador, para detectar presuntivamente a presença de resíduos de antibióticos no leite. Para testar o método foram utilizadas amostras de leite de vacas com mastite tratadas por via intramamária com gentamicina, oxitetraciclina e penicilina. Na metodologia utilizada, as

amostras foram aquecidas a 85-95°C por 10 minutos e resfriadas até 37°C, seguindo-se a adição de 2% fermento láctico (*Streptococcus thermophilus*) e 1 ml de AM (0,02%). O tempo necessário para completa descoloração da amostra constituiu-se em parâmetro para avaliar a atividade do *S. thermophilus*. Verificou-se que as amostras com antibióticos demandaram intervalos de tempo significativamente maiores do que os controles para descoloração do AM. Os autores concluíram que o método é sensível para os antibióticos testados e pode ser utilizado na pesquisa presuntiva dos mesmos.

Lima (2009) adaptou a prova da redutase (PRA) para verificar a susceptibilidade de bactérias causadoras da mastite a agentes antimicrobianos comerciais. Na metodologia utilizada, 4 mL da amostra de leite oriundas dos quartos mamários afetados por MC ou subclínica foram distribuídas em tubos contendo 200 µL de diferentes formulações de antimicrobianos intramamários comerciais e um tubo controle (sem adição de antimicrobiano), seguindo-se da adição de 400 µL de AM (0,02%), mantidos à temperatura ambiente (variando entre 23 e 37 °C) com observação em intervalos de 1 hora por 48 horas e registro do tempo necessário para completa descoloração do AM. A susceptibilidade dos microrganismos, ao antimicrobiano presente no tubo, foi considerada quando o tempo de descoloração foi maior que o tempo do tubo controle da mesma amostra. Em seguida a eficácia clínica da PRA foi testada em vacas com MC tratadas aleatoriamente com formulações antimicrobianas intramamárias comerciais. Para isso, amostras de leite, de quartos mamários afetados por MC, foram coletadas antes do tratamento e encaminhadas para o teste de disco difusão em ágar e PRA. As vacas tiveram seus quartos mamários afetados tratados com antimicrobianos intramamários comerciais seguindo a posologia de cada fabricante. Quatro dias após a última aplicação intramamária, os animais foram avaliados pelo teste da caneca de fundo escuro e CMT comparando os resultados com a susceptibilidade obtida na PRA e antibiograma. Das vacas tratadas (n = 26), a susceptibilidade avaliada pela PRA coincidiu em 92,3% com os resultados clínicos após o tratamento, contra 85,7% dos resultados pelo teste de disco difusão em ágar, sem diferença estatística. Concluiu-se que a prova da redutase, mediante adição de antimicrobianos (PRA), mostrou ser útil na escolha do antimicrobiano a ser utilizado no tratamento da MC.

Com base nesses resultados, no presente estudo objetivou-se: 1) identificar os principais agentes etiológicos envolvidos, e o perfil de susceptibilidade antimicrobiana das bactérias isoladas de casos de MC em rebanhos leiteiros no Município de Resende – Rio de

Janeiro; 2) avaliar a eficácia do tratamento da MC mediante associação entre os resultados de susceptibilidade antimicrobiana *in vitro*, avaliada pelo teste de disco difusão em ágar (TDD) e PRA, de patógenos oriundos de vacas com MC.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e Características das Propriedades

O estudo foi conduzido de março de 2012 a abril de 2014, em cinco propriedades de produção leiteira, localizadas no município de Resende, Rio de Janeiro.

Em cada propriedade procedeu-se a uma análise do sistema de produção, com ênfase no manejo de ordenha. Mediante inquérito pessoal aplicado ao proprietário foram obtidas informações relativas ao rebanho: número de animais, raça, manejo nutricional, higiênico e sanitário, enfermidades, tratamento, evolução, mortalidade, formas de identificação, prevenção e tratamento da mastite. Os procedimentos de higienização e manejo da ordenha foram avaliados *in loco*. Todos os dados obtidos foram anotados em formulários próprios (ANEXO 01).

Foi exigido, para inclusão neste estudo, que os produtores realizassem tratamento de todos os casos clínicos com antimicrobiano intramamário comercial.

3.2 Coleta de Amostras de Leite do Tanque de Expansão

Como critério de avaliação inicial, em cada propriedade duas amostras de leite, foram coletadas pelos pesquisadores em frascos esterilizados, diretamente da parte superior e central do tanque de expansão, após agitação por cinco minutos, utilizando-se coletor de aço inoxidável. Imediatamente após homogeneização das amostras, alíquotas de 40 mL de leite foram transferidas para recipientes específicos, contendo os conservantes bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol na concentração de 8 mg do ingrediente ativo para cada 40 mL da amostra) e azidiol (5 gotas para 40 mL da amostra).

Após homogeneização por inversão, os frascos foram identificados com o nome ou número da respectiva propriedade. As amostras foram então acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo e encaminhadas, por SEDEX, para contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT), na Clínica do Leite da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP, por métodos de referência (BRASIL, 2011).

3.3 Coleta de Amostras de Leite de Quartos Mamários com Mastite Clínica

Após a avaliação preliminar das condições higiênicas e sanitárias dos rebanhos, 246 quartos mamários foram identificados com MC, ao longo do estudo, através do exame físico da glândula mamária e teste da caneca de fundo escuro (Figura 1). Todos os casos foram oriundos de vacas com apenas um quarto mamário afetado por MC.



Figura 1: Teste da caneca de fundo escuro para diagnóstico da mastite clínica em que se evidencia alterações macroscópicas do leite.

Amostras de leite, de aproximadamente 45 mL, foram colhidas pelos pesquisadores assepticamente dos quartos mamários identificados com MC (leite anormal e/ou quarto anormal) antes do início do tratamento (PRÉ) (Figura 2). As amostras foram colhidas após limpeza manual a seco dos tetos, seguida pela desinfecção com solução iodada (0,5%), secagem com papel toalha descartável 30 segundos após a aplicação da solução iodada e desinfecção do óstio da teta com gaze embebida em álcool 70% (PHILPOT; NICKERSON, 1991). Uma nova amostra de 15 mL de leite foi colhida assepticamente após o fim do tratamento, segundo o protocolo utilizado (PÓS).

Após a coleta, as amostras foram imediatamente acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo e encaminhadas para testes específicos.

A MC foi classificada de acordo com a gravidade dos sintomas como leve (quando o único sinal foi a aparência anormal do leite), moderada (aparência anormal do leite

acompanhada por edema e/ou hiperemia do quarto mamário) ou grave (quando a vaca exibiu algum sinal sistêmico como: apatia e redução do apetite).



Figura 2: Coleta de amostra de leite de um quarto mamário com mastite clínica.

Com o objetivo de evitar a presença de resíduos de antimicrobianos oriundos de tratamentos anteriores, vacas que receberam tratamento, com algum tipo de antimicrobiano, até 14 dias anteriores ao caso clínico não foram incluídas no estudo.

3.4 Protocolos de Tratamento

Ao final da ordenha, os quartos mamários de vacas com MC foram tratados com antimicrobianos intramamários comerciais. Os antimicrobianos intramamários foram os mesmos utilizados, em cada rebanho, nos 60 dias anteriores ao início das coletas e segundo a disponibilidade nos comércios locais, e tiveram como princípios ativos e dose por tubo: gentamicina (150 mg), cefoperazone (250 mg), espiramicina (200 mg) com neomicina (200 mg), cefalexina (100 mg) com neomicina (100 mg), cloxacilina (200 mg) com ampicilina (75 mg) ou cefquinoma (88,92 mg).

Em todos os casos, os tratamentos foram efetuados pelo pesquisador, com a administração de todo o conteúdo dos tubos após o completo esgotamento dos quartos mamários afetados.

Para tratamento dos casos clínicos foram utilizados dois protocolos: (1) protocolo 1 (P1), realizado em 2012 nas propriedades 1, 2, 3 e 5, os tratamentos tiveram duração de três

dias consecutivos (tratamento convencional) e os resultados foram avaliados quatro dias após o fim dos tratamentos; (2) protocolo 2 (P2), realizado em 2014 nas propriedades 2 e 4, os tratamentos foram realizados diariamente até um dia após o desaparecimento dos sinais clínicos e no máximo por nove dias (tratamento estendido), e os resultados foram avaliados quatorze dias após o fim dos tratamentos.

3.5 Isolamento e Identificação dos Patógenos

No Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Veterinária da UFRRJ os procedimentos microbiológicos foram conduzidos de acordo com NMC (1999). De cada amostra, 100 µL foram semeados em placas de petri contendo ágar sangue ovino 5% e 10 µL em placa contendo ágar MacConkey. As placas foram incubadas em estufa, em posição invertida a 37°C por 24 a 56 horas.

Observando as placas de ágar sangue, os agentes etiológicos foram definidos pelo crescimento de pelo menos três colônias idênticas (300 UFC/mL) na mesma cultura. Infecções mistas foram definidas pelo crescimento de pelo menos três colônias idênticas de dois tipos diferentes na mesma cultura. Amostras foram consideradas contaminadas quando três ou mais tipos diferentes de colônias foram isoladas da mesma cultura. Culturas com ausência de crescimento ou crescimento inferior a 300 UFC/mL foram consideradas sem crescimento. Uma exceção foi considerada para os crescimentos de *S. aureus*, *S. agalactiae* e coliformes. Por serem considerados de grande importância como agentes etiológicos de mastite, o crescimento de pelo menos uma colônia (100 UFC/mL) foi utilizada na determinação desses agentes.

Após incubação, procedeu-se a avaliação das características morfológicas, padrão de hemólise e caracterização morfotintorial (coloração de Gram) das colônias. Inócuos individuais foram repicados em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) para realização de provas bioquímicas e observação dos aspectos fenotípicos característicos dos gêneros seguidos da identificação.

Após a identificação presuntiva das colônias de *Staphylococcus* spp., pela coloração de Gram e prova da catalase, *S. aureus* foram diferenciados de outros estafilococos por meio da fermentação do manitol, prova da coagulase e tipo de hemólise na placa. O gênero *Streptococcus* spp. foram diferenciados de outros streptococos por meio do teste CAMP,

hidrólise de esculina, bile esculina e tipo de hemólise na placa. A identificação presuntiva de *Corynebacterium bovis* foi baseada na presença de colônias pequenas, brancas, não-hemolíticas observadas sobre ágar sangue após 48 horas após incubação, crescimento em áreas com gordura do leite visível, acompanhada da coloração de Gram (positiva), provas da catalase (positiva) e nitrato (positiva).

As bactérias Gram-negativas foram identificadas pelo crescimento em ágar MacConkey, coloração de Gram, motilidade, indol, ornitina, oxidase e crescimento em meio ágar tríplice açúcar-ferro® (TSI).

3.6 Susceptibilidade Antimicrobiana - Teste de Disco Difusão em Ágar

O perfil de susceptibilidade *in vitro*, das bactérias isoladas foi determinado pelo TDD (BAUER et al., 1966), segundo metodologia recomendada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008).

Após isolamento e identificação dos agentes, três a cinco colônias com as mesmas características morfológicas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 4,0 mL de caldo Casoy, incubadas a 35 °C por 24 horas, quando a turbidez foi padronizada a 0,5 na escala de McFarland. Em seguida foi realizada a semeadura, com suabe estéril sobre a superfície de ágar Mueller-Hinton. Discos impregnados com antimicrobianos foram depositados sobre o meio. A incubação das placas ocorreu a 35 °C por um período de 18 horas, quando foram realizadas as leituras de acordo com os diâmetros (em milímetros) dos halos apresentados por cada amostra frente aos antimicrobianos utilizados (Figura 3), e os resultados foram interpretados como sensível, sensibilidade intermediária ou resistente ao antimicrobiano. Para o controle de qualidade dos testes, foi utilizada a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Foram testados os seguintes antimicrobianos: ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), ceftiofur (30 µg), enrofloxacina (5 µg), espiramicina (100 µg), gentamicina (10 µg), neomicina (30 µg), oxacilina (1 µg), sulfametoxazol com trimetoprim (25 µg) e tetraciclina (30 µg).

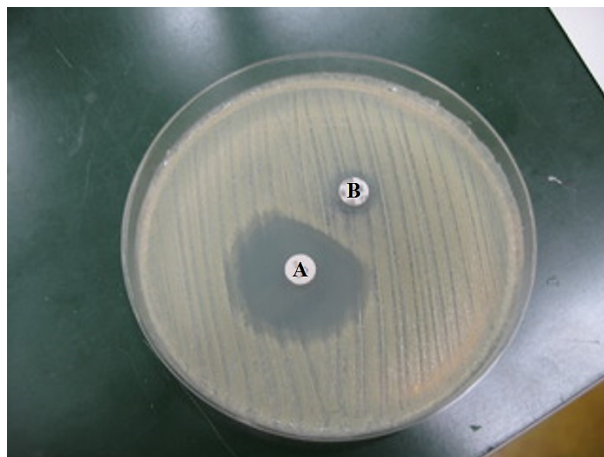


Figura 3: Teste de disco difusão em ágar para uma cultura de *Streptococcus agalactiae*. Foram observadas (A) sensibilidade para enrofloxacina (5 µg) e (B) resistência para tetraciclina (30 µg).

3.7 Susceptibilidade Antimicrobiana - Prova da Redutase Adaptada

A PRA foi realizada conforme estabelecido por Lima (2009) (ANEXO 02) utilizando-se alíquotas de 4,0 mL de leite em tubos estéreis com tampa e capacidade para 5,0 mL, adicionadas de 400 µL da solução de AM a 0,02% e 200 µL de diferentes antimicrobianos intramamários (Figura 4).

Os tubos contendo apenas leite e solução de AM foram definidos como controles e tubos testes quando foram adicionados os antimicrobianos intramamários contendo: gentamicina (15 mg/mL), cefoperazone (25 mg/mL), espiramicina (20 mg/mL) com neomicina (20 mg/mL), cefalexina (10 mg/mL) com neomicina (10 mg/mL), cloxacilina (40 mg/mL) com ampicilina (15 mg/mL) ou cefquinoma (11,12 mg/g).

Os tubos foram tampados, invertidos por três vezes para a homogeneização, acondicionados em estantes apropriadas, expostos à luz e em temperatura ambiente ($28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 7\text{ }^{\circ}\text{C}$), para início da prova, por 48 horas (Figura 5). As leituras foram efetuadas em intervalos de uma hora, sem homogeneização das amostras, para visualização e registro do tempo em que ocorreu a redução do corante (descoloração).

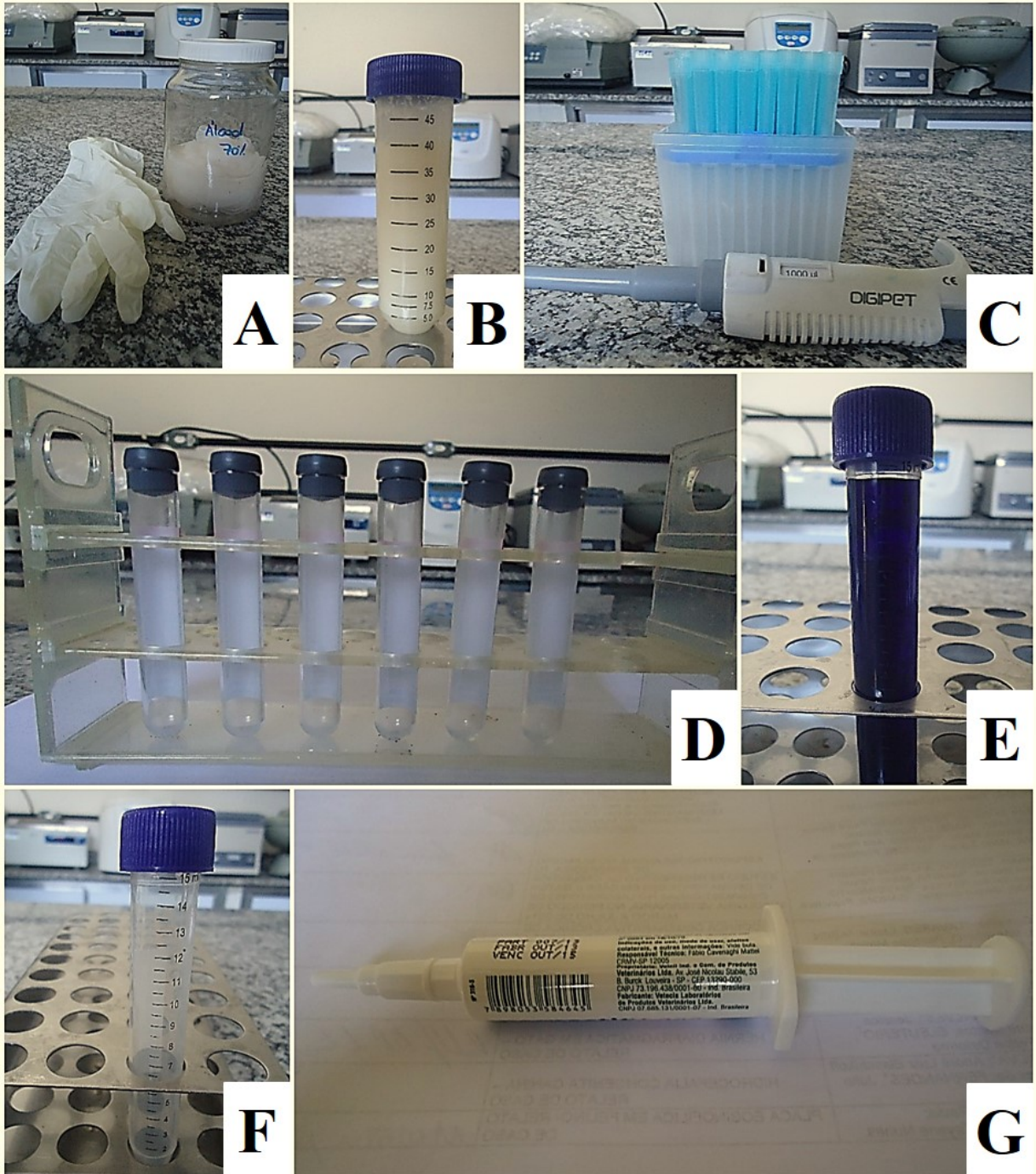


Figura 4: Material utilizado na realização da prova da redutase adaptada. (A) Luvas de látex e gaze embebida em álcool 70%, (B) tubo tipo Falcon contendo 40 mL de leite, (C) pipeta automática e ponteiros, (D) tubos para coleta de sangue, estéreis e capacidade para 5 mL, (E) tubo tipo Falcon contendo solução de azul de metileno (0,02%), (F) tubo tipo Falcon para depósito de antimicrobiano intramamário e (G) tubo de antimicrobiano intramamário.

Assim, quando o TRAM no tubo teste foi de 1,1 a 1,5, ou $\geq 1,6$ vezes o TRAM do tubo controle, foram classificadas como apresentando sensibilidade intermediária ou sensível, respectivamente, ao antimicrobiano presente no tubo teste (Figura 6). Quando o AM foi

reduzido em tempo igual ou menor ao obtido no tubo controle, as bactérias presentes na amostra foram consideradas resistentes ao respectivo antimicrobiano (Figura 7).

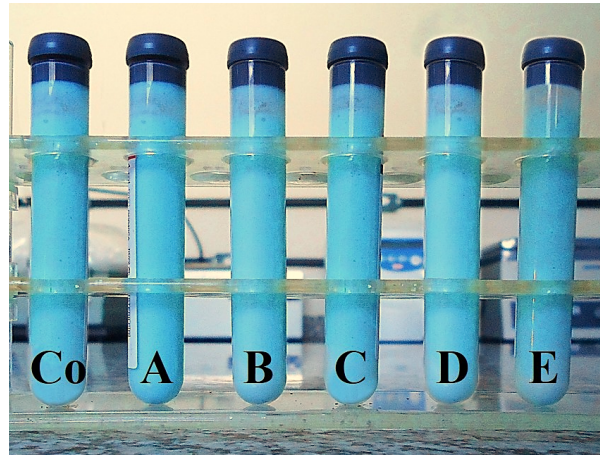


Figura 5: Prova da redutase adaptada no primeiro minuto após o início do teste. Observa-se que as amostras de leite no tubo controle (Co) e nos testes contendo gentamicina (A), cefoperazone (B), as associações espiramicina com neomicina (C), cefalexina com neomicina (D), e cloxacilina com ampicilina (E) apresentam-se com o corante na forma não reduzida.

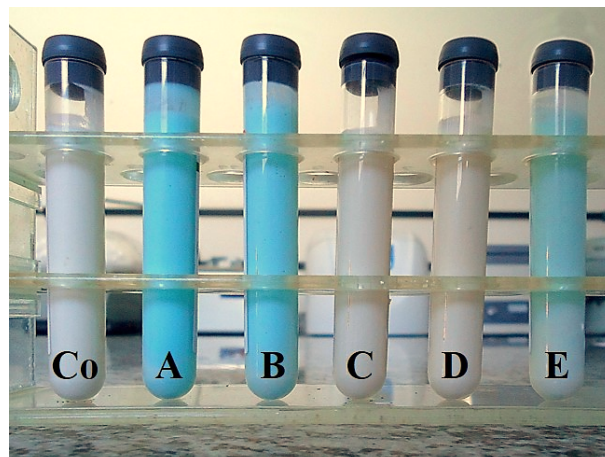


Figura 6: Prova da redutase adaptada 8 horas após início do teste. A redução no tubo controle (Co) ocorreu em 5 horas, e nos tubos testes contendo as associações espiramicina com neomicina (C) e cefalexina com neomicina (D), em 7 horas (indicando sensibilidade intermediária). A redução do corante nos tubos testes contendo gentamicina (A), cefoperazone (B) e cloxacilina com ampicilina (E) não foi observada até o momento.

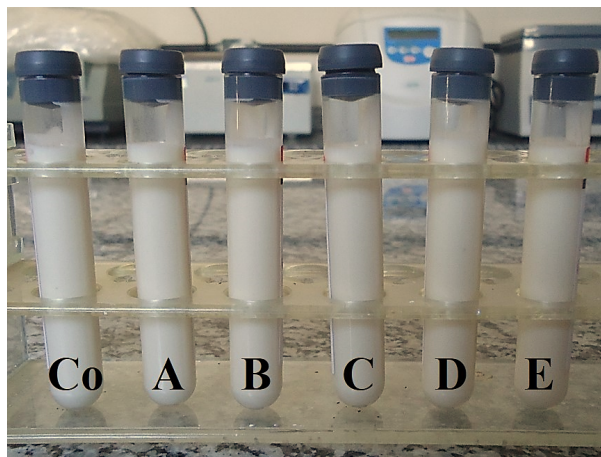


Figura 7: Prova da redutase adaptada 3 horas após início do teste. O azul de metileno foi reduzido nos tubos testes contendo gentamicina (A), cefoperazone (B), espiramicina com neomicina (C), cefalexina com neomicina (D), e cloxacilina com ampicilina (E) no mesmo tempo em que a redução ocorreu no tubo controle (Co).

3.8 Avaliação dos Resultados

O caso novo foi definido quando os sinais clínicos da mastite foram observados apenas no dia de inscrição do caso no estudo. O caso crônico foi definido quando, na primeira visita à propriedade pelo pesquisador, um quarto mamário foi diagnosticado com MC, no entanto este caso clínico foi diagnosticado e tratado anteriormente pelos funcionários, não resultando em melhora clínica.

A recidiva foi definida quando um segundo caso clínico ocorreu, no mesmo quarto mamário, no intervalo entre o fim do tratamento e a coleta da amostra PÓS.

S. aureus, *S. agalactiae* e *C. bovis* foram agrupados como bactérias de origem contagiosa. Outros agentes foram agrupados como ambientais/opportunistas.

Na avaliação do tratamento, a cura clínica foi definida quando o quarto mamário não apresentou sinais da MC, no período entre o fim do tratamento e o momento da coleta da amostra PÓS. A MSC foi considerada nos casos em que a cura clínica foi obtida, acompanhada de reação positiva pelo CMT. A ausência de infecção foi considerada nos casos em que a cura clínica foi obtida, acompanhada de reação negativa no CMT.

A cura bacteriológica foi definida para o quarto mamário cuja amostra de leite PÓS resultou em ausência de crescimento microbiano, independentemente do agente isolado na

amostra de leite PRÉ. A falha no tratamento foi definida quando o mesmo patógeno esteve presente tanto na amostra de leite PRÉ quanto na PÓS.

Para comparação com os resultados de susceptibilidade obtidos pela PRA, na avaliação da susceptibilidade antimicrobiana pelo TDD, cujas fórmulas dos antimicrobianos intramamários eram compostas por dois antimicrobianos, as bactérias foram consideradas: (1) sensíveis a estes produtos quando foram sensíveis a pelo menos um dos antimicrobianos presentes na composição, (2) com sensibilidade intermediária quando apresentaram sensibilidade intermediária aos dois antimicrobianos ou quando apresentaram sensibilidade intermediária a um e resistência ao outro antimicrobiano presente na composição, e (3) resistentes quando apresentaram resistência aos dois antimicrobianos presentes na composição (Quadro 04).

Quadro 04: Critério utilizado para definir a susceptibilidade antimicrobiana, pelo teste de disco difusão em ágar, para um antimicrobiano intramamário cuja fórmula é composta por dois antimicrobianos.

Antimicrobiano A	Antimicrobiano B	Susceptibilidade antimicrobiana geral ao antimicrobiano comercial
S	S	S
S	I	S
S	R	S
I	S	S
R	S	S
I	I	I
I	R	I
R	I	I
R	R	R

S = sensível. I = sensibilidade intermediária. R = resistente

Para as amostras que originaram culturas mistas, os resultados da susceptibilidade antimicrobiana de cada bactéria foram comparados para a obtenção da susceptibilidade antimicrobiana geral ao antimicrobiano intramamário comercial conforme critério apresentado no quadro 05.

Quadro 05: Critério utilizado para definir a susceptibilidade antimicrobiana geral, pelo teste de disco difusão em ágar, de bactérias oriundas de cultura mista a antimicrobianos intramamários comerciais.

Bactéria A	Bactéria B	Susceptibilidade antimicrobiana geral ao antimicrobiano comercial
S	S	S
S	I	I
I	S	I
I	I	I
S	R	R
I	R	R
R	S	R
R	I	R
R	R	R

S = sensível. I = sensibilidade intermediária. R = resistente

3.9 Análises Estatísticas

As análises descritivas e estatísticas foram efetuadas utilizando o programa “R” versão 3.0.2 (<http://www.r-project.org>) com nível de significância em 5% (valor de $P < 0,05$).

A normalidade dos dados quantitativos foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A comparação entre as medianas do tempo (em horas) em que os resultados foram obtidos pela PRA (= mediana do TRAM das amostras controle x 1,6) e TDD foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney. As médias das durações de tratamento foram comparadas através do teste T para amostras independentes.

As análises dos dados nominais e proporções de sensibilidade antimicrobiana foram comparadas entre si usando o teste de Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher. Os resultados do tratamento (variáveis resposta binomiais) avaliados foram: cura clínica e cura bacteriológica. As variáveis explanatórias foram: origem do agente (contagiosa ou ambiental/opportunista), coloração de Gram (positiva ou negativa), susceptibilidade antimicrobiana (sensível ou resistente) obtidos pelo TDD ou pela PRA.

A partir da comparação entre a susceptibilidade antimicrobiana (sensível ou resistente) obtidos no TDD ou na PRA e o resultado de tratamento foi calculada a sensibilidade, especificidade, valor preditivo sensível e valor preditivo resistente de cada teste de susceptibilidade (Quadro 06).

Quadro 06: Esquema simplificado do cálculo da validade de um teste em relação ao teste padrão ouro. Adaptado de Gordis (2004).

		Resultado de tratamento (Teste padrão ouro)		
		Sucesso	Insucesso	
Teste de susceptibilidade	Sensível	Verdadeiro sensível (VS)	Falso sensível (FS)	Valor preditivo sensível $VS / (VS + FS)$
	Resistente	Falso resistente (FR)	Verdadeiro resistente (VR)	Valor preditivo resistente $VR / (VR + FR)$
		Sensibilidade $VS / (VS + FR)$	Especificidade $VR / (VR + FS)$	

A acurácia da PRA e TDD foi definida como a proporção dos resultados que corretamente predisseram o resultado de tratamento: $Acurácia = (VS + VR) / (VS + FS + VR + FR)$. Adicionalmente, a taxa de resultados falso-sensíveis (probabilidade de um resultado indicando como sensível ao antimicrobiano utilizado no tratamento, agentes presentes em uma amostra oriunda de um caso onde a cura não foi obtida) e a taxa de resultados falso-resistentes (probabilidade de um resultado indicando como resistente ao antimicrobiano utilizado no tratamento, agentes presentes em uma amostra oriunda de um caso onde a cura foi obtida) foram determinadas (taxa de falso sensível = 1 - especificidade; taxa de falso resistente = 1 - sensibilidade). O coeficiente kappa de Cohen foi medido para avaliar a concordância real entre os resultados obtidos nos testes de susceptibilidade e a resposta de tratamento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Características da Produção

Em todas as propriedades era adotado um sistema de ordenha mecânica canalizada, realizada duas vezes ao dia (04:00 a 05:30 e 14:00 a 15:30h), sem a presença do bezerro, com a participação do proprietário e de funcionários contratados.

O leite produzido (450 a 1650 litros por dia segundo a propriedade) era armazenado em tanques de refrigeração individuais e coletados pelo caminhão tanque diariamente ou em dias alternados.

Os rebanhos eram compostos por animais holandeses ou mestiços (holandês x zebú), com vacas de diferentes idades, número e fases de lactação, mantidas a pasto e recebendo ração concentrada, cevada e polpa cítrica no cocho no momento da ordenha.

Com manejo nutricional e sanitário relativamente semelhantes, as condições gerais dos animais em lactação foram avaliadas como boas, sendo relatados casos de MC, aborto, retenção de placenta, doenças respiratórias e diarreia em bezerros, além de afecções digestivas e podais.

Em todas as propriedades, a ordem na ordenha era estabelecida por produção ou parição, independente da ocorrência de mastite. Registros sobre os casos e tratamentos não eram realizados. Durante a ordenha, em nenhuma propriedade as tarefas ou atividades eram pré-estabelecidas. Mesmo com mais de duas pessoas envolvidas na ordenha, a mesma pessoa era responsável pela contenção dos animais, colocação e retirada das teteiras. Adicionalmente não se observou o hábito de lavar as mãos antes ou durante a ordenha.

Todas as propriedades possuíam área de espera e sala de ordenha de dimensões adequadas ao número de animais. Os animais recebiam alimentos concentrados durante a ordenha, e as vacas permaneciam em espera após serem ordenhadas, mas somente em uma era fornecida ração após a ordenha.

Como medidas de controle e prevenção de mastite antes da ordenha, foram observadas: a lavagem dos tetos com água corrente em três (60%) das cinco propriedades e antissepsia com solução de hipoclorito de sódio comercial em duas (40%) das cinco propriedades. Em nenhuma das cinco propriedades era realizada a secagem dos tetos.

O teste para detecção de MC, com o auxílio da caneca de fundo escuro, não era realizado sistematicamente nas propriedades, sendo o diagnóstico realizado através da observação de alterações no leite, no piso ou na própria mão do ordenhador, e na glândula mamária, ou somente pela alteração na glândula mamária em quatro e uma das cinco propriedades, respectivamente.

A ausência de registro de informações sobre os casos clínicos e seus respectivos tratamentos, do diagnóstico da MSC (através do CMT ou CCS individual), da utilização de luvas durante a ordenha, da adoção de linha de ordenha e da segregação dos animais com MC foram comuns a todas as propriedades.

O uso de solução desinfetante após a ordenha (“post-dipping”) era adotado em todas as propriedades, porém foram observadas falhas como imersão de, aproximadamente, um terço da extensão do teto em duas (40%) das cinco, e a não realização em todos os tetos, motivada pela desatenção dos funcionários em três (60%) das cinco propriedades.

Em todas as propriedades eram realizados tratamentos contra MC durante a lactação, com antimicrobianos por via intramamária e/ou intramuscular e no período de secagem, com antimicrobianos intramamário específico para a fase de lactação, em todos os quartos funcionais.

A escolha do antimicrobiano era baseada em resultados de tratamentos anteriores (5/5), preço do produto (4/5) e menor período de descarte do leite (4/5). A escolha do produto não atendia a nenhum critério técnico, e eventualmente mais de um produto, contendo a mesma composição, era utilizado para tratamento do mesmo animal.

Embora muitos casos de MC tenham sido identificados, em todas as propriedades a prevalência da MC e subclínica eram desconhecidas.

As práticas relacionadas ao manejo de ordenha, controle e prevenção da mastite foram semelhantes entre as propriedades.

No conjunto, o manejo de ordenha e as medidas de higiene adotadas eram insatisfatórios, o que contribuiu para a identificação de um grande número de casos da mastite clínica nos rebanhos. Neste contexto, medidas simples como a adoção de linha de ordenha, e utilização sistemática e correta de desinfetantes de tetos pré e pós-ordenha poderiam ter um efeito significativo na prevenção de mastite como evidenciado por Souza et al. (2005a).

Como destacado por Dingwell et al. (2004), a higiene do ordenhador e os cuidados com os equipamentos de ordenha são importantes para evitar a transmissão de patógenos entre vacas e entre quartos da mesma vaca.

Na tabela 01 estão resumidas as informações sobre a qualidade do leite nas propriedades estudadas. As médias da CCS e CBT das amostras de leite dos tanques de expansão individuais nestas propriedades foram, respectivamente, de 1.121×10^3 céls./mL e 363×10^3 UFC/mL em 2012 e de 1.146×10^3 céls./mL e 316×10^3 UFC/mL em 2014, não sendo observadas diferenças consideráveis entre os valores, apesar dos dois anos de diferença. Os resultados das CCS entre as propriedades variaram entre 757 e 1.873×10^3 céls./mL em 2012 e entre 978 e 1.350×10^3 céls./mL em 2014, e das CBT entre 225 e 587×10^3 UFC/mL em 2012 e 207 e 426×10^3 UFC/mL.

Tabela 01: Contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) do leite do tanque de expansão de cinco propriedades no município de Resende, RJ em 2012 e 2014

Propriedade	CCS ($\times 10^3$ céls./mL)		CBT ($\times 10^3$ UFC/mL)	
	2012	2014	2012	2014
1	1.000	1.186	226	387
2	917	1.234	385	257
3	757	978	225	207
4	1.873	1.350	394	302
5	1.060	983	587	426
Média	1.121	1.146	363	316

UFC = unidades formadoras de colônia.

De acordo com a legislação vigente (IN 62/2011 - BRASIL, 2011), todos os valores de CCS obtidos estavam acima do limite estabelecido para o leite cru refrigerado (<600.000 céls./mL) no período.

Dentre as suas principais características, a IN 51/2002 estabeleceu critérios de higiene e saúde da glândula mamária, avaliados através da CBT e CCS do leite cru. Também determinou o resfriamento obrigatório na fazenda e estabeleceu limites para resíduos de antimicrobianos no leite, uma das preocupações quando há um grande número de casos de MC, o que demanda tratamento intramamário ou parenteral como informado neste estudo. Todas as propriedades estudadas dispunham de tanques de refrigeração individuais e adotavam algumas medidas de controle e profilaxia da mastite. Contudo, pode-se afirmar que

tais medidas eram ineficientes, tendo em vista a alta CCS no leite dos tanques de expansão e número de casos clínicos de MC registrados.

Ao considerar os valores da CBT estabelecidos a partir do segundo semestre de 2014 (<300.000 UFC/mL) a não conformidade seria observada em 60% das propriedades (propriedades 1, 4 e 5), indicando a necessidade de esforços para redução da carga microbiana do leite.

A não conformidade em relação aos critérios estabelecidos também foi confirmada em levantamentos realizados em diferentes regiões. Valores elevados de CCS e CBT foram descritos desde a entrada em vigor da IN 51/2002 (ARCURI et al., 2006; PINTO et al., 2006; BRAGA et al., 2006; BELOTI, et al 2011).

Segundo Lievaart et al. (2007), o leite do tanque de expansão, resultado da mistura do leite de todas as vacas em lactação, é um bom indicador da prevalência de mastite no rebanho. As elevadas CCS do leite do tanque de expansão das propriedades neste estudo indicam altas prevalências da MSC nos rebanhos. Uma CCS do tanque acima de 400.000 céls./mL indica, segundo Lievaart et al. (2007), que cerca de 25% das vacas apresentam MSC. Contagens maiores que 500.000 céls./mL como neste estudo indicam que pelo menos um terço das glândulas mamárias dos animais em lactação estão infectados.

O resultado no CMT apresenta uma correlação positiva com a CCS, permitindo fazer uma correspondência aproximada do número de células somáticas (RUEGG, 2003). Neste sentido, os produtores ao avaliarem periodicamente os animais e o leite do tanque, com o CMT, poderiam estabelecer medidas de controle e profilaxia da mastite, além de metas para a redução da CCS faltando, no entanto, orientação técnica para esta finalidade.

4.2 Características dos Casos da Mastite Clínica

No total, foram inscritos 246 casos de MC, sendo que a contribuição, com número de casos para o estudo, variou numericamente entre as propriedades. A propriedade 4 foi a que contribuiu com o maior número de casos (93/246, 37,8%), seguida das propriedades 2 (60/246, 24,4%), 5 (53/246, 21,5%), 3 (22/246, 8,9%) e 1 (18/246, 7,3%). O elevado número de casos inscritos no curto período corrobora a correlação entre a elevada CCS nos tanques e prevalência da mastite no rebanho, e também indica a possibilidade da incorporação do leite

de vacas com MC ao tanque, visto que o leite oriundo dessas vacas pode apresentar CCS acima de 500 mil céls./mL (RUEGG, 2003).

Nas propriedades estudadas, de aproximadamente 595 vacas em lactação no período, cerca de 10,3% (246/2380) dos quartos mamários foram diagnosticados com MC. Embora o dado não seja exato pela dinâmica dos rebanhos (partos, secagem, venda e abate de animais), a prevalência da MC nestas propriedades foi elevada quando comparada às relatadas por Pinheiro et al. (2009) em Bambuí – MG (7%), por Martins et al. (2010) no estado do Mato Grosso (5,8%), e por Ribeiro et al. (2006) no sul do Rio Grande do Sul (1,2%). O desconhecimento por parte dos produtores sobre a ocorrência da mastite nos respectivos rebanhos e falhas na detecção da MC podem justificar a alta prevalência da doença.

No geral, 73,9% (147/199) foram considerados casos novos e 26,1% (52/199) casos crônicos. Em 19,1% (47/246) dos casos registrados os produtores não souberam informar a duração da doença. A maioria dos casos manifestou-se na forma leve (226/246, 91,9%) caracterizada exclusivamente por alterações no leite. Sinais moderados da MC (com alteração do leite e da glândula mamária) foram observados em 8,1% (20/246) dos casos. Não ocorreram casos graves, com alterações sistêmicas e do estado geral, mas muitos casos (47/246, 19,1%) já existiam nas propriedades e não haviam sido diagnosticados pelo produtor, portanto o caráter agudo ou crônico não foi determinado nesses casos. Corroborando estes resultados, Pinzón-Sánchez e Ruegg (2011), estudando 266 casos da MC nos EUA, relataram 65%, 27% e 8% de casos clínicos apresentando sinais leves, moderados ou graves, respectivamente.

4.3 Agentes isolados

Do total de casos inscritos (n = 246), as amostras de 42 casos não foram submetidas à cultura microbiológica, pois não foram coletadas (n = 32) ou foram perdidas (n = 10). As amostras de leite PRÉ submetidas à cultura microbiológica (n = 204) foram caracterizadas como: contendo bactérias isoladas em cultura pura (117/204, 57,4%), sem crescimento (58/204, 28,4%), mista (21/204, 10,3%) ou contaminada (8/204, 3,9%) (Tabela 02).

Amostras de leite sem crescimento (28,4%) representaram grande parte dos resultados da cultura microbiológica sendo e estiveram de acordo com o reportado na literatura nacional e internacional. Em estudos recentes em rebanhos nacionais, aproximadamente 24%

(MARTINS et al., 2010), 25% (LANGONI et al., 2011) e 42% (RODRIGUES, 2008) das amostras de leite, oriundas de casos da MC, resultaram em ausência de crescimento. Olde Reikerink et al. (2008) destacaram que 44% das amostras de leite de casos de MC, em rebanhos no Canadá, resultaram na ausência de crescimento na cultura microbiológica. Em um estudo nos EUA, Makovec e Ruegg (2002) reportaram que o isolamento bacteriano pode não ser identificado em mais de 50% das amostras.

De acordo com Smith et al. (1985), a ausência de agentes patogênicos em amostras de leite procedentes de casos de MC pode ser o resultado da cura espontânea ou da ausência de microrganismos viáveis na amostra de leite. Segundo Brito (2009), este fato pode estar relacionado, a diferentes causas incluindo o uso recente de antimicrobianos, eliminação espontânea da infecção, baixa concentração dos patógenos no leite, localização intracelular de determinados patógenos e presença de substâncias inibitórias no leite. A coleta de amostras de leite de animais que não receberam nenhum tipo de terapia de antimicrobiana nos últimos 14 dias descartou a possibilidade de ausência de crescimento nas amostras motivada pela presença de resíduos de antimicrobianos.

Tabela 02: Diagnóstico microbiológico de amostras de leite provenientes de 204 quartos mamários de vacas com mastite clínica em cinco rebanhos leiteiros no Município de Resende-Rio de Janeiro

Diagnóstico microbiológico	Nº	%
Cultura pura ¹	117	57,4
Sem crescimento ²	58	28,4
Cultura mista ³	21	10,3
Contaminada ⁴	8	3,9
Total	204	100,0

¹Crescimento de pelo menos uma colônia na cultura. ²Ausência de crescimento na cultura. ³Crescimento de pelo menos uma colônia de dois tipos diferentes na mesma cultura. ⁴Crescimento de três ou mais tipos diferentes de colônias na mesma cultura.

O diagnóstico microbiológico como forma de se obter a indicação do tratamento foi prejudicado ou impedido em aproximadamente um terço das amostras (66/204, 32,4%) pelo fato de estarem contaminadas (8/204, 3,9%) ou pela ausência de crescimento na cultura (58/204, 28,4%). O número de amostras contaminadas foi baixo comparado aos resultados de outros estudos que indicaram 11,7% (OLIVEIRA et al., 2013) e 15,3% (MAKOVEC; RUEGG, 2003b) das amostras de leite com isolamento de mais de dois agentes diferentes na

mesma amostra. Os resultados comprovam a importância das medidas de higiene para coleta das amostras, cuja finalidade é tornar a definição da etiologia confiável.

Foi observada uma grande variedade de gêneros e espécies bacterianas (n = 19) isoladas a partir de 138 amostras de leite que resultaram em cultura pura ou mista (Tabela 03).

Tabela 03: Agentes microbianos isolados de amostras de leite provenientes de 138 quartos mamários de vacas com mastite clínica em cinco rebanhos leiteiros no Município de Resende-Rio de Janeiro, segundo origem do agente e resultado na cultura microbiológica

Agente isolado	Cultura microbiológica					
	Pura ¹		Mista ²		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>Streptococcus agalactiae</i>	47	40,2	8	19,0	55	34,6
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	12,0	8	19,0	22	13,8
Estafilococos coagulase negativos	18	15,4	3	7,1	21	13,2
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	2	1,7			2	1,3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5	4,3	1	2,4	6	3,8
<i>Staphylococcus hyicus</i>	3	2,6			3	1,9
<i>Staphylococcus warneri</i>	4	3,4			4	2,5
<i>Staphylococcus. haemolyticus</i>	4	3,4	2	4,8	6	3,8
<i>Escherichia coli</i>	9	7,7	6	14,3	15	9,4
<i>Corynebacterium bovis</i>	9	7,7			9	5,7
<i>Klebsiella</i> spp.	3	2,6	6	14,3	9	5,7
<i>Micrococcus</i> spp.	3	2,6	3	7,1	6	3,8
<i>Pseudomonas</i> spp.	3	2,6	3	7,1	6	3,8
<i>Trueperella pyogenes</i>	6	5,1			6	3,8
<i>Enterococcus</i> spp.	1	0,9	2	4,8	3	1,9
<i>Bacillus</i> sp.	1	0,9			1	0,6
<i>Serratia</i> sp.	1	0,9			1	0,6
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>			2	4,8	2	1,3
<i>Enterobacter</i> sp.			1	2,4	1	0,6
Levedura	1	0,9			1	0,6
<i>Streptococcus bovis</i>	1	0,9			1	0,6
Total	117	100,0	42	100,0	159	100,0

¹Crescimento de pelo menos uma colônia na cultura. ²Crescimento de pelo menos uma colônia de dois tipos diferentes na mesma cultura.

No geral, 62,3% (86/138) dos casos que resultaram no isolamento de um ou dois agentes foram causados por *S. aureus*, *S. agalactiae* e *C. bovis* (bactérias de origem contagiosa). Langoni et al. (2011) e Brito et al. (1999) destacaram a alta prevalência destes

agentes em rebanhos leiteiros e sugeriram que medidas de controle da doença não estavam sendo implementadas, assim como nos rebanhos avaliados no presente estudo.

Vinte e uma amostras resultaram em culturas mistas (Tabela 04), com o isolamento de 11 agentes bacterianos, sendo o *S. aureus* (8/21, 38,1%) e o *S. agalactiae* (8/21, 38,1%) os agentes com maior frequência de isolamentos, seguidos por *E. coli* (6/21, 28,6%) e *Klebsiella* spp. (6/21, 28,6%).

Dos agentes isolados em cultura pura e mista, os mais prevalentes foram o *S. agalactiae* (34,6%) e *S. aureus* (13,8%), seguidos por agentes do grupo dos ECN (13,2%) e *E. coli* (9,4%).

Tabela 04: Diagnóstico microbiológico de amostras de leite provenientes de 21 quartos mamários de vacas com mastite clínica, em que se obteve isolamento de dois agentes etiológicos (infecção/cultura mista), em cinco rebanhos leiteiros no Município de Resende-RJ

Agente isolado A	Agente isolado B	Nº	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Micrococcus</i> sp.	3	14,3
<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2	9,5
<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.	2	9,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella</i> sp.	2	9,5
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	2	9,5
<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	1	4,8
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	4,8
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	4,8
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Enterobacter</i> sp.	1	4,8
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Klebsiella</i> sp.	1	4,8
<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella</i> sp.	1	4,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	4,8
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1	4,8
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	4,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1	4,8
Total		21	100,0

Os resultados observados para *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. reforçam a importância desses agentes na etiologia da mastite, concordando com o verificado por diferentes autores (PINHEIRO et al., 2009; MARTINS et al., 2010; MOTA et al., 2012). Outros autores (BELOTI et al., 1997; MARTINS et al. 2010; LANGONI et al., 2011) ressaltaram a importância do *S. agalactiae*, *S. aureus* e *C. bovis* na etiologia da mastite

bovina. Brito et al. (1999), Rodrigues (2008) e Martins et al. (2010) também apontaram o *S. aureus* e *S. agalactiae* como os principais microrganismos associados a casos de mastite bovina.

A frequência de isolamento de *S. agalactiae* (34,6%) no presente estudo foi superior à frequência de 23% reportada por Brito et al. (1999) ao estudarem 48 rebanhos em Minas Gerais. Este agente foi evidenciado como um importante patógeno de MC nos rebanhos do presente estudo confirmando sua relevância como um dos mais importantes agentes etiológicos da doença e associação com a elevada CCS no leite (SOUZA et al., 2009).

Embora *S. aureus* tenha sido um dos agentes mais frequentes neste estudo, a porcentagem obtida (13,8%) foi bastante inferior aos 70,9% encontrados por Zanette et al. (2010) em amostras de leite de vacas com suspeita de mastite, aos 74,6% identificados por Ferreira et al. (2007) e aos 60,32% observados por Saeki et al. (2011) em vacas com MC.

Microrganismos do gênero *Staphylococcus* spp. representaram 13,2% dos isolamentos, coerente com dados reportados na literatura (MARTINS et al, 2010; OLIVEIRA et al, 2010; BANDOCH; MELO, 2011, SAEKI et al., 2011; MOTA et al., 2012), que variam entre 9,1 e 85,9%.

ECN foi o terceiro grupo de maior prevalência na etiologia dos casos estudados (13,2%). Em estudos anteriores, a prevalência das infecções intramamárias causadas por ECN apresentou diferenças em diversas regiões brasileiras. Martins et al. (2010) isolaram ECN em 4% das amostras oriundas de casos clínicos na região de Cuiabá. Concordando com os achados no presente estudo, Chagas et al. (2012) isolaram ECN em 15% das amostras de leite de vacas com mastite em uma propriedade rural no município de Indianópolis, Minas Gerais.

Outros pesquisadores reportaram prevalências superiores à encontrada no presente estudo. Em Rondon do Pará, Oliveira et al. (2011) isolaram ECN em 25% dos casos clínicos. ECN foram isolados em 69% das amostras ao longo dos 120 dias pós-parto (LAFFRANCHI et al., 2001) e em 64% das amostras de leite colhidas na primeira ordenha e no sétimo dia após o parto (PARDO et al., 1998).

Luheis (2011) descreveu a identificação de 97 cepas de ECN causadoras de MSC, isoladas de dez rebanhos bovinos do Estado de São Paulo. No presente estudo, as 5 espécies de ECN (*S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hyicus* e *S. chromogenes*) identificadas foram relatadas por Langoni et al. (2011) e Chagas et al. (2012) pelo frequente envolvimento em casos de mastite.

Considerados por muito tempo como agentes pouco patogênicos para a glândula mamária de bovinos, ECN passaram a ser considerados como patógenos emergentes da mastite, sobretudo para vacas primíparas e em rebanhos nos quais as infecções por *S. aureus* e *S. agalactiae* foram controladas (SEARS; MCCARTHY, 2003; TENHAGEN et al., 2006).

Como destacado por Pyörälä e Taponen (2009), o isolamento de ECN em amostras de leite de vacas com MC e subclínica nem sempre significa que estes sejam os responsáveis pela infecção, podendo ser resultado da contaminação da amostra com microrganismos presentes na pele dos tetos.

C. bovis e *Klebsiella* spp. representaram juntos 11,4% (18/159) dos agentes isolados. Os gêneros *Enterobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Serratia* sp., *Bacillus* sp. e as espécies *S. dysgalactiae* e *S. bovis* foram isolados em pequeno número de amostras. Mota et al. (2012) relataram a elevada prevalência de infecções intramamárias por *Corynebacterium* spp., que neste estudo foi isolado em apenas nove das 204 amostras submetidas à cultura microbiológica e representou 5,7% dos agentes isolados. A baixa prevalência de *Corynebacterium* spp. difere do observado em estudos conduzidos em diferentes regiões do Brasil (FILIPPSEN, 1999; BARBALHO; MOTA, 2001; BUENO et al., 2003; FERREIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009, 2010, 2011; MARTINS et al., 2010; MOTA et al., 2011).

4.4 Susceptibilidade Antimicrobiana - Teste de Disco Difusão em Ágar

No geral, as maiores porcentagens de sensibilidade foram observadas para enrofloxacina (100%), ceftiofur (99%) e cefalotina (91%).

Outros antimicrobianos com boa eficácia contra os agentes isolados foram sulfametoxazol com trimetoprim (87%) e gentamicina (82%). Os menores resultados foram observados para tetraciclina (62%) e neomicina (63%) (Tabela 05).

As menores porcentagens de sensibilidade foram observadas para bactérias Gram negativas, especialmente para oxacilina (10%), ampicilina (27%), tetraciclina (33%) e gentamicina (34%). Os mesmos antimicrobianos tiveram boa eficácia contra agentes Gram positivos, variando entre 68 (tetraciclina) e 97% (oxacilina).

Não houve diferença significativa entre bactérias Gram positivas e negativas sensíveis aos antimicrobianos enrofloxacina ($P = 1,000$), espiramicina ($P = 0,599$), neomicina ($P = 0,895$) e a associação sulfametoxazol com trimetoprim ($P = 0,305$).

Tabela 05: Sensibilidade antimicrobiana *in vitro* (teste de disco difusão em ágar) de bactérias Gram positivas e Gram negativas isoladas de amostras de leite de vacas com mastite clínica em cinco rebanhos bovinos no município de Resende, RJ

Antimicrobiano	Gram positivas		Gram negativas		P-valor ¹	Todas	
	Nº	%	Nº	%		Nº	%
Ampicilina	102	86	8	27	<0,001	110	74
Cefalotina	118	94	25	78	0,011	143	91
Ceftiofur	119	100	28	93	0,039	147	99
Enrofloxacina	119	100	30	100	1,000	149	100
Espiramicina	54	73	21	81	0,599	75	75
Gentamicina	118	94	11	34	<0,001	129	82
Neomicina	79	63	20	63	0,895	99	63
Oxacilina	115	97	3	10	<0,001	118	79
Sulfatrim ²	106	89	24	80	0,305	130	87
Tetraciclina	83	68	10	33	0,001	93	62

¹Teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher. ²Sulfametoxazol com trimetoprim.

Na tabela 6, observa-se a porcentagem de sensibilidade antimicrobiana pelo TDD de 157 bactérias isoladas de amostras de leite de vacas com MC.

Tabela 06: Sensibilidade antimicrobiana, pelo teste de disco difusão em ágar, de bactérias isoladas de amostras de leite de vacas com mastite clínica

Agente isolado	Nº	Porcentagem de bactérias sensíveis									
		AM	CFL	CN	CTF	ENO	ESP	NEO	OXA	SUT	TE
<i>C. bovis</i>	9	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Estrep. ambientais ¹	6	100	100	100	100	100	100	67	100	17	100
<i>E. coli</i>	15	23	93	53	100	100	92	100	8	100	46
ECN ²	21	95	95	95	100	100	100	90	95	100	81
<i>Enterobacter</i> sp.	1	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100
<i>Klebsiella</i> spp.	9	33	67	22	100	100	100	33	22	100	22
<i>Micrococcus</i> spp.	6	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Pseudomonas</i> spp.	6	0	67	0	67	100	0	0	0	0	0
<i>S. agalactiae</i>	55	100	100	100	100	100	100	35	100	85	42
<i>S. aureus</i>	22	27	100	100	100	100	36	100	86	100	100
<i>S. marcescens</i>	1	100	0	0	100	100	100	100	0	100	100
<i>T. pyogenes</i>	6	–	0	0	–	–	0	0	–	–	–

¹*Enterococcus* spp. (n = 3), *S. dysgalactiae* (n = 2) e *S. bovis* (n = 1) foram agrupados como estreptococos ambientais. ²*S. epidermidis* (n = 6), *S. haemolyticus* (n = 6), *S. warneri* (n = 4), *S. hyicus* (n = 3) e *S. chromogenes* (n = 2) foram agrupados como estafilococos coagulase negativos. AM = ampicilina. CFL = cefalotina. CN = gentamicina. CTF = ceftiofur. ENO = enrofloxacina. ESP = espiramicina. NEO = neomicina. OXA = oxacilina. SUT = sulfametoxazol com trimetoprim. TE = tetraciclina. Traço (–) indica que o agente isolado não foi testado contra o antimicrobiano indicado.

Das amostras de *S. aureus*, todas foram sensíveis para cefalotina, gentamicina, ceftiofur, enrofloxacina, neomicina, sulfametoxazol com trimetoprim e tetraciclina. A oxacilina apresentou boa eficácia *in vitro* com 86% das amostras sensíveis. Em discordância com os resultados obtidos para cefalotina e ceftiofur, Souza et al. (2005b) relataram que estafilococos isolados do leite de vacas com mastite quase sempre apresentam altos índices de resistência aos antibióticos β -lactâmicos.

S. aureus apresentaram resistência para ampicilina (16/22, 73%), espiramicina (14/22, 64%) e oxacilina (3/22, 14%).

Chagas et al. (2012) verificaram que 100% dos estafilococos foram sensíveis para gentamicina e ciprofloxacina, entretanto resistentes para tetraciclina e oxacilina. Os resultados obtidos no presente estudo, para gentamicina (100%) e fluoroquinolonas (enrofloxacina) (100%), corroboram esta informação, com altos índices de sensibilidade obtidos para ambos, no entanto contrariam os resultados obtidos para tetraciclina, onde não foi observada resistência e para oxacilina com 86% de sensibilidade observada.

As amostras de *S. agalactiae* foram 100% sensíveis a sete (70%) dos 10 antimicrobianos testados e apresentou boa sensibilidade para sulfametoxazol com trimetoprim (85%). Baixa sensibilidade foi observada somente para tetraciclina (42%) e neomicina (35%).

E. coli apresentou 100% de sensibilidade para quatro (40%) dos 10 antimicrobianos testados. Diferentes porcentagens de sensibilidade foram obtidas para seis antimicrobianos. Os antimicrobianos com menor eficácia contra este agente foram a oxacilina (8%), ampicilina (23%) e tetraciclina (46%). A cefalotina e a espiramicina apresentaram boa eficácia contra 93% e 92%, respectivamente, das amostras isoladas.

Moreira et al. (2008) caracterizaram a resistência de *E. coli* isoladas de mastite bovina envolvendo a neomicina, gentamicina e tetraciclina. Igualmente ao observado por estes autores, *E. coli* isoladas no presente estudo foram, em grande parte, resistentes para gentamicina e tetraciclina. Zanette et al. (2010) coletaram 55 amostras de leite de vacas com suspeita de mastite e encontraram 31% de resistência para tetraciclina. A proporção de resistência para este antimicrobiano foi maior no presente estudo.

Amostras de ECN foram 100% sensíveis a quatro (40%) dos 10 antimicrobianos testados. Boa eficácia *in vitro* foi observada para seis antimicrobianos: ampicilina (95%), cefalotina (95%), gentamicina (95%), oxacilina (95%), neomicina (90%) e tetraciclina (81%).

Os *S. warneri* (n = 4), *S. hyicus* (n = 3) e *S. chromogenes* (n = 2) isolados foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados.

Resultados divergentes foram obtidos por Machado et al. (2008) que ao avaliarem a susceptibilidade *in vitro* de ECN isolados de leite de vacas com MC ou subclínica observaram elevada resistência para ampicilina (85%), oxacilina (80%), gentamicina (44%), neomicina (59%) e sulfametoxazol com trimetoprim (52%). Freitas et al. (2005) avaliaram o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de 59 cepas de ECP isoladas de amostras de leite de vacas com mastite do Estado de Pernambuco obtendo para a associação sulfametoxazol com trimetoprim a maior taxa de sensibilidade (95%), semelhante ao presente estudo.

E. coli, *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas* spp., bactérias Gram negativas de origem ambiental apresentaram baixa sensibilidade a um grande número de antimicrobianos e associações testadas, no entanto todas foram sensíveis a enrofloxacina. Nenhuma das seis amostras de *Pseudomonas* spp. foi sensível a sete (70%) dos 10 antimicrobianos testados. Todas as amostras de *C. bovis* (n = 9) e *Micrococcus* spp. (n = 6) apresentaram 100% de sensibilidade a todos (n = 20) os antimicrobianos testados.

Bactérias identificadas como *Trueperella pyogenes* foram testadas apenas contra cefalotina, gentamicina, espiramicina e neomicina, não sendo evidenciada sensibilidade aos quatro (100%) antimicrobianos testados.

4.5 Susceptibilidade Antimicrobiana – Prova da Redutase Adaptada

No geral, os resultados de susceptibilidade foram obtidos em tempo significativamente menor pela PRA (11 horas) comparado ao TDD (144 horas = 6 dias) ($P < 0,001$). Das amostras submetidas à PRA, 9,1% (13/143) não reduziram o AM dentro do período de observação (48 horas), tanto nos tubos controles quanto nos respectivos testes. Nesses casos não foi possível obter o resultado de susceptibilidade antimicrobiana pela PRA. O fato de apenas 13 em 143 amostras não reduzirem o AM no período de 48 horas contraria os relatos de Nero et al. (2000) e Pereira et al. (2012) sobre a interferência de leucócitos, presentes nas amostras de leite, sobre os testes de redução. De acordo com Nero et al. (2000), o elevado número de resultados falso-positivos no teste de redução poderia ser justificado pelo forte caráter redutor dos leucócitos presentes nas amostras. Assim, seria esperado que todas as

amostras submetidas à PRA apresentassem redução do AM, uma vez que todas foram oriundas de casos de MC e com elevadas CCS, sobretudo leucócitos.

Das amostras que não reduziram o AM dentro do período de observação, 53,8% (7/13) não resultaram em isolamento do agente na cultura microbiológica, não sendo possível avaliar a susceptibilidade também pelo TDD. Conforme Hobbs (1939), o crescimento em placa ocorre pelas bactérias viáveis que irão crescer, de acordo com as condições de cultivo, e a prova de redução do AM avalia o grau de atividade das bactérias presentes na amostra, nas condições do teste, sendo em algumas condições mais adequada para avaliar a atividade bacteriana na amostra, o que pode explicar a ausência de redução nesses casos.

Como não foi necessário o isolamento microbiológico na PRA, a susceptibilidade antimicrobiana pela PRA foi obtida também a partir de amostras que não resultaram em isolamento do agente em cultura em placa. No entanto, não houve diferença significativa entre as taxas de sensibilidade obtidas na PRA em amostras com e sem crescimento microbiológico em placa (Tabela 07).

Tabela 07: Sensibilidade antimicrobiana de amostras de leite de vacas com mastite clínica, avaliada pela prova da redutase adaptada (PRA) para seis antimicrobianos intramamários, em relação ao resultado na cultura microbiológica

Antimicrobiano	Cultura microbiológica				P-valor ¹
	Com crescimento		Sem crescimento		
	Nº (%)	Total	Nº (%)	Total	
Gentamicina	73 (75,3)	97	26 (72,2)	36	0,894
Cefoperazone	72 (67,9)	106	27 (73,0)	37	0,714
Cefquinoma	64 (78,0)	82	24 (80,0)	30	0,970
Cloxacilina com ampicilina	64 (77,1)	83	24 (82,8)	29	0,707
Cefalexina com neomicina	31 (63,3)	49	8 (53,3)	15	0,698
Espiramicina com neomicina	9 (52,9)	17	1 (16,7)	6	0,179

¹Teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher.

A comparação entre as taxas de sensibilidade obtidas nos testes (TDD e PRA) foram realizadas com dados da sensibilidade de amostras que resultaram em culturas puras ou mistas.

No geral, maiores taxas de sensibilidade foram obtidas na avaliação pelo TDD quando comparadas com as taxas obtidas pela PRA para os mesmos antimicrobianos. As taxas de sensibilidade avaliadas pela PRA e TDD para os antimicrobianos: gentamicina (74,4% - PRA;

82,2% - TDD) e a associação de cloxacilina com ampicilina (78,6% - PRA; 84,6% - TDD), foram equivalentes ($P > 0,05$). Para o cefoperazone, cefquinoma, associações de cefalexina com neomicina, e cefalexina com neomicina as diferenças de sensibilidade entre os testes foram significativas ($P < 0,05$) (Tabela 08).

Em semelhança aos resultados de sensibilidade obtidos no presente estudo, alguns autores (MYLLYS et al., 1992; LOUHI et al., 1992; OWENS et al., 1993; LOUHI-LEHTIÖ et al., 1994; FANG; PYÖRÄLÄ, 1996) relataram que antimicrobianos da classe dos macrolídeos, aminoglicosídeos, β -lactâmicos e quinolonas podem apresentar atividade reduzida no leite.

Tabela 08: Sensibilidade antimicrobiana de amostras de leite de vacas com mastite clínica, avaliada pela prova da redutase adaptada (PRA) e teste de disco difusão em ágar (TDD) para diferentes antimicrobianos

Antimicrobiano	PRA		TDD		P-valor ¹
	Nº (%)	Total	Nº (%)	Total	
Gentamicina	99 (74,4)	133	129 (82,2)	157	0,145
Cefoperazone	99 (69,2)	143	145 (92,4)	157	<0,001
Cefquinoma	88 (78,6)	112	55 (96,5)	57	0,005
Cloxacilina com ampicilina	88 (78,6)	112	126 (84,6)	149	0,278
Cefalexina com neomicina	39 (60,9)	64	146 (93,0)	157	<0,001
Espiramicina com neomicina	10 (43,5)	23	110 (91,7)	120	<0,001

¹Teste do Qui-quadrado.

Louhi et al. (1992) ao testarem quatro cepas de *S. aureus* sensíveis a 16 antimicrobianos observaram que para obter uma atividade supressora equivalente, culturas de leite necessitaram de concentrações maiores dos antimicrobianos do que as respectivas culturas em caldo com resazurina. Louhi-Lehtiö et al. (1994) relataram que a atividade antibacteriana da espiramicina, ampicilina e da associação trimetoprim com sulfadoxina diminuiu significativamente quando caldo nutriente foi substituído por leite. Em outro estudo, Fang e Pyörälä (1996) observaram que a susceptibilidade antimicrobiana de isolados de *E. coli* contra a tetraciclina, as associações trimetoprim com sulfadoxina, e ampicilina com enrofloxacina foi significativamente menor em testes de susceptibilidade *in vitro* realizados no leite do que em meio de cultura artificial.

Segundo Fang e Pyörälä (1996) o leite de quartos mamários com mastite possui fagócitos e altas concentrações de elementos (complemento, lisozima, lactoferrina e

imunoglobulina) importantes nos mecanismos de defesa da glândula mamária que podem interagir com os antimicrobianos afetando o resultado do tratamento, e contribuindo para a divergência entre os resultados *in vitro* e *in vivo*. Assim, considera-se que estes mesmos elementos estariam presentes no leite por ocasião do teste de susceptibilidade pela PRA, o que poderia contribuir para uma maior acurácia do resultado obtido pelo teste. Os mesmos pesquisadores sugeriram que a qualidade nutricional do meio de cultura seria um fator importante para o resultado no teste de susceptibilidade. Também neste caso, a utilização do leite na avaliação da susceptibilidade pela PRA seria benéfica, pelo fato do leite ser rico em nutrientes, e adequado ao desenvolvimento dos microrganismos que estão adaptados ao crescimento no leite como indicado por Cousins e Bramley (1987).

Os antimicrobianos testados na PRA foram aqueles disponíveis para a administração intramamária, contendo um ou mais antimicrobianos em sua composição. Assim, os resultados de susceptibilidade obtidos pela PRA para os produtos contendo espiramicina com neomicina, cefalexina com neomicina, e cloxacilina com ampicilina representaram o efeito da ação combinada destes antimicrobianos sobre as bactérias presentes nas amostras. Para o resultado obtido pelo TDD foi necessária a interpretação dos resultados individuais para cada antimicrobiano, uma vez que a combinação destes antimicrobianos, não estão disponíveis nos laboratórios de diagnóstico.

Thornsberry et al. (1997) observaram que os testes individuais de antimicrobianos podem não representar precisamente a ação combinada entre eles. Em adição, Owens et al. (1997) relataram que a susceptibilidade *in vitro*, de diferentes espécies bacterianas isoladas de casos da mastite, foi maior para a combinação de antimicrobianos quando comparada com resultados de antimicrobianos individuais, sugerindo um efeito aditivo da combinação. O efeito da ação individual ou combinada de antimicrobianos sobre a susceptibilidade antimicrobiana de patógenos causadores da mastite não foi especificamente avaliada neste estudo, porém na PRA, foram testados três produtos com associação de antimicrobianos (cloxacilina com ampicilina, cefalexina com neomicina, e cefalexina com neomicina), conforme disponíveis para o tratamento intramamário, o que pode ter significado um resultado mais adequado da susceptibilidade para agentes etiológicos da mastite.

4.6 Características dos Protocolos de Tratamento

Para avaliação dos resultados de tratamento, dos casos de MC inscritos no amplo estudo (n = 246), foram excluídos os casos cujas vacas não receberam tratamento antimicrobiano intramamário (n = 8), foram vendidas (n = 7), tiveram a lactação interrompida (secagem) (n = 3) ou morreu (n = 1) antes da avaliação do tratamento. Desta forma, fizeram parte deste estudo 227 casos clínicos de mastite.

Dos 227 casos clínicos selecionados para este estudo, 135 foram inscritos no P1 e 92 no P2.

Dos antimicrobianos intramamários utilizados nos tratamentos, os produtos comerciais contendo gentamicina (107/227, 47,1%) ou cefoperazone (63/227, 27,8%) foram utilizados com maior frequência, seguidos por cloxacilina com ampicilina (20/227, 8,8%), espiramicina com neomicina (16/227, 7,0%), cefalexina com neomicina (14/227, 6,2%) e cefquinoma (7/227, 3,1%).

O maior uso de produtos contendo gentamicina ou cefoperazone foi condizente com o histórico de uso de medicamentos nas propriedades e com os antimicrobianos indicados para o tratamento intramamário de vacas com mastite na lactação (SANTOS; FONSECA, 2007), e também ocorreu em função da maior disponibilidade destes produtos no comércio local. Em concordância com o uso destes produtos, Pontes Netto et al. (2005) evidenciaram um maior uso de aminoglicosídeos e β -lactâmicos em rebanhos leiteiros.

Produtos contendo gentamicina, cefoperazone ou a associação cloxacilina com ampicilina foram utilizados tanto no P1 (n = 61, 29 e 8, respectivamente) quanto no P2 (n = 46, 34 e 12, respectivamente). Produtos compostos pelas associações espiramicina com neomicina (n = 16), cefalexina com neomicina (n = 14), ou por cefquinoma (n = 7) foram utilizados somente no protocolo 1.

Em dois rebanhos foi observado o uso de um produto contendo a associação espiramicina (bacteriostático) com neomicina (bactericida) no tratamento de 16 dos 135 (11,9%) casos clínicos no P1. Segundo Kherli e Harp (2001), pelo fato da fagocitose estar diminuída na glândula mamária durante um caso de mastite, deve-se optar pelo uso de um antimicrobiano com ação bactericida, ao invés de bacteriostática.

Geralmente, os fabricantes recomendam para a terapia dos casos de MC o uso dos antimicrobianos intramamários em aplicações de um a três dias consecutivos, mantendo-se o

tratamento após o desaparecimento dos sintomas, durante um período não inferior a 48 horas. Desta forma, no P1 foi instituída a terapia mínima recomendada por 3 dias (tratamento convencional) e no P2 optou-se pela terapia com administração intramamária até um dia após o desaparecimento dos sinais clínicos da MC e no máximo por nove dias (tratamento estendido). Tratamentos mais longos são geralmente associados a uma maior probabilidade de cura (SOL et al., 2000; GILLESPIE et al., 2002). A duração do tratamento realizada no P2 foi baseada nos resultados obtidos por Gillespie et al. (2005).

Dos casos inscritos no P2, a duração média do tratamento foi de 5,2 dias e variou entre 3 e 9 dias. A duração do tratamento não variou significativamente entre as propriedades 2 (4,2 dias) e 4 (5,2 dias) ($P = 0,170$), nem entre os casos com manifestações leves (5,1 dias) ou moderadas (5,6 dias) ($P = 0,502$). Diferença significativa também não foi observada na duração do tratamento entre casos que resultaram ou não na cura clínica (5,2 contra 4,9 dias, $P = 0,621$) ou cura bacteriológica (5,3 contra 4,9 dias, $P = 0,399$).

No geral, o tratamento estendido (5,2 dias) durou 2 dias a mais que o convencional (3 dias), o que contribuiu para o descarte do leite de mais quatro ordenhas em comparação com o tratamento convencional, representando para os produtores uma perda maior, além do custo do tratamento prolongado.

As proporções de cura clínica e bacteriológica obtidas no P1 foram de 68,9% (93/135) e 26,9% (18/67), respectivamente, e no P2 foram de 87,0% (80/92) e 60,8% (48/79), respectivamente.

Do total de casos tratados de forma convencional e que foram associados ao isolamento de *S. aureus* em cultura pura, 28,6% (4/14) resultaram em cura bacteriológica, sendo este valor próximo ao encontrado por Rodrigues (2008) (33%) utilizando cefquinoma no tratamento estendido por 6 dias, e inferior ao relatado por Langoni et al. (2000a) (67%) após tratamento convencional com amoxicilina. A cura bacteriológica dos casos onde o *S. aureus* foi o único agente isolado mostrou-se satisfatória, pela equivalência com dados de Rodrigues (2008) com o tratamento estendido. Não foram registrados casos por *S. aureus* no período em que os animais foram tratados com o tratamento estendido (P2).

Mastites causadas por *S. agalactiae* e que receberam tratamento estendido com gentamicina resultaram em 66,7% (16/24) de cura bacteriológica, valor semelhante ao relatado por Langoni et al. (2000b) (60%) utilizando enrofloxacin no tratamento convencional.

Em conformidade com o que foi apontado por Freitas et al. (2005), no presente estudo foi comum o relato da troca de medicamentos, para outro produto contendo o mesmo princípio ativo, mediante resultado insatisfatório no tratamento. A gentamicina, um dos produtos mais usados nas propriedades em estudo, é a base de pelo menos seis antimicrobianos intramamários comerciais (Genta F®, Gentatec Mastite®, Mastifin®, Mastilac®, Mastizone Plus Lactação® e Topmast®). Essa variedade de nomes comerciais para produtos com a mesma composição é um problema para o pecuarista, podendo contribuir para a falha nos tratamentos.

4.7 Cura Clínica

A cura clínica, definida como o retorno da secreção normal do leite e o desaparecimento dos sinais clínicos de inflamação (SCHUKKEN; DELUYKER, 1995), foi obtida em 76,2% (173/227) dos casos após o tratamento intramamário, sendo 68,9% (93/135) no P1 e 87,0% (80/92) no P2.

A proporção de cura clínica no P1 (68,9%) foi semelhante à reportada por Guterbock et al. (1993) para casos clínicos tratados convencionalmente com cefapirina ou amoxicilina (66,7% e 67,6%, respectivamente) e por Maiolino et al. (2013) (70%) utilizando gentamicina no tratamento convencional. Por outro lado, no mesmo estudo, Maiolino et al. (2013) obtiveram taxas de cura obtidas no tratamento com cefoperazone (50%) e ciprofloxacina (50%) inferiores à taxa obtida no presente estudo.

No P2, a proporção de cura obtida (87,0%) foi superior à relatada por Roy et al. (2009) (77,6%) ao determinarem a eficácia do tratamento estendido, por 5 dias, com cefapirina em vacas leiteiras cronicamente infectadas por *S. aureus*.

Em outros estudos foram relatadas proporções semelhante às obtidas no presente estudo (MCDOUGALL et al., 2007; MAIOLINO et al. 2013). McDougall et al. (2007) após tratamento convencional com penicilina procaína (86%), cefuroxima (80%), uma cefalosporina de 2ª geração, e uma combinação de penicilina procaína e dihidroestreptomicina (84%), e por Maiolino et al. (2013) no tratamento estendido com cefoperazone (90%) ou ciprofloxacina (80%).

A reação negativa no CMT foi observada em 22,5% (51/227) dos casos após o tratamento, sendo 5,9% (8/135) no P1 e 46,7% (43/92) no P2. No geral, 53,7% (122/227) dos

casos assumiram a forma subclínica da doença após o tratamento, sendo 63,0% (85/135) no P1 e 40,2% (37/92) no P2. A forma subclínica foi avaliada por qualquer reação positiva CMT, representando parte dos casos de cura clínica pelo fato de não terem sido evidenciadas alterações macroscópicas no leite após o tratamento. Como sugerido por Erskine et al. (1993) e Costa (2002), o sucesso terapêutico pode ser melhor avaliado pela ausência dos sintomas clínicos da mastite do que pela eliminação total do patógeno. Em geral, exceto em condições experimentais, não se avalia o resultado do tratamento da mastite pela redução na CCS e/ou eliminação do agente, mas sim pelo retorno ao aspecto normal e comercialização do leite produzido. Nesse sentido, os resultados foram favoráveis. Corroborando estas observações, Pol e Ruegg (2007a) relataram que 75% dos produtores, que participaram de um estudo sobre práticas de tratamento em rebanhos leiteiros, avaliaram a cura da doença pela observação do leite com aspecto normal.

Os produtores muitas vezes associam as perdas econômicas ao leite total descartado devido ao tratamento contra mastite, independentemente do quarto mamário afetado e sua recuperação. No entanto, os registros de informações individuais sobre o quarto afetado e patógenos isolados seriam úteis para as decisões terapêuticas futuras. Em alguns casos, a secagem do quarto mamário cronicamente infectado poderia ser o tratamento ideal quando comparado com tratamentos repetitivos com baixa resposta às terapias antimicrobianas (PINZÓN-SÁNCHEZ; RUEGG, 2011).

Insucesso no tratamento (23,8%, 54/227) foi observado em 31,1% (42/135) dos casos no P1 e em 13,0% (12/92) no P2, a maioria relacionados às recidivas (24/42, 57,1% no P1; 8/12, 66,7% no P2) que têm sido descritas quando um segundo caso clínico ocorre no mesmo quarto mamário em intervalos que variam de 1 a 90 dias após o primeiro caso (WENZ et al., 2005; SCHUKKEN et al., 2009; PINZÓN-SÁNCHEZ; RUEGG, 2011).

Diversos fatores podem contribuir para a falha no tratamento destacando-se o tempo de tratamento, o intervalo de aplicações, a dose, e o produto utilizado. Adicionalmente, deve-se considerar o tipo de infecção, o agente envolvido, o histórico de uso de antimicrobianos na propriedade e a susceptibilidade do agente em testes *in vitro*. Além disso, as condições de realização dos exames laboratoriais podem influenciar os resultados do tratamento (CONSTABLE; MORIN, 2003).

A escolha de drogas antimicrobianas por meio da classificação das bactérias pela coloração de Gram é um recurso rápido e útil que pode orientar a escolha direcionada para

grupo específico de agentes (MOTA et al., 2010). Neste contexto, foram consideradas para cada protocolo (P1 ou P2), a origem (contagiosa ou ambiental/opportunista) e a classificação do agente isolado pela coloração de Gram (positiva ou negativa) para avaliação da cura clínica e bacteriológica.

Como demonstrado na Tabela 09, as proporções de cura obtidas após o tratamento não diferiram significativamente quando os agentes isolados, em cultura pura, na amostra PRÉ foram classificados como de origem contagiosa ou ambiental/opportunista no P1 (P=0,653) e no P2 (P=0,656).

Embora maiores proporções de cura tenham sido observadas nos casos em que o agente na amostra PRÉ foi identificado como Gram negativo, a maior probabilidade de cura clínica não foi associada com coloração do agente na amostra PRÉ no P1 (P = 0,502) e nem no P2 (P = 1,000). A ausência de associação para os mesmos critérios foi observada por Gutermock et al. (1993) com proporções de cura semelhantes para bactérias Gram positivas (53%) e Gram negativas (68%), equivalentes às proporções obtidas no presente estudo no P1.

Tabela 09: Cura clínica em vacas com mastite clínica, tratadas por três dias consecutivos e avaliadas quatro dias após o fim do tratamento (Protocolo 1) ou até um dia após o desaparecimento dos sinais clínicos e avaliadas 14 dias após o fim do tratamento (Protocolo 2), em função da caracterização do agente isolado em cultura pura de amostras de leite coletadas antes do início do tratamento

Caracterização do agente	Protocolo 1			Protocolo 2		
	Nº (%)	Total	P-valor ¹	Nº (%)	Total	P-valor ¹
Origem			0,653			0,656
Contagiosa	18 (66,7)	27		29 (82,9)	35	
Ambiental/opportunista	16 (57,1)	28		13 (92,9)	14	
Gram			0,502			1,000
Positiva	26 (59,1)	44		38 (84,4)	45	
Negativa	8 (72,7)	11		4 (100,0)	4	

¹Teste do Qui-quadrado ou Exato de Fisher.

4.8 Cura Bacteriológica

Dos 227 casos selecionados, não foi possível a avaliação da cura bacteriológica em 81 (n = 68, no P1 e n = 13, no P2), pois as amostras PÓS não foram coletadas ou foram perdidas.

A cura bacteriológica, considerada quando a cultura foi negativa na amostra PÓS tratamento, ocorreu em 45,2% (66/146) dos casos, sendo 26,9% (18/67) no P1 e 60,8% (48/79) no P2.

Apesar da dificuldade na comparação da cura bacteriológica entre diferentes estudos, as proporções de cura bacteriológica observadas neste estudo foram consistentes com resultados reportados em pesquisas anteriores. Guterbock et al. (1993) obtiveram cura bacteriológica de 27,3% após o tratamento convencional com amoxicilina em um dos três rebanhos estudados. Hoe e Ruegg (2005) relataram cura bacteriológica de 38,2% após o tratamento intramamário convencional em uma propriedade com alta CCS no leite do tanque.

Para o P2, a proporção de cura bacteriológica foi semelhante às observadas por Truchetti et al. (2014) no tratamento com ceftiofur, por 8 dias (61,0%), e por Pinzón-Sánchez e Ruegg (2011) após tratamento estendido com ceftiofur (77% de cura geral e 63% de cura em casos por bactérias Gram positivas).

Considerando apenas a falha no tratamento (isolamento da mesma bactéria nas amostras PRÉ e PÓS tratamento) como ausência de cura, esta proporção foi de 52,5% (21/40) no P1 e 94,9% (75/79) no P2. Utilizando a mesma forma de avaliação para cura bacteriológica, McDougall (2003) relatou 77% de cura para casos clínicos tratados com a associação de lincomicina com neomicina ou penicilina com dihidroestreptomicina, 20 dias após o fim do tratamento. Em outro estudo, Roberson et al. (2004) obtiveram 67% de cura bacteriológica após tratamento convencional com amoxicilina com avaliação aos 36 dias após o diagnóstico da doença. McDougall et al. (2007) obtiveram 74% de cura, 30 dias após o fim do tratamento convencional com penicilina procaína, cefuroxima, e uma combinação de penicilina procaína e dihidroestreptomicina. Pela diversidade de agentes e períodos de avaliação após o tratamento é difícil comparar os resultados de diferentes estudos.

A cura bacteriológica não foi associada com a coloração do agente (Gram) isolado na amostra PRÉ tanto no P1 ($P=0,673$) quanto no P2 ($P=1,000$) (Tabela 10) em semelhança ao que foi relatado anteriormente por Guterbock et al. (1993).

Em concordância com o relato de McDougall (2003), não houve associação entre origem (contagiosa ou ambiental/opportunista) do agente e a maior probabilidade na cura bacteriológica no P1 ($P=0,656$) e no P2 ($P=1,000$).

As taxas de cura obtidas no tratamento estendido (P2) foram maiores do que as reportadas por Lago et al. (2011) para casos tratados com cefapirina que resultaram no isolamento de bactérias Gram positivas (55%) e semelhantes quando os agentes isolados

foram Gram negativos (78%). Pinzón-Sánchez e Ruegg (2011) também relataram a ausência de associação entre a taxa de cura bacteriológica e o diagnóstico microbiológico da amostra PRÉ, e encontraram taxas de cura, para casos que resultaram no isolamento de bactérias Gram negativas (75%) ou positivas (63%), semelhantes às encontradas no presente estudo.

Tabela 10: Cura bacteriológica em vacas com mastite clínica, tratadas por três dias consecutivos e avaliadas quatro dias após o fim do tratamento (Protocolo 1) ou até um dia após o desaparecimento dos sinais clínicos e avaliadas 14 dias após o fim do tratamento (Protocolo 2), em função da caracterização do agente isolado em cultura pura de amostras de leite coletadas antes do início do tratamento

Caracterização do agente	Protocolo 1			Protocolo 2		
	Nº (%)	Total	P-valor ¹	Nº (%)	Total	P-valor ¹
Origem			0,659			1,000
Contagiosa	8 (40,0)	20		19 (67,9)	28	
Ambiental/opportunista	6 (28,6)	21		9 (69,2)	13	
Gram			0,673			1,000
Positiva	11 (32,4)	34		25 (67,6)	37	
Negativa	3 (42,9)	7		3 (75,0)	4	

¹Teste do Qui-quadrado ou Exato de Fisher.

Quanto às taxas gerais de cura, considerando os dois protocolos (P1 e P2) juntos, foram observadas curas clínicas e bacteriológicas de 76,2% (173/227) e 45,2% (66/146), respectivamente. Assim a cura bacteriológica foi obtida em aproximadamente 60% dos casos que resultaram em cura clínica, um dado favorável pela diversidade de agentes, antimicrobianos e tempo de tratamento.

Segundo Döpfer et al. (1999), a cura clínica sem cura bacteriológica pode resultar na recidiva da doença no mesmo quarto mamário, transmissão do agente para outros quartos ou outras vacas, mesmo quando as infecções são causadas por agentes ambientais. Portanto, quando vacas infectadas são mantidas no rebanho, medidas de segurança devem ser tomadas com o objetivo de minimizar os riscos na transmissão dos patógenos.

A cura bacteriológica embora importante na avaliação da eficácia do tratamento contra mastite, não tem significado prático. Sua utilização pode requerer múltiplas culturas do leite tornando o seu uso, para todos os casos, economicamente inviável na realidade das propriedades produtoras de leite (BARROS et al., 2013).

4.9 Resultados de Tratamento de Acordo com a Susceptibilidade Antimicrobiana Avaliada através da PRA e TDD

Segundo Erskine et al. (1993), a escolha dos antimicrobianos deve ser baseada na interpretação dos resultados de testes de susceptibilidade *in vitro* cujo objetivo é aumentar as chances em obter melhores resultados com o tratamento. Em estudo recente, Garino Jr et al. (2006) observaram que as taxas de cura clínica e bacteriológica de casos da MC, que tiveram a susceptibilidade *in vitro* avaliada para escolha do tratamento, foram superiores às taxas de cura dos casos nos quais o perfil de susceptibilidade não foi avaliado. Por outro lado, o uso do antibiograma para escolha da terapia antimicrobiana tem sido questionado, pela frequente discordância dos resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* (OWENS et al., 1997; HOE; RUEGG. 2005; APPARAO et al., 2009).

Neste contexto, foram consideradas para cada protocolo (P1 e P2), as proporções de cura clínica e bacteriológica obtidas em relação à susceptibilidade antimicrobiana dos agentes, nas amostras PRÉ, obtida pela PRA e TDD (Tabelas 11 e 13).

A proporção de cura clínica e bacteriológica obtida com amostras resistentes pelo TDD e tratadas no P2 não foram utilizadas para comparação uma vez que apenas duas amostras (*Pseudomonas* spp.) foram incluídas neste grupo.

Corroborando os relatos de Shpigel. (1998), e Constable e Morin (2002), uma maior proporção numérica de cura clínica foi observada nos casos em que os agentes foram sensíveis aos antimicrobianos utilizados (Tabela 11). Na avaliação da susceptibilidade pela PRA, amostras sensíveis resultaram em proporção de cura clínica (80,9%) significativamente maior comparada com amostras resistentes (30,3%) no P1 ($P < 0,001$). Entretanto, no P2 as proporções de cura clínica para amostras sensíveis (93,3%) e resistentes (85,7%) foram equivalentes ($P = 0,450$).

Pelo TDD, a proporção de cura clínica das amostras sensíveis no P1 (73,2%) foi numericamente maior que a proporção de cura clínica com amostras resistentes (47,1%), mas sem diferença significativa ($P = 0,086$).

Quando as proporções de cura clínica foram associadas com a susceptibilidade obtida pela PRA e TDD (somente amostras sensíveis), não foi evidenciada diferença significativa entre os testes tanto no P1 quanto no P2. As proporções de cura clínica obtidas para amostras

sensíveis pela PRA e TDD, respectivamente, foram de 80,9% e 73,2% no P1 (P = 0,378) e 93,3% e 83,3% no P2 (P = 0,201).

Tabela 11: Cura clínica em vacas com mastite clínica, tratadas por três dias consecutivos (Protocolo 1) ou até um dia após o desaparecimento dos sinais clínicos (Protocolo 2), em função da susceptibilidade antimicrobiana obtida a partir da amostra de leite coletada antes do início do tratamento, pela prova da redutase adaptada (PRA) e teste de disco difusão em ágar (TDD)

Susceptibilidade	Protocolo 1			Protocolo 2		
	Nº (%)	Total	P-valor ¹	Nº (%)	Total	P-valor ¹
PRA			<0,001			0,450
Sensível	72 (80,9)	89		42 (93,3)	45	
Resistente	10 (30,3)	33		6 (85,7)	7	
TDD			0,086			
Sensível	41 (73,2)	56		40 (83,3)	48	
Resistente	8 (47,1)	17		2 (100,0)	2	

¹Teste Teste do Qui-quadrado ou Exato de Fisher.

A sensibilidade dos testes de susceptibilidade na obtenção da cura clínica (probabilidade da susceptibilidade avaliada pelos testes resultar em amostra sensível ao antimicrobiano utilizado no tratamento quando a cura clínica foi obtida) foi de 87,3% para a PRA e 89,0% para o TDD, enquanto que a especificidade (probabilidade da amostra ser resistente ao antimicrobiano utilizado no tratamento quando a cura clínica não foi obtida) foi de apenas 54,5% para a PRA e 28,1% para o TDD (Tabela 12).

Tabela 12: Testes para determinar a validade da susceptibilidade antimicrobiana, avaliada através da prova da redutase adaptada (PRA) e teste de disco difusão em ágar (TDD), em relação a cura clínica obtida após tratamento antimicrobiano intramamário de casos de mastite clínica

Teste de susceptibilidade	Sens. ¹	Espec. ²	VPS ³	VPR ⁴	Acur. ⁵	TFS ⁶	TFR ⁷	Kappa
				%				
PRA	87,3	54,5	84,6	60,0	78,8 ^a	45,5	12,7	0,431
TDD	89,0	28,1	77,9	47,4	73,2 ^a	71,9	11,0	0,197

¹Sensibilidade. ²Especificidade. ³Valor preditivo sensível. ⁴Valor preditivo resistente. ⁵Acurácia. ⁶Taxa de falso sensível. ⁷Taxa de falso resistente. ^{a-a}Proporções na mesma coluna, seguidas de letras iguais, não diferiram significativamente no Teste do Qui-quadrado (P = 0,324).

Adicionalmente, a probabilidade de uma amostra ter sido sensível, na PRA ou TDD, ao antimicrobiano utilizado no tratamento e resultar em cura clínica (valor preditivo sensível) foi de 84,6% na PRA e 77,9% no TDD, e a probabilidade de uma amostra ter sido resistente ao antimicrobiano utilizado no tratamento e não resultar em cura clínica (valor preditivo resistente) foi de 60,0% e 47,4% na PRA ou TDD, respectivamente.

A especificidade, tanto da PRA quanto do TDD, foi influenciada pela taxa de resultados falso sensíveis, ou seja, ambas as provas indicaram como sensíveis amostras oriundas de casos que não resultaram em cura clínica. Dessa forma, a acurácia (proporção de amostras classificadas corretamente como sensíveis ou resistentes ao antimicrobiano utilizado no tratamento quando a cura foi obtida ou não, respectivamente) foi de 78,8% para a PRA e 73,2% para o TDD, sem diferença significativa entre os testes ($P = 0,324$).

O coeficiente kappa de Cohen mostrou concordância de 0,431 para a PRA e 0,197 para o TDD na avaliação da cura clínica. Segundo Landis e Koch (1977), o coeficiente kappa pode ser interpretado de acordo com a seguinte escala: valor menor que 0,0 (ausência de concordância), entre 0,0 e 0,20 (concordância muito baixa), entre 0,21 e 0,40 (concordância baixa), entre 0,41 e 0,60 (concordância moderada), entre 0,61 e 0,80 (concordância considerável) e entre 0,81 e 1,00 (concordância quase perfeita). Assim, pode-se dizer que a PRA foi mais confiável em prever o resultado do tratamento quando comparada ao TDD, já que o valor de kappa encontrado pertence um melhor nível de concordância.

Maiores proporções de cura bacteriológica foram observadas para amostras sensíveis, avaliadas pela PRA, no P1 e no P2, e pelo TDD no P1 (Tabela 13). No entanto, nos tratamentos no P1 a maior probabilidade de cura não foi associada com o resultado nos testes de susceptibilidade pela PRA ($P=0,236$) e TDD ($P=0,754$). Por outro lado no P2, amostras sensíveis pela PRA resultaram em taxa de cura bacteriológica significativamente maior (28/42, 66,7%) quando comparadas com amostras resistentes (0/6, 0,0%) ($P = 0,003$).

Todos os casos no P2, cujas amostras foram resistentes, foram tratados com gentamicina. O resultado de susceptibilidade avaliada pela PRA poderia ter sido confiavelmente utilizado nesses casos, com o objetivo de evitar a falha no tratamento, visto que a ação do antimicrobiano contra as bactérias causadoras da infecção é um dos principais pontos para o sucesso do tratamento (MOTA et al., 2010).

Tabela 13: Cura bacteriológica em vacas com mastite clínica, tratadas por três dias consecutivos (Protocolo 1) ou até um dia após o desaparecimento dos sinais clínicos (Protocolo 2), em função da susceptibilidade antimicrobiana obtida a partir da amostra de leite coletada antes do início do tratamento, pela prova da redutase adaptada (PRA) e teste de disco difusão em ágar (TDD)

Susceptibilidade	Protocolo 1			Protocolo 2		
	Nº (%)	Total	P-valor ¹	Nº (%)	Total	P-valor ¹
PRA			0,236			0,003
Sensível	12 (35,3)	34		28 (66,7)	42	
Resistente	4 (19,0)	21		0 (0,0)	6	
TDD			0,754			
Sensível	12 (30,8)	39		25 (64,1)	39	
Resistente	4 (25,0)	16		2 (100,0)	2	

¹Teste Teste do Qui-quadrado ou Exato de Fisher.

Não foi evidenciada diferença significativa entre as proporções de cura bacteriológica obtidas para as amostras sensíveis na PRA e TDD, tanto P1 quanto no P2. As proporções de cura bacteriológica obtidas para amostras sensíveis pela PRA e TDD, respectivamente, foram de 35,3% e 30,8% no P1 ($P = 0,872$) e 66,7% e 64,1% no P2 ($P = 0,993$).

Diversos fatores podem contribuir para a discordância observada entre os resultados de susceptibilidade *in vitro* e as curas clínica e bacteriológica obtidas depois do tratamento. Para Constable e Morin (2003) a capacidade de um agente antimicrobiano de chegar ao local de infecção e manter uma concentração eficaz seriam importantes para o sucesso do tratamento. Além disso, o fato dos antimicrobianos possuírem penetração variável no local da infecção intramamária (particularmente em infecções crônicas), é provável que a susceptibilidade determinada *in vitro* não reflita com precisão a resposta à terapia *in vivo*.

De acordo com Du Preez (2000), a discordância entre os resultados poderia ser justificada pela presença de fatores que concorrem para a resolução dos processos infecciosos intramamários, como a viabilidade intracelular de bactérias e a formação de microabscessos ou granulomas mamários.

Segundo Walker (2006), a falha no isolamento do verdadeiro agente causador da doença, a utilização de cultura pura, as condições laboratoriais, as concentrações dos antimicrobianos e os critérios de interpretação dos resultados poderiam levar à falha na avaliação do perfil de susceptibilidade dos patógenos quando se utiliza o antibiograma.

A sensibilidade dos testes de susceptibilidade na obtenção da cura bacteriológica (probabilidade do resultado do teste indicar as bactérias presentes na amostra como sensível ao antimicrobiano utilizado no tratamento quando a cura bacteriológica foi obtida) foi de 90,5% para a PRA e 86,0% para o TDD, enquanto que a especificidade (probabilidade do resultado do teste indicar as bactérias presentes na amostra como resistentes ao antimicrobiano utilizado no tratamento quando a cura bacteriológica não foi obtida) foi de apenas 42,6% para a PRA e 22,2% para o TDD (Tabela 14).

Adicionalmente, a probabilidade de uma amostra ter sido sensível, nos testes, ao antimicrobiano utilizado no tratamento e resultar em cura bacteriológica (valor preditivo sensível) foi de 85,2% para a PRA e 66,7% para o TDD, respectivamente, e a probabilidade de uma amostra ter sido resistente, nos testes, ao antimicrobiano utilizado no tratamento e não resultar em cura bacteriológica (valor preditivo resistente) foi de 85,2% para a PRA e 66,7% para o TDD. A especificidade, tanto da PRA quanto do TDD, foi afetada pela alta taxa de resultados falso sensíveis que as provas originaram, ou seja, indicaram como sensíveis ao antimicrobiano utilizado no tratamento amostras oriundas de casos que não resultaram em cura bacteriológica. Dessa forma, a acurácia obtida foi de 63,5% para a PRA e 50,5% para o TDD, e sem diferença significativa entre os testes ($P = 0,093$).

Tabela 14: Testes para determinar a validade da susceptibilidade antimicrobiana, avaliada através da prova da redutase adaptada (PRA) e teste de disco difusão em ágar (TDD), em relação a cura bacteriológica obtida após tratamento antimicrobiano intramamário de casos de mastite clínica

Teste de susceptibilidade	Sens. ¹	Espec. ²	VPS ³	VPR ⁴	Acur. ⁵	TFS ⁶	TFR ⁷	Kappa
				%				
PRA	90,5	42,6	55,1	85,2	63,5 ^a	57,4	09,5	0,309
TDD	86,0	22,2	46,8	66,7	50,5 ^a	77,8	14,0	0,076

¹Sensibilidade. ²Especificidade. ³Valor preditivo sensível. ⁴Valor preditivo resistente. ⁵Acurácia. ⁶Taxa de falso sensível. ⁷Taxa de falso resistente. ^{a-a}Proporções na mesma coluna, seguidas de letras iguais, não diferiram significativamente no Teste do Qui-quadrado ($P = 0,093$).

Segundo a interpretação do coeficiente kappa de Cohen, a PRA (kappa = 0,309) e o TDD (kappa = 0,076) mostraram baixa e muito baixa concordância, respectivamente, com o resultado do tratamento. Esses dados corroboram os resultados de outros estudos (HOE; RUEGG, 2005; APPARAO et al., 2009), sobre as frequentes divergências entre os resultados

observados nos testes de susceptibilidade *in vitro* e a eficácia do tratamento *in vivo* e apontam para a necessidade de se identificar os fatores responsáveis pelas altas taxas de resultados falso positivos tanto na PRA quanto no TDD.

Além das frequentes divergências entre os resultados observados nos testes de susceptibilidade *in vitro* e a eficácia do tratamento *in vivo* (HOE; RUEGG, 2005; APPARAO et al., 2009), diversos fatores contribuem para a restrita utilização do TDD na rotina das propriedades leiteiras, destacando-se a morosidade associada ao processo e o custo (BARROS et al., 2013). Neste sentido, a PRA, um teste simples, barato e rápido, foi um bom preditor da cura clínica no tratamento convencional e cura bacteriológica no tratamento estendido, e em alguns aspectos apresentando vantagens sobre o TDD.

Apesar dos prováveis benefícios, o uso da PRA pode apresentar certa resistência por parte dos produtores. O aumento no tempo de ordenha com a coleta asséptica das amostras, a necessidade em atrasar o início do tratamento, a possibilidade de resultados falsos com a contaminação durante a coleta e/ou manipulação das amostras poderiam motivar a não adoção da técnica. Em um estudo com 52 produtores, que utilizavam ou já haviam utilizado cultura a campo para orientação do tratamento, Nesser et al. (2006) verificaram que aproximadamente 25% deles realizavam cultura de todos os casos de MC, 60% esperavam o resultado da cultura para iniciar o tratamento, e 40% iniciavam o tratamento antes do resultado da cultura e realizavam alterações se necessário. Os autores relataram que a falta de interesse em cultivar o leite de vacas que tiveram vários casos de mastite, a determinação da bactéria pelos sinais clínicos, e a preferência pela segregação e/ou descartar a vaca ao invés do tratamento antimicrobiano foram descritas como as razões pelas quais eles não realizavam a cultura em todos os casos. No entanto, o uso de antimicrobianos foi reduzido nos rebanhos em que os produtores esperavam pelo resultado da cultura para iniciar o tratamento, fato também relatado por Silva et al. (2004).

Adicionalmente, nem toda propriedade leiteira seria capaz de incorporar, à sua rotina, o uso desta técnica. Além da necessidade de um espaço adequado para a realização do teste, buscando minimizar a possibilidade de contaminação das amostras e/ou dos materiais utilizados, é importante a presença de uma pessoa treinada para manejar a rotina dos testes e garantir a confiabilidade dos resultados.

Em muitas propriedades, os tratamentos dos casos não são baseados em resultados laboratoriais, como o isolamento do agente e susceptibilidade antimicrobiana, e a terapia antimicrobiana utilizada pode não ser eficaz contra o agente patogênico envolvido.

Do ponto de vista técnico, a PRA pode ser uma alternativa com boa aplicabilidade para a indicação do antimicrobiano no tratamento intramamário a ser instituído nos casos da MC, auxiliando produtores e técnicos a tomarem melhores decisões no tratamento e selecionarem, de forma adequada, os antimicrobianos disponíveis na sua região, com maiores chances de resultar no sucesso do tratamento contra a mastite.

5 CONCLUSÕES

A predominância de agentes contagiosos, na etiologia dos agentes causadores da MC, nestas propriedades foi coerente com as falhas de manejo observadas durante a ordenha e ineficiência das medidas de controle e prevenção da doença.

Apesar do histórico de uso frequente de antimicrobianos nas propriedades sem o conhecimento prévio do perfil de susceptibilidade dos agentes patogênicos uma boa sensibilidade *in vitro* foi observada, para a maioria dos antimicrobianos disponíveis para o uso intramamário.

Apesar de maiores taxas de sensibilidade e antimicrobiana *in vitro* terem sido obtidas na avaliação pelo TDD, as taxas de cura clínica e bacteriológica, obtidas após a comparação com os resultados de susceptibilidade obtidos pela PRA e TDD, foram semelhantes.

A PRA mostrou-se um teste importante no prognóstico da MC após o tratamento antimicrobiano intramamário, apresentando acurácia e sensibilidade semelhantes ao TDD no prognóstico da cura clínica e bacteriológica.

A pequena quantidade de materiais utilizados, a simplicidade do método e o curto tempo na obtenção dos resultados foram vantagens importantes da PRA sobre o TDD.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUREEMA, S.; SMOOKER, P.; MALMO, J.; DEIGHTON, M. Molecular epidemiology of recurrent clinical mastitis due to *Streptococcus uberis*: Evidence of both an environmental source and recurring infection with the same strain. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 1, p. 285–290, 2014.
- ALLISON, J. R. D. Antibiotics residues in milk. **British Veterinary Journal**, v. 141, p. 9-16, 1995.
- ALMEIDA, L. A. B.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PIRES, M. F. A.; BENITES, N. R. Tratamento de mastite clínica experimental por meio de ordenhas múltiplas em vacas leiteiras inoculadas com *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 1, p. 1-6, 2005.
- APPARAO, D.; OLIVEIRA L.; RUEGG, P. L. Relationship between results of in vitro susceptibility tests and outcomes following treatment with pirlimycin hydrochloride in cows with subclinical mastitis associated with gram-positive pathogens. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 234, n. 11, jun. 2009.
- ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ÂNGELO, F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.
- AURELI, P.; FERRINI, A. M.; MANNONI, V. Presumptive identification of sulphonamide and antibiotic residues in milk by microbial inhibitor tests. **Journal of Food Control**, v. 7, p. 165-168, 1996.
- BANDOCH, P.; MELO, L. S. Prevalência de mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: Uma revisão bibliográfica. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, v. 17, n. 1, p. 47-51, 2011.
- BANNERMAN D. D.; PAAPE M. J.; LEE J. W.; ZHAO X.; HOPE J. C.; RAINARD P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses

following intramammary infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, p. 463-472, 2004.

BAR, D.; GROHN, Y. T.; BENNETT, G.; GONZALEZ, R. N.; HERTL, J. A.; SCHULTE, H. F.; TAUER, L. W.; WELCOME, F. L.; SCHUKKEN, Y. H. Effect of repeated episodes of generic clinical mastitis on milk yield in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 4643–4653, 2007.

BARBALHO, T. C. F.; 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.

BARBOSA, C. P.; BENEDETTI, E.; RIBEIRO, S. C. A.; GUIMARÃES, E. C. Relação entre Contagem de Células Somáticas (CCS) e os resultados do “California Mastitis Test” (CMT), no diagnóstico de mastite bovina. **Bioscience Journal**, v. 18, n. 1, p. 93–102, 2002.

BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 89, n. 6, p. 1877-1895, Jun. 2006.

BARROS, J. P. N.; LOPES, L. V.; LIMA, D. M.; ESTEVAN, I. P.; OLIVEIRA, A.; BOTTEON, R. C. C. M. Limitações ao uso do antibiograma no tratamento e controle das mastites na rotina das propriedades leiteiras. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 35, n. 3, p. 212-216, 2013.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BECKER, M.; ZITTLAU, E.; PETZ, M. Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 520, p. 19-32, 2004.

BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T.; SOUZA, J. A.; NERO, L. A. Estudo da mastite subclínica em rebanhos leiteiros no norte do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 18, n. 1, p. 45-53, 1997.

BELOTI, V.; RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; TAMANINI, R.; YAMADA, A. K.; CAVALETTI, L.; SHECAIRA, C. L.; NOVAES, D. G.; SILVA, F. F.; GIOMBELLI, C. J.; MANTOVANI, F. D.; SILVA, M. R. Qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado produzido no município de Sapopema/PR. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 4, n. 16, 2011.

BIGGS, A. **Mastitis in cattle**. Marlborough: The Crowood Press. 2009.

BLAGITZ, M. G.; SOUZA, F. N.; SANTOS, B. P.; BATISTA, C. F.; PARRA, A. C.; AZEVEDO, L. F. F.; MELVILLE, P. A.; BENITES, N. R.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Function of milk polymorphonuclear neutrophil leukocytes in bovine mammary glands infected with *Corynebacterium bovis*. *Journal of Dairy Science*, v. 96, p. 3750–3757, 2013.

BLOWEY, R. W. Mastitis and conditions of the teat and udder. In R.W. Blowey (Ed.). **A veterinary book for dairy farmers**. (3ed.). (p. 175-229). Ipswich: Old Pond Publishing. 1999.

BRAGA, G. C.; BRIETZKE, A. L.; ARAÚJO, J. S; GARCIA, R. C; PEIXOTO, E. C. T. M. Contagem de células somáticas em leite formal de produtores de Marechal Cândido Rondon - PR. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, p. 80-85, 2006.

BRANCHER, C. C.; FAGUNDES, C. M. Adaptação do Método da Redutase para Detectar Antibióticos no Leite. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 2 n. 2, p. 80-84, Mai.-Ago., 1998.

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, p. 595-606, 1994.

BRASIL. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**, 2002a.

BRASIL. Instrução Normativa nº 62 de 30 de dezembro de 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**, 2011.

BRISSON-NOËL, A.; TRIEU-CUOT, P.; COURVALIN, P. Mechanisms of action of spiramycin and other macrolides. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 22, p. 13–23, 1988.

BRITO, J. R. F. B.; BRITO, M. A. V. P. **Qualidade higiênica do leite**. Embrapa - Juiz de Fora -CNPGL-ADT, 17p., 1998a.

BRITO, J. R. F. B.; BRITO, M. A. V. P. **Programas de Controle das Mastites Causadas por Microrganismos Contagiosos e do Ambiente**. Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora, n. 71, 25p., 1998b.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V. M. O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 2, p. 129-135, 1999.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P.; SOUZA, G. N.; MORAES, L. C. D.; ARCURI, E. F.; LANGE, C.; FÁBIO, H. D. Avaliação da eficiência do "Kit Embrapa Ordenha Manual®" para melhorar a qualidade microbiológica do leite em pequenas propriedades de quatro regiões brasileiras. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE, 6, 2007, Resende. **Anais...CD Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2007.**

BRITO, M. A. V. P. Diagnóstico Microbiológico da Mastite Bovina. In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Ciência Animal Brasileira, 2009. Suplemento 1, p. 1-12, 2009.

BRÖTZ-OESTERHELT, H.; BRUNNER, N. A. How many modes of action should an antibiotic have? **Current Opinion in Pharmacology**, v. 8, p. 564-573. 2008.

BUENO, V. F. F.; NICOLAU, E. S.; MESQUITA, A. J.; RIBEIRO, A. R.; SILVA, J. A. B.; COSTA, E. O.; COELHO, K. O.; NEVES, R. B. S. Mastite bovina clínica e subclínica, na

região de Pirassununga, SP: frequências e redução na produção. **Ciência Animal Brasileira**, v. 3, n. 2, p. 47-52, 2002.

BUENO, V. F. F.; NICOLAU, E. S.; MESQUITA, A. J.; RIBEIRO, A. R.; SILVA, J. A. B.; COSTA, E. O.; COELHO, K. O.; COUTO, D. V. Etiologia e suscetibilidade à antimicrobianos dos agentes da mastite bovina isolados na região de Pirassununga-SP-Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 32, n. 1, p. 33-44, 2003.

CARRACEDO, A. J. Pharmalogic Indústria e Comércio Ltda. - **Divisão Minerthal Saúde Animal**. Disponível em: http://www.minerthal.com.br/produtos/bulas/BULA_Mamithal.pdf. Acesso em: 31 de julho de 2009.

CARVALHO, C. M.; OLIVEIRA, A. J.; GALLO, C. R. O sistema Petrifilm como alternativa aos métodos tradicionais para contagem total de microrganismos aeróbios e coliformes totais em leite cru refrigerado. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 100, p. 116-126, 2002.

CASURA C.; SCHUKKEN Y. H.; RÜSCH P. Quality assessment of California Mastitis Test as a diagnostic tool in quarter somatic cell count estimation. **Proc. IDF International Mastitis Seminar**, Tel Aviv - Israel, p. 3.57-3.58. 1995.

CHAGAS, L. G. S.; MELO, P. C.; BARBOSA, N. G.; GUIMARÃES, E. C.; BRITO, D. D. Ocorrência de mastite bovina causada por *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. e *Candida* sp. em uma propriedade rural no município de Indianópolis – Minas Gerais, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 6, p. 1007-1014, 2012.

CHAMBERS, H. F. Bacitracin. In: **Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics**. 10 ed. J.G. Hardman and L.E. Limbird Eds., McGraw Hill, New York, USA, p. 1265-1266, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. Approved Standards. 3rd ed.** M31-A3, Wayne, PA, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard — Eleventh Edition**. M02-A11, v. 32, n. 1, 2012.

CONSTABLE, P. D.; MORIN, D. E. Use of antimicrobial susceptibility testing of bacterial pathogens isolated from the milk of dairy cows with clinical mastitis to predict response to treatment with cephapirin and oxytetracycline. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 221, p. 103–108, 2002.

CONSTABLE, P. D.; MORIN, D. E. Treatment of clinical mastitis using antimicrobial susceptibility profiles for treatment decisions. **The Veterinary Clinics. Food Animal Practice**. v. 19, p. 139-155, 2003.

COOK, N. B.; BENNETT, T. B.; EMERY, K. M. Monitoring nonlactating cow intramammary infection dynamics using DHI somatic cell count data. **Journal Dairy Science**, v. 85, p. 1119-1126, 2002.

COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S.L.; BERNARDI, M.M. (Eds.). **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**, 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 443-455. 2002.

COSTA, E. O.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; PARDO, R. B.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 4, p. 156-158, 1995.

COSTA, E. O.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T. Mastite por *Arcanobacterium pyogenes*: surto em rebanho de gado de corte. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa da Glândula Mamária e Produção Leiteira**, v. 1, p. 08-12, 2000.

COSTA, E. O.; GARINO JÚNIOR, F.; WATANABE, E. T.; SILVA, J. A. B.; RIBEIRO, A. R.; HORIUTI, A. M. Patógenos de mastite bovina isolados de glândulas mamárias negativas aos testes de Tamis e CMT. **Revista Napgama**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 12-15, 2001.

COUSINS, C. M.; BRAMLEY, A. J. Microbiologia de la leche cruda. In: ROBINSON, R.K. **Microbiologia lactológica**. Zaragoza : Acribia, Cap.4, p. 109-150, 1987.

CULLOR, J. S., TYLER, J. W., SMITH, B. P. Distúrbios da glândula mamária. In: SMITH, B. P. **Tratado de Medicina Interna dos Grandes Animais**. São Paulo, v. 2, p. 1041- 1060, 1994.

DELLA LIBERA, A. M. M. P.; ARAÚJO, W.P.; COSTA, E. O.; GARCIA, M.; TÁVORA, J. F. P.; BENATTI, L. A. T. Características físico-químicas e microbiológicas do leite de vacas sem alterações ao exame físico da glândula mamária e com alta contagem de células somáticas. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 1, n. 2, p. 42 – 47, 2001.

DELLA LIBERA, A. M. M. P.; SOUZA, F. N.; BLAGITZ, M. G.; BATISTA, C. F., GARCIA, M.; ARAÚJO, W. P. Avaliação de indicadores inflamatórios no diagnóstico da mastite bovina. **Ciência Animal Brasileira**, suplemento 1, p. 726 – 731, 2009. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/7891/5734>. Acesso em: 6 de novembro de 2014.

DELUYKER, H. A.; CHESTER, S. T.; VAN OYE, S. N. A multilocation clinical trial in lactating dairy cows affected with clinical mastitis to compare the efficacy of treatment with intramammary infusions of a lincomycin/neomycin combination with an ampicillin/cloxacillin combination. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 22, p. 274-282, 1999.

DELUYKER, H. A.; MICHANEK, P.; WUYTS, N. We treat sick cows, don't we? The case of subclinical mastitis. p. 170-174, in **Proceedings of the 40th annual meeting of National Mastitis Council, Reno NV**, Madison, WI. 2001.

DENOBILE, M.; NASCIMENTO, E. S. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, abr./jun., 2004

DINGWELL, R. T.; LESLIE, K. E.; SCHUKKEN, Y. H.; SARGEANT, J. M.; TIMMS, L. L.; DUFFIELD, T. F.; KEEFE, G. P.; KELTON, D. F.; LISSEMORE, K. D.; CONKLIN, J. Association of cow and quarter-level factors at drying-off with new intramammary infections during the dry period. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 63, p. 75-89, 2004.

DINIZ, M. A. P. R.; BRANDÃO, S. C. C.; FARIA, E. Tratamento de mastite subclínica e clínica, em vacas lactantes, com ácido acetilsalicílico, mastenzin e associação mastenzin com ácido acetilsalicílico. **A Hora Veterinária**, n. 18, p. 27-33, 1998.

DODD, F. H. Mastitis - Progress on control. **Journal of Dairy Science**, v. 66, p. 1773-1780, 1983.

DOMINGUES, P. F. **Controle da produção leiteira na mastite bovina subclínica**. 1993. 39p. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP. 1993.

DOMINGUES, P. F.; FERREIRA, B. L. S.; GALDINO, M. C. Mastite em bezerra por *Arcanobacterium pyogenes* - Relato de caso. **Revista de Veterinária e Zootecnia**, v. 15, p. 257-262, 2008.

DÖPFER, D.; BARKEMA, H. W.; LAM, T. J. G. M.; SCHUKKEN, Y. H.; GAASTRA, W. Recurrent clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 80-85, 1999.

DU PREEZ, J. H. Bovine mastitis therapy and why it fails. **The Journal of the South African Veterinary Association**, v. 71, p. 201-208, 2000.

DURANTE-MANGONI, E.; GRAMMATIKOS, A.; UTILI, R.; FALAGAS, M. E. Do we still need the aminoglycosides? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 3, p. 201-205, 2009.

EMEA. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products – Committee for Veterinary Medicinal Products - **Bacitracin: summary report (2)** – EMEA/MRL/768/00-FINAL. January 2001.

ENEVOLDSEN, C.; GROHN, Y. T.; THYSEN, I. Dairy cow characteristics related to *Staphylococcus aureus* isolation from quarter samples. **Journal of Dairy Research**, v. 62, p. 69-81, 1995.

ERSKINE, R. J.; EBERHART, R. J. Herd benefit-to-cost ratio and effects of a bovine mastitis control program that includes blitz treatment of *Streptococcus agalactiae*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 196, n. 8, p. 1230-1235, apr. 1990.

ERSKINE, R. J.; KIRK, J. H.; TYLER, J. W.; DEGRAVES, F. J. Advances in the therapy for mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 9, p. 499-517, 1993.

ERSKINE, R. J.; BARTLETT, P. C.; VAN LENTE, J. Efficacy of systemic ceftiofur as a therapy for severe clinical mastitis in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2571-2575, 2002.

ERSKINE, R. J.; WAGNER, S.; DEGRAVES, F. J. Mastitis therapy and pharmacology. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 19 p. 109–138, 2003.

FANG, W.; PYÖRÄLÄ, S. Mastitis-causing *Escherichia coli*: serum sensitivity and susceptibility to selected antibacterials in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 76–82, 1996.

FERNANDES, D. **Diagnóstico laboratorial em mastites bovinas: Sua real importância e aplicação prática**. Atualização Técnica 33, Divisão Agropecuária Pfizer, 2006. Disponível em: www.pfizersaudeanimal.com.br/bov_atualizações5.asp. Acesso em: 19 de dezembro de 2013.

FERREIRA, J. L.; LINS, J. L. F. H. A.; CAVALCANT, T. V.; MACEDO, N. A.; BORJAS, A. R. Prevalência e etiologia da mastite bovina no município de Teresina, PI. **Revista Ciência Rural (UFG)**, v. 8, p. 261-266, 2007.

FIGUEIREDO, J. B. Mamite bovina: visão panorâmica de uma doença complexa In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, p. 176, 1995.

FILIPPSEN, L. F.; Prevalência da mastite bovina causada por *Prototheca zopfii* em rebanhos leiteiros, na região Norte do Paraná. **Ciência Rural**, v. 29, n. 1, p. 87-89, 1999.

FONSECA, L. F. L., Programa de controle de mastite. **Periódico técnico – informativo elaborado pelo Departamento técnico da RHODIA – MÉRIEUX**, Ano II – número 4 – Maio 1996.

FONSECA, L. F. L.; MACHADO, P. F. Ocorrência de mastite bovina em fazendas produtoras de leite B no Estado de São Paulo. In: **Scientia Agricola**, v. 51, p. 578- 585, 1994.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do Leite e Controle de Mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 175p., 2000.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>. Acesso em: 06 de maio 2014.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 424p., 2002.

FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; STAMFORD, T. L. M.; RABELO, S. S. A.; SILVA, D. R.; SILVEIRA FILHO, V. M.; SANTOS, F. G. B.; SENA, M. J.; MOTA, R. A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 171-177, 2005.

GARINO JÚNIOR, F.; WATANABE, E. T.; SANTOS, F. G. B.; BALBINO, T. C. L.; COSTA, E. O. Eficácia terapêutica em mastite clínica e análise de fatores predictivos. **Napgama**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 9-16, 2006.

GENTILINI, E.; DENAMIEL, G.; BETANCOR, A.; REBUELTO, M.; RODRIGUEZ-FERMEPIN, M.; DE TORREST, R. A. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1913-1917, 2002.

GEORGE, L. W.; DIVERS, T. J.; DUCHARME, N.; WELCOME, F. L. Diseases of the teats and udder. In **T.J. Divers & S.F. Peek. Rebhun's diseases of dairy cattle**. (2 ed.). (p. 327-394). St. Louis: Saunders Elsevier. 2008.

GILLESPIE, B. E.; MOOREHEAD, H.; LUNN, P.; DOWLEN, H. H.; JOHNSON, D. L.; LAMAR, K. C.; LEWIS, M. J.; IVEY, S. J.; HALLBERG, J. W.; CHESTER, S. T.; OLIVER, S. P. Efficacy of extended pirlimycin hydrochloride therapy for treatment of environmental *Streptococcus* spp. and *Staphylococcus aureus* intramammary infections in lactating dairy cows. **Veterinary Therapeutics**, v. 3, p. 373–380, 2002.

GONÇALVES, D. **Caracterização molecular de isolados de *Staphylococcus aureus* e produção de marcadores genéticos para diagnóstico de mastite em bovinos leiteiros**. 2006. 137p. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos). Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2006.

GONZÁLEZ, R. N. Diagnosing Mycoplasma mastitis. **NMC 45th Annual Meeting Proceedings**, Tampa, Florida, 22-25 January 2006. p. 207-211. 2006.

GONZÁLEZ, R. N.; WILSON, D. J. Mycoplasmal mastitis in dairy herds. **The Veterinary Clinics. Food Animal Practice**, v. 19, p. 199-221, 2003.

GORDIS, L. Avaliação da validade e da confiabilidade dos testes diagnósticos e de rastreamento. **Epidemiologia**. Rio de Janeiro: Revinter, 2. ed., cap. 4, p. 63-81, 2004.

GUTERBOCK, W. M.; VAN EENENNAAM, A. L.; ANDERSON, R. J.; GARDNER, I. A.; CULLOR, J. S.; HOLMBERG, C. A. Efficacy of intramammary antibiotic therapy for treatment of clinical mastitis caused by environmental pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 3437–3444, 1993.

HACHEM, N. I.; **MASTITE BOVINA: Descrição dos tipos mais frequentes e métodos de prevenção e tratamento visando a melhoria da qualidade do leite e saúde dos rebanhos**. 2005. Dissertação (Pós-Graduação Lato Sensu em Processamento e Controle de Qualidade em Carne, Leite, Ovos e Pescado) UFLA - Lavras – MG. 2005.

HALTIA, L.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; SPIRIDONOVA, I.; OLKONEN, A.; MYLLYS, V. A study of bovine mastitis, milking procedures and management practices on 25 Estonian dairy herds. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 48, p. 22-27, 2006.

HARDING, F. **Milk Quality**. Glasgow, Chapman; Hall, 1995.

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **The Journal of Dairy Science Research**, v. 77, p. 2103-2112, 1994.

HENTON, M. M. *Klebsiella* spp. Infections. In **J. Coetzer & R.C. Tustin** (Ed.). Infectious diseases of livestock. (2 ed.). 1555-1559. Oxford. Oxford University Press. 2004.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 446p., 2003.

HOBBS, B. C. The part played by bacteria in the reduction of methylene blue. **Journal of Dairy Research**, v. 10, p. 35-58, 1939.

HOE, F. G. H.; RUEGG, P. L. Relationship between antimicrobial susceptibility of clinical mastitis pathogens and treatment outcome in cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, n. 9, p. 1461-1468, 2005.

HOGAN, J. S.; GONZALEZ, R. N.; HARMON, R. J; NICKERSON, S. C.; OLIVER, S. P; PANKEY, J. W. **Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis**. Madison, WI: National Mastitis Council, Inc.; 222p., 1999.

HORNISH, R. E.; KOTARSKI, S. F. Cephalosporins in veterinary medicine - ceftiofur use in food animals. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, p. 717-31, 2002.

HUXLEY, J. N.; GREEN, M. J.; BRADLEY, A. J. *Corynebacterium bovis* - friend or foe? **British Mastitis Conference**, Lancashire, UK, 8th October, p. 23-34. 2003.

JAWATZ, E. **Bacitracin**. In: **Basic and Clinical Pharmacology**, 6 ed. Katzung B.G. Ed., Appleton & Lange, East Norwalk, USA, 739. 1995.

JORGE, A. M.; ANDRIGHETTO, C.; STRAZZA, M. R. B.; CORREA, R. C.; KASBURGO, D. G.; PICCININ, A.; VICTÓRIA, C.; DOMINGUES, P. F. Correlação entre o *California Mastitis Test* (CMT) e a Contagem de Células Somáticas do Leite de Búfalas Murrah. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2039-2045, 2005.

KAWAI, K.; KITOU, M.; MITAMURA, T.; UCHIDA, I.; HIROSE, K.; NAGAHATA, H. *Pseudomonas mastitis*: elimination from contaminated wash-water system by slightly acidic

electrolyzed water. **Proceedings of the 25th World Buiatrics Congress**, Budapest, Hungary, 2008.

KEHRLI, M.; HARP, J. Immunity in the mammary gland. **Veteterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 17, p. 495-516, 2001

KITCHEN, B. J. Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. **Journal of Dairy Research**, v. 48, p. 167-188, 1981.

KNIGHT, C. H.; FITZPATRICK, J. L.; LOGUE, D. N.; PLATT, D. J. Efficacy of two non-antibiotic therapies and topical liniment, against bovine staphylococcal mastitis. **Veterinary Record**, v. 146, p. 311-316, 2000.

KUNIN, C.M. Resistance to antimicrobial drugs. A worldwide calamity. **Annals of Internal Medicine**, v. 118, p. 557-561, 1993.

LADEIRA, S. R. L. Mastite bovina, p.359-370. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. (Eds), **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. Vol.1. 3^a ed. Editora Pallotti, Santa Maria. 2007.

LAFFRANCHI, A.; MÜLLER, E. E.; FREITAS, J. C.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; DIAS, J. A.; SALVADOR, R. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas ao longo dos primeiros quatro meses de lactação. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, p. 1027-1032, 2001.

LAGO, A.; GODDEN, S. M.; BEY, R.; RUEGG, P. L.; LESLIE, K. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 9, p. 4441-4456, 2011.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, Arlington, v. 33, p. 159-174, 1977.

LANGONI, H.; DE ARAÚJO, W.N.; DA SILVA, A.V.; DE SOUZA, L.C. Tratamento da mastite bovina com amoxicilina e enrofloxacina bem como com a sua associação. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 177-180, jul./dez., 2000a.

LANGONI, H.; CABRAL, K. G.; DOMINGUES, P. F.; PULGA, M. E.; MARINHO, M.; PRADO, R.B. Utilização da enrofloxacina (Baytril®) no tratamento da mastite bovina estafilocócica. **Revista Ciência Rural**, v. 30, p. 167-170, 2000b.

LANGONI, H.; PENACHIO, D. S.; CITADELLA, J. C. C.; LAURINO, F.; FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; LUCHEIS, S. B.; MENOZZI, B. D.; SILVA, A. V. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 12, p. 1059-1065. 2011.

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. **Scientia Agricola** (Piracicaba, Brasil.), Piracicaba, v. 51, n. 3, 1994.

LÉVESQUE, P. **Less Mastitis: Better milk**. Canada: Hoard's Dairyman. 2004.

LEVINE, I. N. **Physical Chemistry**, Mc Graw Hill Book co., 2nd Edition, 1983.

LEVISON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia médica e imunologia**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 415p., 1998.

LEVY, S. B. The individual and antibiotic resistance. **The antibiotic paradox: how miracle drugs are destroying the miracle**. Ed. Plenum Press. New York, p. 205 – 222, 1992.

LIEVAART, J. J.; KREMER, W. D. J.; BARKEMA, H. W. Short communication: Comparison of bulk milk, yield-corrected, and average somatic cell counts as parameters to summarize the subclinical mastitis situation in a dairy herd. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 4145–4148, 2007.

LIMA, D. M. **Adaptação do método da redutase para avaliação da sensibilidade antimicrobiana em leite de vacas com mastite**. 2009. 91p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - Seropédica. 2009.

LOMBARD, J.; SLYKE, T. V.; WELCOME, F.; SCHUKKEN, Y.; KOPRAL, C. Prevalence of contagious mastitis pathogens on U.S. dairy operations. **NMC 47th Annual Meeting Proceedings**, New Orleans, Louisiana, 20-23 January 2008. p. 170-171. 2008.

LOPES, M. A.; DEMEU, F. A.; ROCHA, C. M. B. M.; COSTA, G. M.; FRANCO NETO, A.; SANTOS, G. Avaliação do impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 4, p. 477-483, 2012.

LOUHI, M.; INKINEN, K.; MYLLYS, V. Relevance of sensitivity testings (MIC) of *S. aureus* to predict the antibacterial action in milk. **Journal of Veterinary Medicine. Series B**, n. 39, p. 253–262, 1992.

LOUHI-LEHTIÖ, M.; SANDHOLM, M.; MYLLYS, V.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Antibacterial susceptibility of bovine-mastitis pathogens tested directly in milk from infected quarters. **Journal of Veterinary Medicine. Series B**, v. 41, p. 101-112, 1994.

LUCHEIS, S. B. A importância dos Estafilococos Coagulase Negativos na mastite bovina subclínica e resistência antimicrobiana. **Pesquisa e Tecnologia**, v. 8, n. 22, 2011

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**, Belo Horizonte, v. 60, n. 1, p. 278-282, 2008.

MAIOLINO, S. R.; RIBEIRO, M. G.; MOTTA, R. G.; SILVA, A. V.; SUMAN, G.; LISTONI, F. J. P. Comparação da eficácia “in vitro” e “in vivo” da cefoperazona sódica, gentamicina e ciprofloxacino no tratamento intramamário, convencional e estendido, da mastite clínica bovina. **Revista Veterinária e Zootecnia**, v. 20, p. 126-128, 2013.

MAKOVEC, J. A.; RUEGG, P. L. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8,905 samples (1994-2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 222, p. 1582-1589, 2003a.

MAKOVEC, J. A.; RUEGG, P. L. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 3466–3472, 2003b.

MANIE, T. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from slaughtered and retail chickens in South Africa. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 253-258, 1997.

MARGATHO, L. F. F.; HIPOLITO, M.; KANETO, C. N. Métodos de prevenção, controle e tratamento da mastite bovina. **Boletim Técnico Instituto Biológico**. São Paulo: Instituto Biológico, n. 9, 35 p., 1998.

MARQUES, D. C. **Criação de Bovinos**. 7.ed. revista, atualizada e ampliada, Belo Horizonte, CVP Consultoria Veterinária e Publicações, 2003.

MARTIN, S. W.; MEEK, A. H.; WILLEBERG, P. Measurement of disease frequency and production. In: Martin S. W.; Meek A. H.; Willeberg P. (ed.) **Veterinary Epidemiology. Principles and Methods**. Iowa State University Press, Ames. p. 48-76, 1994.

MARTINEZ, R.; GIRONI, R. H. A. R.; SANTOS, V. R. Sensibilidade bacteriana a antimicrobianos, usados na prática médica - Ribeirão Preto - SP - 1994. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 29, p. 278-284, 1996.

MARTINS, R. P.; DA SILVA, J. A. G.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; FILHO, E. S. A. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 1, p. 181-187, jan./mar. 2010.

MCDOUGALL, S. Intramammary treatment of clinical mastitis of dairy cows with a combination of lincomycin and neomycin, or penicillin and dihydrostreptomycin. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 51, p. 111-116, 2003.

MCDOUGALL, S.; MURDOUGH, P.; PANKEY, W.; DENANEY, C.; BARLOW, J.; SCRUTON, D. Relationship among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. **Small Ruminant Research**, v. 40, p. 245-254, 2001.

MCDOUGALL, S.; ARTHUR, D. G.; BRYAN, M. A.; VERMUNT, J. J.; WEIR, A. M. Clinical and bacteriological response to treatment of clinical mastitis with one of three intramammary antibiotics. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 55, p. 161-170, 2007.

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**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 580-585, 2009.

MEDEIROS, E. S.; MOTA, R. A.; SANTOS, M. V.; FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; ANDREY, A. T. Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 569-574, jul. 2009.

MILNE, M. H.; BIGGS, A. M.; BARRETT, D. C.; YOUNG, F. J.; DOHERTY, S.; INNOCENT, G. T.; FITZPATRICK, J. L. Treatment of persistent intramammary infections with *Streptococcus uberis* in dairy cows. **The Veterinary Record**, v. 157, p. 245-250, 2005.

MOREIRA, M. A. S.; FERREIRA, A. B.; TRINDADE, T. F. S. L.; REIS, A. L. O.; MORAES, C. A. Resistência a antimicrobianos dependente do sistema de refluxo multidroga em *Escherichia coli* isoladas de leite mastítico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1307-1314, 2008.

MORIN, D. E. Acute mastitis: revisiting the goals of therapy. **Proceedings of the 23rd World Buiatrics Congress**, Québec, Canada, 11-16 Jul. 2004.

MORIN, D. E.; SHANKS, R. D.; MCCOY, G. C. Comparison of antibiotic administration in conjunction with supportive measures versus supportive measures alone for treatment of dairy cows with clinical mastitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, p. 676-684, 1998.

MOTA, L. M.; VILAR, F. C.; DIAS, L. B. A.; NUNES, T. F.; MORIGUTI, J. C. Uso racional de antimicrobianos. **Medicina** (Ribeirão Preto), v. 43, n. 2, p. 164-172, 2010.

MOTTA, R. G.; RIBEIRO, M. G.; PERROTTI, I. B. M.; MOTTA, D. G.; DOMINGUES, P. F.; LUCAS, T. M.; ZAMPROGNA, T. O.; LISTONI, F. J. P. Surto de mastite bovina causada por *Arcanobacterium pyogenes*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 3, p. 736-740, 2011.

MOTA, R. A.; MEDEIROS, E. S.; SANTOS, M.V; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; MOURA, A. P. B. L.; COUTINHO, L. C. A. Participação dos *Staphylococcus* spp. na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de Pernambuco (Brasil) **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 1, p. 124-130, 2012.

MÜLLER, E. E. Profilaxia e controle da mastite. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, III, 1999. Botucatu, SP. **Anais...Botucatu**, p. 57-61, 1999.

MÜLLER, 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**, p. 206-217, 2002.

MUNOZ, M. A.; AHLSTROM, C.; RAUCH, B. J.; ZADOKS, R. N. Fecal Shedding of *Klebsiella pneumoniae* by Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 3425-3430, 2006.

MYLLYS, V.; LOUHI, M.; ALI-VEHMAS, T. Comparison of Penicillin-G susceptibility testing methods of staphylococci isolated from bovine mastitis. **Journal of Veterinary Medicine. Series B**, v. 39, p. 723–731, 1992.

NADER FILHO, A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; FUKUDA, S. P. Estudo comparativo entre a prova da redutase, contagem padrão em placas e contagem leucocitária no leite *in natura* procedente de vacas não reagentes ao California Mastitis Test. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 38, n. 230, p. 19-22, 1983.

NAM, H. M.; LIM, S. K.; KANG, H. M.; KIM, J. M.; MOON, J. S.; JANG, K. C.; JOO, Y. S.; JUNG, S. C. Prevalence and antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 2020- 2026, 2009.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Current concepts of bovine mastitis**. 3.ed. Arlington. p. 5-46, 1987.

NEESER, N. L.; HUESTON, W. D.; GODDEN, S. M.; BEY, R. F. Evaluation of the use of an onfarm system for bacteriologic culture of milk from cows with low-grade mastitis.

Journal of the American Veterinary Medical Association, Schaumburg, v. 228, n. 2, p. 254-260, jan. 2006.

NERO, L. A.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F. Métodos rápidos e automatizados para enumeração de microrganismos indicadores em leite - utilização no Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 21, p. 115-26, 2000.

NEU, H. C. The crisis in antibiotic resistance. **Science**, v. 257, p. 1064-1073, 1992.

NICKERSON, S. C. Bovine mammary gland: structure and function; relationship to milk production and immunity to mastitis. **Agri-practice**, v. 15, p. 8-18, 1994.

NUNES, S. F.; CAVACO, L. M.; VILELA, C. L.; BEXIGA, R. Perfil de susceptibilidade a antibióticos de agentes etiológicos de mastite subclínica bovina em Portugal. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. Lisboa, 102 (563-564), p. 275-280. 2007.

OLDE REIKERINK, R. G.; BARKEMA, H.; KELTON, D.; SCHOLL, D. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 1366-1377, 2008.

OLIVEIRA, M. W. M. **Avaliação de resíduos de oxitetraciclina em leite de vacas com dermatite digital papilomatosa tratadas pelas vias intramuscular e dérmica**. 2006. 84p. Dissertação (Mestrado em Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, 2006.

OLIVEIRA, A. A. F.; MOTA, R. A.; SOUZA, M. I.; SÁ, M. E. P. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro frente a amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite subclínica bovina, no Agreste meridional de Pernambuco. **Hora Veterinária**, v. 22, n. 127, p. 8-10, 2002.

OLIVEIRA, A. A.; MELO, C. B.; AZEVEDO, H. C. Diagnóstico e determinação microbiológica da mastite em rebanhos bovinos leiteiros nos Tabuleiros Costeiros de Sergipe. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 226-230, jan./mar. 2009.

OLIVEIRA, U. V.; GALVÃO, G. S.; PAIXÃO, A. R. R.; MUNHOZ, A. D. Ocorrência, etiologia infecciosa e fatores de risco associados à mastite bovina na microrregião Itabuna-Ilhéus, Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 11, n. 3, p. 630-640, 2010.

OLIVEIRA, C. M. C; SOUZA, 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**, v. 31, n. 2, p. 104-110, fev. 2011.

OLIVEIRA, L.; HULLAND, C.; RUEGG, P. L. Characterization of clinical mastitis occurring in cows on 50 large dairy herds in Wisconsin. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 7538–7549, 2013.

OLIVER, S. P.; GILLESPIE, B. E.; HEADRICK, S.J.; MOOREHEAD, H.; LUNN, P.; DOWLEN, H.H.; JOHNSON, D.L.; LAMAR, K.C.; CHESTER, S.T.; MOSELEY, W.M. Efficacy of extended ceftiofur intramammary therapy for treatment of subclinical mastitis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 2393-2400, 2004.

OSTRENSKY, A. **Efeitos de ambiente sobre a contagem de células somáticas no leite de vacas da raça Holandesa no Paraná**. 1999. 144p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná – Curitiba, 1999.

OWENS, W. E.; RAY, C. H.; WASHBURN, P. J. Effect of selected antibiotics on *Staphylococcus aureus* present in milk from infected mammary glands. **The Journal of Veterinary Medical**, v. 40, p. 508-514, 1993.

OWENS, W. E.; RAY, C. H.; WATTS, J. L.; YANCEY, R. J. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 313-317, 1997.

PAAPE, M. J.; SHAFER-WEAVER, K.; CAPUCO, A. V. Immune surveillance of mammary gland secretion during lactation. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 480, p. 259-277, 2000.

PACE, J. L.; YANG, G. Glycopeptides: Update on an old successful antibiotic class. **Biochem. Pharmacol**, v. 71, n. 7, p. 968-80, 2006.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**, Oxford University Press: New York, cap. 10, 1995.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**, 3ed, Oxford University Press: New York, cap. 16; 2005

PEREIRA, J. G.; MONTANHINI, M. T. M.; BARCELLOS, V. C.; PINTO, J. P. A. N.; BERSOT, L. S. Testes de redutase para a avaliação da qualidade de leite cru refrigerado. **Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, p. 77-80, 2012.

PETERSSON-WOLFE, C. S.; MULLARKY, I. K.; JONES, G. M. Staphylococcus aureus Mastitis: Cause, Detection, and Control. **Virginia Cooperative Extension**. VirginiaTech, Virginia, p. 404-229, 2010.

PHILPOT, W. N., Qualidade do leite e controle de mastite: passado, presente e futuro, 2º Congresso Panamericano de qualidade do leite e controle da mastite. 24 a 27 novembro de 2002. **Anais...** Ribeirão Preto – SP.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Mastitis: Counter Attack. A strategy to combat mastitis**. Illinois: Babson Brothers Co., 150p., 1991.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. Vencendo a Luta Contra a Mastite. Piracicaba: **Westfalia Landtechnik do Brasil**, 192p, 2002.

PILLA, R.; SCHWARZ, D.; KÖNIG, S.; PICCININI, R. Microscopic differential cell counting to identify inflammatory reactions in dairy cow quarter milk samples. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 8, p. 4410-4420, 2012.

PINHEIRO, M. L. M.; ALBINO, F. T.; FONSECA, E. G.; TEIXEIRA, R. B.; PAIVA, A. L. C. Avaliação de mastite clínica e subclínica no Setor de Bovinocultura do Instituto Federal de Minas Gerais, Campus Bambuí. **II Semana de Ciência e Tecnologia do IFMG Campus Bambuí e II Jornada Científica**, Bambuí, MG, 2009.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrófilas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.

PINZÓN-SÁNCHEZ, C.; RUEGG, P. L. Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**. v. 94, p. 3397-3410, 2011.

PLASZEZESKI, F. R.; ROCHA, C. S.; PIONTE, P.; ZAFFARI, C. B. Utilização do teste do azul de metileno para detecção de microrganismos do leite. **In: III Salão de Iniciação Científica CEULJI-ULBRA**, 2005, Ji-Paraná. Resumos/ III Salão de Iniciação Científica, 2005.

POL, M.; RUEGG, P. L. Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 249–261, 2007a.

POL, M.; RUEGG, P. L. Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of gram-positive mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 262–273, 2007b.

PONTES NETTO, D.; LOPES, M. O.; OLIVEIRA, M. C. S.; NUNES, M. P.; MACHINSKI JÚNIOR, M.; BOSQUIROLI, S. L.; BENATTO, A.; BENINI, A.; BOMBARDELLI, A. L. C.; VEDOVELLO FILHO, D.; MACHADO, E.; BELMONTE, I. L.; ALBERTON, M.; PEDROSO, P. P.; SCUCATO, E. S. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**, v. 27, n. 1, p. 105-111, 2005.

PRETTO, L. G.; MÜLLER, E. E.; FREITAS, J. C.; METTIFOGO, E.; BUZINHANI, M.; YAMAGUTI, M.; SALVADOR, R. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis* em rebanhos leiteiros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, p. 143-145, 2001.

PYÖRÄLÄ, S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. **Veterinary Research**, v. 34, p. 565-578, 2003.

PYÖRÄLÄ, S. H.; PYÖRÄLÄ, E. O. Efficacy of parenteral administration of three antimicrobial agents in treatment of clinical mastitis in lactating cows: 487 cases (1989-1995). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 212, n. 3, p. 407-412, 1998.

PYÖRÄLÄ, S.; TAPONEN, S. Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 3-8, 2009

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. K.; CARTER, G. R. **Clinical Veterinary Microbiology**. Wolfe Publishing, London. - Mastitis, p. 327-344, 1994.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD, D. C.; GAY, C. C. **Clínica Veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equínos**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1737p., 2002.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats**. 10 ed. Philadelphia: Saunders, 2156p., 2007.

REBHUN, W. C. **Doenças do Gado Leiteiro**. Roca, São Paulo, p. 339-377, 2000.

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.

REYES, J. F. F; URDANETA, A. G.; D'POOL, G.; LEAL, K. V.; CAGNASO, M. A.; ANGELOSANTE, G. Detección de mastitis subclínica en bovinos mestizos doble propósito ordeñados en forma manual o mecánica. Comparación de tres pruebas diagnósticas. **Revista Científica**. Maracaibo, Venezuela. v. 15, n. 2, p. 109-118, 2005.

RIBEIRO, M.G. Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. In: ANDRADE, S.F. (Ed). **Manual de terapêutica veterinária**. 3ed. Roca: São Paulo, p. 759-771, 2008.

RIBEIRO, M. E. R.; PETRINI, L. A.; AITA, M. F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF JÚNIOR, W.; GOMES, J. F.; SCHRAMM, R. C.; MARTINS, P. R.; BARBOSA, R. S. Relação entre

mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na Região Sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n. 3, p. 287-290, jul/set, 2003.

RIBEIRO, M. E. R.; ZANELA, M. B.; PETRINI, L. A.; STUMPF JÚNIOR, W.; GOMES, J. F. SCHRAMM, R. C.; MARTINS, P. R. Relação entre os agentes contagiosos e ambientais com mastite clínica e subclínica. In: I Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 2004. **Anais eletrônico...** [CD-ROM], Passo Fundo, RS, 2004.

RIBEIRO, M. E. R.; PETRINI, L. A.; BARBOSA, R. S.; ZANELA, M. B.; GOMES, J. F.; STUMPF JÚNIOR, W.; SCHARMM, R. Ocorrência de mastite causada por *Nocardia* spp. em rebanhos de unidades de produção leiteira no sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, n. 4, p. 471-473, 2006.

RIBEIRO, M. G.; MOTTA, R. G.; PAES, A. C.; ALLENDORF, S. D.; SALERNO, T.; SIQUEIRO, A. K.; FERNANDES, M. C.; LARA, G. H. B. Peracute bovine mastitis caused by *Klebsiella pneumoniae*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 485-488, 2008.

ROBERSON, J. R.; WARNICK, L. D.; MOORE, G. Mild to moderate clinical mastitis: efficacy of intramammary amoxicillin, frequent milk-out, a combined intramammary amoxicillin and frequent milk-out treatment versus no treatment. **Journal of Dairy Science**, n. 87, p. 583-592, 2004.

RODRIGUES, A. C. O. **Identificação bacteriana a campo da mastite bovina para orientar protocolos de tratamento**. 2008. 95p. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo. 2008.

RODRIGUES, R.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; RUBINICH, J.; FONSECA, L. M. Detecção de alguns resíduos de antibióticos no leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 45, n. 4, p. 419-26, 1993.

ROSENBERGER, G. **Exame clínico dos bovinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 329-341, 1993.

ROY, J. P.; DESCÔTEAUX, L.; DUTREMBLAY, D.; BEAUDRY, F.; ELSENER, J. Efficacy of a 5-day extended therapy program during lactation with cephapirin sodium in dairy cows chronically infected with *Staphylococcus aureus*. **Canadian Veterinary Journal**, v. 50, p. 1257-62, 2009.

RUEGG, P. L. Investigation of mastitis problems on farms. **The Veterinary Clinics. Food Animal Practice**, v. 19, p. 47-73, 2003.

RUEGG, P. L.; ARAUJO, T. P. B. Effect of extended therapy of subclinical mastitis pathogens. **2nd Panamerican Congress on Milk Quality and Mastitis Control**. Nov 25-27, 2002. Ribeirao Preto, Brazil. 2002.

RUEGG, P. L.; REINEMANN, D. J. Milk quality and mastitis test. **Bovine Practice**, v. 36, p. 41-54, 2002.

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.

SÁ, M. E. P.; MOTA, R. A.; SOUZA, M. I.; OLIVEIRA, A. A. F. Etiologia da mastite subclínica em bovinos leiteiros do agreste meridional do estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, n. 2, p. 100-103, 2000.

SAEKI, E. K.; PEIXOTO, E. C. T. M.; MATSUMOTO, L. S.; MARCUSSO, P. F.; MONTERIO, R. M. Mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 3, p. 284-290, 2011.

SAINI, V.; OLDE RIEKERINK, R. G. M.; MCCLURE, J. T.; BARKEMA, H. W. Diagnostic accuracy assessment of sensititre and agar disk diffusion for determining antimicrobial resistance profiles of bovine clinical mastitis pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 1568–1577, 2011.

SANTOS, M. V. Efeito da mastite sobre a qualidade do leite e dos derivados lácteos. In: Congresso Panamericano de Qualidade do Leite e Controle de Mastite, Ribeirão Preto, SP. **Anais...**, 2, 2002.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para o controle da mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo: Manole, 314p., 2007.

SARGEANT, J. H.; LESLIE, K. E.; SHIRLEY, J. E.; PULKRABEK, B. J.; LIM, G. H. Sensitivity and Specificity of Somatic Cell Count and California Mastitis Test for Identifying Intramammary Infection in Early Lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 2018–2024, 2001.

SCHALLIBAUM, M. Impact of SCC on the Quality of Fluid Milk and Cheese. **National Mastitis Council**, Inc. 40th Annual Meeting Proceedings, p. 38-46, 2001

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experiments and observations leading to development of California mastitis test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 130, n. 5, p. 199-207, 1957.

SCHUKKEN, Y. H.; DELUYKER, H. A. Design of field trials for the evaluation of antibacterial products for therapy of bovine clinical mastitis. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 18, p. 274-283, 1995.

SCHUKKEN, Y. H.; HERTL, J.; BAR, D.; BENNETT, G. J.; GONZALEZ, R. N.; RAUCH, B. J.; SANTISTEBAN, C.; SCHULTE, H. F.; TAUER, L.; WELCOME, F. L.; GRÖHN, Y. T. Effects of repeated gram-positive and gram-negative clinical mastitis episodes on milk yield loss in Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 3091–3105, 2009.

SCHWARZ, S.; CHASLUS-DANCLA, E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. **Veterinary Research**, v. 32, p. 201-225, 2001.

SEARS, P. M.; MCCARTHY, K. K. Management and treatment of staphylococcal mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v 19, p. 171-185, 2003.

SHPIGEL, N. Y.; WINKLER, M.; ZIV, G.; SARAN, A. Relationship between in vitro sensitivity of coliform pathogens in the udder and the outcome of treatment for clinical mastitis. **Veterinary Record**, v. 142, p. 135-137, 1998.

SILVA, R. W. S. M.; PORTELLA, J. S.; VERAS, M. M. Manejo Correto da Ordenha e Qualidade do Leite. **Circular Técnica**, EMBRAPA. Bagé, RS, n. 27, 2002.

SILVA, B.; CARAVIELLO, D.; RODRIGUES, A.; RUEGG, P. L. Use of Petrifilm™ for mastitis diagnosis and treatment protocols. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING, 43, 2004, Charlotte. **Anais...** Verona: National Mastitis Council, p. 52-59, 2004.

SMITH, K. L.; HOGAN, J. S. Epidemology of mastitis and physiopathology. **In: Proceedings Panamerican Congress on Mastitis Control and Milk Quality**, Yucatan, México, p. 100-113, 1998.

SMITH, K. L.; TODHUNTER, D. A.; SCHOENBERGER, P. S. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 68, n. 6, p. 1531-1553, 1985.

SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F.; MOREIRA, C.; BRITO, M. A. V. P.; BASTOS, R. R. Fatores de risco associados a alta contagem de células somáticas do leite do tanque em rebanhos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, supl. 2, p. 251-260, abr. 2005a.

SOUZA, M. V.; REIS, C.; PIMENTA, F. C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 1, p. 27-36, 2005b.

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 Veterinaria e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1015-1020, 2009

SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 407-498, 2011.

SUARÉZ, C.; GUDIOL, F.; Beta-lactam antibiotics. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, n. 2, p. 116-129, 2009.

TAPONEN, S.; JANTUNEN, A.; PYÖRÄLÄ, E.; PYÖRÄLÄ, S. Efficacy of targeted 5-day combined parenteral and intramammary treatment of clinical mastitis caused by penicillin-susceptible or penicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 44, p. 53-62, 2003.

TAPONEN, S.; SALMIKIVI, L.; SIMOJOKI, H.; KOSKINEN, M. T.; PYÖRÄLÄ, S. Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culture. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 2610-2617, 2009.

TENHAGEN, B. A.; KÖSTER, G.; WALLMANN, J.; HEUWIESER, W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. **Journal of Dairy Science**, p. 89, n. 7, p. 2542-2551, 2006.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, 2006

THORBERG, B. M. **Coagulase-negative staphylococci in bovine sub-clinical mastitis**. 42p. Licentiate (Thesis in Biomedical Sciences and Veterinary Public Health). Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences. 2008.

THORNSBERRY, C.; BURTON, P.J.; YEE, Y. C.; WATTS, J. L.; YANCEY JUNIOR, R. J.. The activity of a combination of penicillin and novobiocin against bovine mastitis pathogens: development of a disk diffusion test. **Journal of Dairy Science**, n. 80, p. 413-421, 1997.

TODHUNTER, D. A.; SMITH, K. L.; HOGAN, J. S. *Serratia* species isolated from bovine intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 1860-1865, 1991.

TODHUNTER, D. A.; SMITH, K. L.; HOGAN, J. S. Environmental streptococcal intramammary infections of the bovine mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 2366-2374, 1995.

TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. 2.ed., Santa Maria: Ed. da UFSM, 2003.

TRUCHETTI, G.; BOUCHARD, E.; DESCÔTEAUX, L.; SCHOLL, D.; ROY, J. P. Efficacy of extended intramammary ceftiofur therapy against mild to moderate clinical mastitis in Holstein dairy cows: a randomized clinical trial. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 78, p. 31-37, 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. **Engenharia Química e de Alimentos** http://www.enq.ufsc.br/disci/eqa5216/material_didatico/Roteiro_aula_pratica.doc. Acesso em: 08 de agosto de 2012.

VALLE, J. L. E. Características físico-químicas e microbiológicas do leite de consumo. **In: PEIXOTO, A.M.** (ed.). Produção leiteira: problemas e soluções. FEALQ, p. 146 -151, 1985.

VAN DAMME, D. M. Mastitis caused by contaminated teat dip and dipping cup, **Veterinary Medicine and Small Animal Clinician**, v. 77, p. 541–544, 1982.

VIANA, L. C. **Duração das infecções naturais por estafilococos coagulase negativos e contagem de células somáticas em vacas primíparas**. 2000. 89p. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal), Universidade Estadual de Londrina, Paraná. 2000.

VIEIRA, L. C.; KANEYOSHI, C. M.; FREITAS, H. **Qualidade do leite**. Embrapa **Amazônia Oriental**. ISSN 1809-4325, Versão Eletrônica, dez./2005. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/GadoLeiteiroZonaBragantina/paginas/qualidade.htm>. Acesso em: 8 de agosto de 2012.

VON NUSSBAUM, F.; BRANDS, M.; HINZEN, B.; WEIGAND, S.; HÄBICH, D.; Antibacterial natural products in medicinal chemistry--exodus or revival? **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 45, p. 5072-129, 2006.

- WAGNER, S. A.; ERSKINE, R. J. Decision making in mastitis therapy. **Current Veterinary therapy: Food Animal Practice 5 ed.** Saunders Elsevier, p. 502-509, 2009.
- WALKER, R. D. Antimicrobial susceptibility testing and interpretation of results, p. 11–25. 2006. In S. Giguère, J. F. Prescott, J. D. Baggot, R. D. Walker, and P. M. Dowling (4 ed.), **Antimicrobial therapy in veterinary medicine**. Iowa State University Press, Ames, IA. 2006.
- WALSH, C. **Antibiotics: Actions, Origins and Resistance**, ASM Press: Washington, 2003.
- WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 16, p. 41-46, 1998.
- WENZ, J. R.; BARRINGTON, G.M.; GARRY, F. B.; DINSMORE, R. P.; CALLAN, R. J. Use of systemic disease signs to assess disease severity in dairy cows with acute coliform mastitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, no. 4, p. 567-572, 2001.
- WENZ, J. R.; GARRY, F. B.; LOMBARD, J. E.; ELIA, R.; PRENTICE, D.; DINSMORE, R. P. Short communication: Efficacy of parenteral ceftiofur for treatment of systemically mild clinical mastitis in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 3496–3499, 2005.
- WILSON, D. J.; GONZALEZ, R. N.; DIAS, H. H. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 10, p. 2592-2598, 1997.
- WILSON, D. J.; GONZALEZ, R. N.; CASE, K. L.; GARRISON, L. L.; GROHN, Y. T. Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. **Journal Dairy Science**, v. 82, p. 1664-1670, 1999.
- YASSIN, A. F.; HUPFER, H.; SIERING, C.; SCHUMANN, P. Comparative chemotaxonomic and phylogenetic studies on the genus *Arcanobacterium* Collins et al. 1982 emend. Lehnen et al. 2006: proposal for *Trueperella* gen. nov. and emended description of the genus *Arcanobacterium*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 1265–1274, 2011.

YU, V. L. *Serratia marcescens*: historical perspective and clinical review. **The New England Journal of Medicine**, v. 300, p. 887–893, 1979.

ZADOKS, R. N., SCHUKKEN, Y. H.; WIEDMANN, M. Multilocus sequence typing of *Streptococcus uberis* provides sensitive and epidemiologically relevant subtype information and reveals positive selection in the virulence gene pauA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 2407-2417, 2005.

ZADOKS, R.; MUNOZ, M. The emergence of *Klebsiella* as a major mastitis organism. **NMC 46th Annual Meeting Proceedings**, San Antonio, Texas. p. 100-111, 2007.

ZADOKS, R.; MUNOZ, M.; GRIFFITHS, H.; BENNETT, G.; SCHUKKEN, Y. *Klebsiella* – not by bedding alone. **NMC 47th Annual Meeting Proceedings**, New Orleans, Louisiana, p. 240-241, 2008a.

ZADOKS, R.; GRIFFITHS, H.; MUNOZ, M.; BENNETT, G.; THOMAS, E.; SCHUKKEN, Y. *Klebsiella* in feces of dairy cattle – where does it come from? **NMC 47th Annual Meeting Proceedings**, New Orleans, Louisiana, p. 242-243. 2008b.

ZAFALON, L. F.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J. V.; RESENDE, F. D. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 3, p. 577-585, 2007.

ZANETTE, E.; SCAPIN, D.; ROSSI, E. M. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. **Unoesc & Ciência – ACBS**, Joaçaba, v. 1, n. 1, p. 65-70, jan./jun. 2010.

ANEXO

ANEXO - Questionário Aplicado às Propriedades Leiteiras

Ficha da Propriedade

Projeto Identificação e Tratamento de Mastite Clínica

1. Proprietário ou funcionário responsável:
2. Localização:
3. Número total de vacas:
 - a. No rebanho:
 - b. Em lactação:
4. Raça:
5. Manejo nutricional:
6. Manejo sanitário:
7. Doenças mais comuns:
8. Produção diária de leite (Kg):
9. Contagem bacteriana total (CBT) do leite nos três últimos meses:
 - a. Último
 - b. Penúltimo
 - c. Antepenúltimo
10. Contagem de células somáticas (CCS) do leite nos três últimos meses:
 - a. Último
 - b. Penúltimo
 - c. Antepenúltimo
11. Qual o sistema de produção?
12. Qual o sistema de ordenha?

13. Número de ordenhas por dia?
14. As vacas são alimentadas durante a ordenha?
15. Quem participa da ordenha? Proprietário Funcionário
16. Quantas pessoas participam da ordenha?
17. A luva é utilizada para ordenhar as vacas? Sim Não
18. Sequência de preparação antes da ordenha:
- Eliminar os primeiros jatos de leite
 - Lavar o teto com água
 - Cobrir o teto com desinfetante
 - Secar o teto com papel
19. É colocado desinfetante sobre o teto após a ordenha? Sim Não
20. Possui tanque de refrigeração próprio: Sim Não
21. Realiza o teste CMT? Sim Não
22. Mastite clínica:
- a. Identificação:
 - b. Tratamento:
 - c. Produtos utilizados nos últimos 60 dias:
 - d. Quantas pessoas realizam o tratamento?
 - e. Realiza registros sobre os casos: Sim Não.
 - f. Segrega as vacas com mastite clínica para ordenhar por último? Sim Não
23. Realiza tratamento com vaca seca? Sim Não
- a.