

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

DISSERTAÇÃO

**ADAPTAÇÃO DO MÉTODO DA REDUTASE PARA AVALIAÇÃO DA
SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA EM LEITE DE VACAS COM
MASTITE**

Diego Medeiros Lima

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**ADAPTAÇÃO DO MÉTODO DA REDUTASE PARA AVALIAÇÃO DA
SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA EM LEITE DE VACAS COM
MASTITE**

DIEGO MEDEIROS LIMA

Sob a Orientação da Professora
Rita de Cássia Campbell Machado Botteon

E Co-orientação da Professora
Ângela de Oliveira

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, pelo Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ
Agosto de 2009

636. 2089819

L732a

T

Lima, Diego Medeiros, 1982-

Adaptação do método da redutase para avaliação da sensibilidade antimicrobiana em leite de vacas com mastite / Diego Medeiros Lima – 2009.

Xv, 91 f.: il.

Orientador: Rita de Cássia Campbell Machado Botteon.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária.

Bibliografia: f. 60-90.

1. Vaca - Mastite - Teses. 2. Agentes antiinfeciosos – Testes - Teses. 3. Leite - Contaminação - Teses. I. Botteon, Rita de Cássia Campbell Machado. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

DIEGO MEDEIROS LIMA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, pelo Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração Ciências Clínicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM ____/____/____.

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

Prof^a. Dr^a. Maria Helena Cosendey de Aquino - UFF

Prof^a. Dr^a. Terezinha Ferreira – UFF

Dedico esta dissertação aos meus pais, Delson e Rosana, por todo investimento e ensinamentos. À minha esposa Nathália, por me incentivar e acreditar no meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos, Rodrigo e Daniele.

Aos amigos que conheci, convivi, morei e cultivei durante minha vida.

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Rita de Cássia Campbell Machado Botteon, pela amizade, exemplos e ensinamentos transmitidos e, principalmente, pela confiança em mim depositada.

Ao Prof. Paulo de Tarso Landgraf Botteon, pela idéia do tema abordado e ajuda na execução das análises estatísticas.

À Prof^ª. Ângela de Oliveira pela significativa contribuição na conclusão do trabalho.

Às alunas de graduação Janne, Lídia e estagiários do laboratório de Bacteriologia do IV-UFRRJ pela ajuda na execução dos trabalhos de campo e no laboratório.

Ao Luciano, aluno de graduação, pela ajuda na identificação dos animais com mastite e auxílio nas coletas de campo.

Aos produtores rurais que disponibilizaram os animais para a realização deste trabalho.

À Capes e Faperj pelo auxílio financeiro.

RESUMO

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

Considerando a complexidade para realização do diagnóstico microbiológico e do antibiograma na rotina das propriedades leiteiras propomos a adaptação da prova da redutase utilizando o azul de metileno como indicador de atividade bacteriana para verificar a sensibilidade de bactérias causadoras de mastite a agentes antimicrobianos comerciais. Para esta finalidade amostras de leite de vacas com mastite clínica e subclínica foram avaliadas quanto ao tempo de redução do azul de metileno (TRAM) 0,02% com e sem a adição de agentes antimicrobianos em diferentes etapas. Inicialmente, amostras de leite de vacas com mastite subclínica foram avaliadas quanto ao TRAM frente aos antibióticos contidos nas principais formulações antimastíticas disponíveis no mercado, em três concentrações diferentes em relação ao controle adicionado de azul de metileno (AM). Num segundo momento foram avaliados o efeito do tempo de ação dos antibióticos sobre as bactérias do leite em relação ao TRAM e o efeito da temperatura. Não houve diferença significativa quanto ao TRAM em relação aos volumes de antibióticos e do AM, bem como da temperatura de incubação. Contudo o TRAM foi diferente entre os diferentes antibióticos. Estatisticamente determinou-se a partir da média do TRAM das amostras tratadas em relação aos controles a sensibilidade aos antibióticos adicionados. A eficácia clínica da prova da redutase foi testada em 26 vacas com mastite clínica tratadas aleatoriamente com formulações antimastíticas disponíveis no comércio local. Paralelamente amostras do leite de cada vaca tratada foram encaminhadas para cultura, identificação e teste de sensibilidade *in vitro*. Sete dias após a última aplicação intramamária, os animais foram avaliados pelo teste da caneca de fundo escuro e CMT efetuando-se a avaliação da sensibilidade pelo TRAM comparativamente ao antibiograma. Os testes foram concordantes com os resultados do teste clínico e sem diferença significativa. O teste da redutase mediante adição de antibióticos mostrou ser útil na escolha do antimicrobiano a ser utilizado no tratamento do quarto mamário afetado por mastite clínica ou subclínica.

Palavras-chave: mastite, antibiograma, redutase, azul de metileno

ABSTRACT

LIMA, D. M. Reductase method adaptation to evaluate antimicrobial sensibility in mastitic milk. Dissertation (Masters in Veterinary Medicine). Institute of Veterinary, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

In this study we propose to adapt the reductase test using methylene blue as an indicator of bacterial activity to verify the sensitivity of mastitis-causing bacteria to trade antimicrobial agents due to the difficulty in microbiological diagnosis and antibiogram in the routine of dairy farms. For this, samples of milk from cows with subclinical and clinical mastitis were evaluated on the reduction time of methylene blue (RTMB) 0.02% with and without the addition of antimicrobial agents in different stages. First, milk samples from cows with subclinical mastitis were evaluated for RTMB front of five antibiotics available on the market in three different concentrations compared to control with the addition of methylene blue (MB). A second step were evaluated the effect of time of action of antibiotics on bacteria in milk in relation to the RTMB and the effect of temperature. There was no significant difference in the RTMB over volumes of antibiotics and the MB and the incubation temperature. However, the RTMB was different among the different antibiotics. The sensitivity to antibiotics added was determined statistically from the average of the RTMB treated samples compared to controls. The clinical efficacy of the reductase test was evaluated in 26 cows with clinical mastitis treated randomly with commercially available antibiotics. At the same time, samples of milk from each cow treated were sent for culture, identification and *in vitro* sensitivity testing. Seven days after the last intramammary treatment, animals were assessed by the wired cup test and CMT comparing the sensitivity of the TRAM relation to antibiogram. The tests were consistent with the results of the clinical test and no significant difference. The reductase test by addition of antibiotics proved to be useful in the choice of antimicrobial use in the treatment of mammary quarter affected by clinical or subclinical mastitis.

Key words: mastitis, antibiogram, reductase, blue methylene

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Interpretação dos resultados para o teste de Redutase. Tempo de descoloração em função da carga microbiana segundo a IN 51/2002.	23
Tabela 02 - Relação entre o número de bactérias presentes no leite e o tempo de redução do azul de metileno.	23
Tabela 03 - Tempo médio de redução do azul de metileno em amostras tratadas com os antibióticos A (cloxacilina - 20mg/ml), B (gentamicina - 25mg/ml), C (espiramicina - 20mg/ml + neomicina - 20mg/ml), D (cefoperazone - 25mg/ml) e E (tetraciclina - 25mg/ml + bacitracina - 3,5mg/ml + neomicina - 45,625mg/ml) em relação aos controles (AM) e volumes adicionados 100 µL, 160 µL e 200 µL.	30
Tabela 04 - Tempo médio de redução do azul de metileno dos controles e amostras adicionadas dos produtos A (enrofloxacina + amoxicilina), B (gentamicina), C (cefoperazone) e D (bacitracina + neomicina + tetraciclina) em relação ao momento de adição do azul de metileno (0, 1, 3 e 4 horas).	32
Tabela 05 – Tempo médio de redução do azul de metileno (TMRAM) de amostras tratadas com antibióticos em relação aos controles e número de amostras que apresentaram redução em menos de 5 horas ou não reduziram (NR) em 48 horas.	33
Tabela 06 - Tempo médio de redução do azul de metileno (TMRAM) (em horas) de amostras de leite procedentes de vacas com mastite clínica (MC) ou subclínica (MSC) em diferentes escores (+, ++, +++) ao CMT, adicionadas dos antibióticos A, B, C, D E e resultados da análise estatística (Anova).	35
Tabela 07 – Tempo médio de redução do azul de metileno da amostra (TMRA) em função do tempo médio de redução do controle (TMRC) em função da relação entre TMRA / TMRC (1,91) e intervalo de confiança dos controles.	36
Tabela 08 – Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos A (cloxacilina), B (gentamicina), C (espiramicina + neomicina), D (cefoperazone) e E (tetraciclina + bacitracina + neomicina) segundo o TRAM da amostra em relação aos controles.	37
Tabela 09 - Número de amostras resistentes, sensíveis e com sensibilidade intermediária (SI) aos antimastíticos A (enrofloxacina + amoxicilina), B (gentamicina), C (cefoperazone) e D (bacitracina + neomicina + tetraciclina) pelo Tempo de Redução do Azul de Metileno (TRAM) e antibiograma, e porcentagem de resultados coincidentes.	39
Tabela 10 - Número de resultados positivos e negativos mediante tratamento clínico de 26 vacas com mastite clínica em relação ao perfil de sensibilidade dos princípios ativos dos produtos utilizados pelo antibiograma e TRAM.	40

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Critérios de avaliação da eficácia clínica dos produtos utilizados para tratamento da mastite clínica em 26 vacas em relação à sensibilidade ao antibiograma e TRAM.	29
Quadro 2 - Microorganismos isolados nas propriedades onde foi realizado o teste clínico.	40
Quadro 3 - Resultados do tratamento clínico com antimastíticos e respectivos agentes antimicrobianos A (enrofloxacina + amoxicilina), B (gentamicina), C (cefoperazone) e D (bacitracina + neomicina + tetraciclina) e perfil de sensibilidade pelo Tempo de Redução do Azul de Metileno (TRAM) e antibiograma.	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - TRAM três horas após início do teste (Tubo A1 – amostra contendo 100 μ L de antimastítico A - cloxacilina).	31
Figura 2 - TRAM 24 horas após início do teste (nos tubos E1 ao E5 ainda não houve redução do azul de metileno).	31
Figura 3 - TRAM quatro horas após início do teste.	32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	Situação Atual e Perspectiva da Pecuária Leiteira no Brasil	3
2.2	Legislação	4
2.3	Qualidade do Leite	5
2.4	Características e Composição do Leite	5
2.4.1	Definição	5
2.4.2	Composição	5
2.5	Microrganismos do Leite	6
2.5.1	Mesófilos	6
2.5.2	Termófilos ou termodúricos	6
2.5.3	Psicrófilos / psicrotróficos	7
2.5.4	Coliformes	7
2.5.5	Microrganismos patogênicos	7
2.6	Mastite	8
2.6.1	Importância	8
2.6.2	Definição e formas	9
A)	Mastite clínica	9
B)	Mastite subclínica	9
C)	Mastite contagiosa	10
D)	Mastite ambiental	10
2.6.3	Etiologia	10
A)	Agentes contagiosos	11
B)	Agentes ambientais	11
C)	Agentes oportunistas (Estafilococos Coagulase Negativos)	12
2.6.4	Diagnóstico	12
A)	Diagnóstico da Mastite Clínica	12
B)	Diagnóstico da Mastite Subclínica	12
C)	Exame Microbiológico	14
2.6.5	Tratamento	15
2.6.6	Controle e profilaxia	16
2.7	Mecanismo de Ação dos Antibióticos	16
2.8	Sensibilidade a Antimicrobianos	17
2.9	Resíduos de Antibióticos no Leite	19
2.10	Resistência Bacteriana	21
2.11	Teste de Redução do Azul de Metileno	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Local e Período	25
3.2	Amostras	25
3.3	Testes para Identificação de Mastite Clínica e Subclínica	25
3.4	Isolamento e Identificação de Microorganismos	25
3.5	Teste de Sensibilidade <i>in vitro</i>	26
3.6	Adaptação do Teste da Redutase	26
3.6.1	Efeito da concentração do antibiótico	26
3.6.2	Efeito do tempo de ação do antibiótico	27

3.6.3 Efeito da temperatura de incubação	27
3.6.4 Tempo de redução do azul de metileno mediante adição de antibióticos no leite em relação ao antibiograma	27
3.6.5 Teste clínico	28
3.7 Análises Estatísticas	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Efeito do Volume de Antibiótico Sobre o Tempo de Redução das Amostras	30
4.2 Efeito do Tempo de Ação do Antibiótico sobre o Tempo de Redução do Azul de Metileno	31
4.3 Efeito da Temperatura de Incubação Sobre o Tempo de Redução das Amostras	32
4.4. Tempo de Redução do Azul de Metileno Segundo a Qualidade da Amostra	33
4.5. Adaptação do Teste da Redutase para Avaliação da Sensibilidade a Antimicrobianos.	36
4.6 Tempo de Redução do Azul de Metileno Mediante Adição de Antibióticos no Leite em Relação ao Antibiograma.	38
4.7. Teste Clínico	39
5 CONCLUSÕES	42
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
7 ANEXO	63

1 INTRODUÇÃO

A mastite, considerada mundialmente a doença de maior impacto nos rebanhos leiteiros, devido à alta prevalência e prejuízos econômicos que acarreta, caracteriza-se não somente pela perda da capacidade secretora da glândula mamária, mas também por alterações físicas, químicas e bacteriológicas do leite. 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. O tratamento por outro lado também tem sérias implicações em Saúde Pública, devido sobretudo, à presença de resíduos de antibióticos no leite representada pela freqüente inoculação intramamária de antibióticos.

O diagnóstico de mastite clínica é simples em função das alterações que acarreta na mama e no leite. Entretanto para mastites subclínicas, sobretudo crônicas, os métodos de diagnóstico incluem exames microbiológicos, métodos químicos indiretos e a contagem de células somáticas do leite dos quartos mamários individuais, dos animais ou do rebanho.

O controle da mastite e a cura dos animais infectados constituem um dos maiores problemas da pecuária leiteira e a principal causa para o tratamento de vacas em lactação. O isolamento microbiano e o antibiograma de amostras de leite coletadas assepticamente é o método padrão para determinação da saúde do úbere e diagnóstico da mastite bovina, de modo que medidas de controle possam ser implementadas com maior eficiência. Existe, no entanto, 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 urgência na escolha da terapia.

Uma vez detectada a mastite, alguns fatores como espectro de ação, adequação ao manejo, tempo para comercializar o leite, resultados de sensibilidade, natureza da infecção e custo-benefício favorável devem ser levados em consideração para a escolha do tratamento a ser adotado. É comum, entretanto, que a escolha do antimicrobiano se faça empiricamente, por indisponibilidade temporária ou definitiva de dados laboratoriais. Estas indicações favorecem o surgimento de resistência bacteriana e a eficácia é afetada por fatores diversos.

Muitos estudos foram desenvolvidos visando avaliar a sensibilidade *in vitro* de agentes isolados do leite de vacas com mastite. Os resultados são divergentes segundo a região, os agentes etiológicos envolvidos e os antimicrobianos testados.

Na literatura revisada há poucos estudos comparando a sensibilidade *in vitro* e eficácia em testes clínicos. No entanto é comum os autores mencionarem que em muitas situações um antibiótico apresenta-se sensível no teste *in vitro*, porém não tem boa eficácia *in vivo*.

Verifica-se atualmente que apesar da disponibilidade de vários antimicrobianos para tratamento da mastite, o problema de resistência acentuou-se pelo uso indiscriminado e inadequado de antibióticos. A preocupação crescente com a presença de resíduos no leite gera uma busca por métodos alternativos para a abordagem clássica dos antibióticos.

O leite por sua riqueza de nutrientes é um meio de cultura ideal para a maioria dos microrganismos e sua multiplicação é rápida, se a temperatura for adequada.

O teste de redutase constitui um método indireto bastante simples e rápido para estimar a qualidade higiênica e bacteriológica do leite cru, em função do crescimento de microrganismos no leite provocar o consumo do oxigênio presente no meio. Esse fenômeno leva à produção de substâncias redutoras, diminuindo o potencial óxido-redutor que pode ser avaliado através da adição de uma substância indicadora como azul de metileno (AM). Em um meio contendo bactérias, o AM age como aceptor de elétrons, reduzindo-se e tornando-se incolor. Em geral, o tempo de redução é inversamente proporcional ao número de bactérias presentes na amostra no início da incubação e pode variar em função da taxa metabólica dos

diversos microrganismos que produzem substâncias redutoras no leite bem como com a presença de antibióticos na amostra.

Considerando a complexidade relacionada à realização do diagnóstico microbiológico e antibiograma na rotina das propriedades leiteiras propomos a adaptação da prova da redutase para avaliação da sensibilidade de bactérias causadoras de mastite a agentes antimicrobianos comerciais visando identificar de forma simples e rápida um antimicrobiano efetivo para o tratamento da mastite e assim, contribuir para a redução do tempo de diagnóstico, aumento da taxa de cura e melhoria da qualidade do leite.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Situação Atual e Perspectiva da Pecuária Leiteira no Brasil

Mundialmente a pecuária leiteira vem apresentando grandes avanços em produção e qualidade. Segundo dados da Food and Agriculture Organization (FAO, 2006), o Brasil é o sexto colocado no ranking internacional de produção de leite com uma produção que representa aproximadamente 5% da produção mundial. Nas Américas, o país é o segundo maior produtor e responsável por 67% do volume de leite produzido pelos países do Mercosul (NOAL, 2006).

Dados preliminares do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2006) indicam que três importantes fatores marcaram o setor leiteiro na última década: o aumento da produção, a redução do número de produtores e o decréscimo dos preços recebidos pelos produtores. Outro fator observado é a diminuição da sazonalidade da produção, que indica um aprimoramento técnico do produtor.

Os estabelecimentos agropecuários no Brasil contabilizam mais de cinco milhões de propriedades, um aumento de 7,4% em relação ao Censo do IBGE de 1996, devido principalmente às divisões de terra por herança e assentamentos de reforma agrária que têm ocorrido em todo o país. Os dados mostram, também, que em todo o Brasil, houve redução do número de propriedades que se dedicam ao leite, exceto no Distrito Federal, que aumentou 13%. A atividade leiteira, em 1996, estava presente em 37,2% do total de estabelecimentos agropecuários. Em dez anos os estabelecimentos que exercem a pecuária leiteira foram reduzidos para 25,8% do total.

Segundo a Associação Brasileira de Produtores de Leite CNA/DECOM e EMBRAPA, cerca de 800 mil produtores de leite vendem menos de 50 litros por dia e possui até dez vacas na linha de produção, o que os caracteriza como pequenos produtores de agricultura familiar.

A produção total de leite nos últimos 12 anos cresceu 49,42% (CARVALHO; CARNEIRO, 2009). Nesse período o volume médio por propriedade passou de 28 litros/dia para 52 litros/dia, um crescimento de 85,2%. Entre 1997 e 2000 mais de 61 mil produtores deixaram de entregar leite aos laticínios, a maioria pequenos produtores familiares que, provavelmente, passaram para o mercado informal ou deixaram de produzir leite. Houve também modificação na distribuição espacial do rebanho bovino, que se deslocou para a Região Norte. Os produtores especializados que investem em tecnologia, economias de escala e diferenciação do produto, se concentram em bacias leiteiras tradicionais, com destaque para os Estados de Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (CARVALHO; OLIVEIRA, 2006).

Como o número de propriedades exercendo pecuária de leite diminuiu, o crescimento da produção reflete uma especialização da atividade leiteira no país, e ocorreu graças à adoção de técnicas mais avançadas de melhoramento genético, melhor qualidade da alimentação e manejo mais adequado que resultou em maior produtividade por unidade de produção e por animal (CARVALHO; OLIVEIRA, 2006).

O uso do conhecimento científico permitiu superar obstáculos no processo produtivo, que até então mantinha uma dependência excessiva dos fatores naturais. Novos processos técnicos promoveram o aumento da produtividade e redução dos custos, abrindo caminho para a lucratividade. Existe ainda um grande número de pequenos produtores que opera com baixa produtividade aliada a altos custos, resultantes em parte, da prática extrativista com pouca ou nenhuma tecnologia em oposição a outros produtores altamente especializados (JANK et al., 1999).

Visto que a produção por propriedade no Brasil é muito baixa se comparada à média de países como Estados Unidos, Nova Zelândia e Austrália, cujas médias estão acima de 2 mil

litros/fazenda/dia, há ainda um longo caminho a percorrer para que a atividade leiteira no Brasil se torne eficiente e sustentável.

2.2 Legislação

Após verificar a insuficiente qualidade do leite produzido no país, o Ministério da Agricultura iniciou há cerca de 10 anos uma discussão envolvendo os setores científicos e econômicos da pecuária leiteira, buscando alternativas para melhorar a qualidade do leite no país. O debate resultou na Instrução Normativa nº 51/2002, que estabelece os requisitos mínimos que devem ser observados para produção, identidade e qualidade de leites tipos A, B, C, pasteurizado e cru refrigerado, além de regulamentar a coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel (BRASIL, 2002a).

Outro incentivo à modernização da produção leiteira foi a Resolução nº 3088 (BRASIL, 2003), que aprovou o financiamento de equipamentos de resfriamento para produtores de leite e a coleta a granel. O objetivo dessas medidas foi a adequação das normas publicadas no RIISPOA (BRASIL, 1952) às atuais realidades de produção e consumo. As principais mudanças foram a implementação de novos padrões de qualidade e a diferenciação do pagamento ao produtor.

Como a intenção é oferecer ao consumidor produtos lácteos de qualidade comparável aos países de pecuária leiteira desenvolvida, é importante a análise do leite individual para monitorar sua qualidade e identificar problemas, auxiliando os programas de melhoramento genético, manejo nutricional e controle e prevenção de mastite (REIS et al., 2007).

A Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL) criada através da Instrução Normativa 37 (BRASIL, 2002b) conta com oito laboratórios distribuídos nas Regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste e tem por finalidade fazer as análises do leite cru para contagem de células somáticas (CCS), contagem total de bactérias (CBT) e detecção de resíduos de antibióticos.

Através da nova legislação (Instrução Normativa 51 de 18/09/2002) foi previsto um calendário diferenciado em termos regionais para a progressiva adaptação de produtores e laticínios às novas exigências de qualidade do leite cru refrigerado, que se estende de 2005 a 2011 para a região Centro-Sul (Sul, Sudeste e Centro-Oeste) e de 2005 a 2012 para as regiões Norte e Nordeste.

A CCS e CBT que definem, respectivamente, a sanidade do rebanho no que se refere, principalmente, à mastite e higiene do processo de obtenção da matéria-prima, bem como o resfriamento do leite na propriedade são os principais indicadores dos objetivos a serem alcançados pela normativa.

A legislação define que o leite deve ter as seguintes características sensoriais de aspecto, cor, sabor e odor: líquido branco, opalescente e homogêneo, com odor e sabor característicos, isento de odores e sabores estranhos. Os contaminantes orgânicos e inorgânicos e resíduos biológicos não devem estar presentes em quantidades superiores aos limites estabelecidos pela legislação específica e nenhum tipo de aditivo ou coadjuvante é admitido, da mesma forma que resíduos de antibióticos e de outros agentes inibidores do crescimento microbiano devem estar ausentes.

O leite obtido deve ser coado em recipiente apropriado e submetido ao resfriamento a uma temperatura não superior a 4°C em até três horas após o término da ordenha quando armazenado em tanque de refrigeração por expansão direta. Em se tratando de tanque de refrigeração por imersão, este deve ser dimensionado de modo que permita refrigerar o leite até temperatura igual ou inferior a 7°C no tempo máximo de três horas após a ordenha (BRASIL, 2002a).

Das 230 indústrias que analisam o leite no laboratório da Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz - Clínica do Leite (ESALQ/USP), apenas 11 (5%) têm programas de pagamento por qualidade. O leite produzido por essas empresas tem uma CBT média de 90 mil UFC/ml, contra 500 mil das que não possuem programas de pagamento por qualidade. Difícil haver um argumento melhor para mostrar que, diante de políticas de estímulo/penalização, a tendência é haver melhoria da qualidade (NEIVA, 2008).

2.3 Qualidade do Leite

A secreção láctea é importante na nutrição humana e animal e conforme a variação das necessidades de alimentação e das preferências do consumidor, o enfoque da produção tem sido modificado com o tempo. Nesse sentido, inicialmente houve um interesse no volume de leite produzido. Em anos recentes, a composição (gordura, proteína, sólidos totais) e a qualidade higiênica do leite (CCS e CBT) passaram a ser determinantes para sua aceitação pela indústria e pagamento ao produtor.

Os laticínios utilizam-se do mecanismo da bonificação por produção e qualidade do produto, todavia o que mais pesa é o volume da produção em detrimento da qualidade do produto (BEM; FABRINI, 2005).

De acordo com Relatório Setorial (FINEP, 2008), o processo de modernização do setor leiteiro ainda não mostrou resultados em termos de melhoria da matéria-prima recebida nos laticínios. No entanto, a “granelização” teve como uma de suas conseqüências a eliminação de inúmeros produtores do mercado formal. Os dados justificam ações que impeçam a inviabilidade produtiva e apontam para a emergência de iniciativas em apoio ao pequeno produtor.

2.4 Características e Composição do Leite

2.4.1 Definição

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outras espécies deve denominar-se segundo a espécie da qual proceda (BRASIL, 2002a).

O leite destinado ao consumo deve ter as seguintes características e propriedades: agradável (com preservação das suas propriedades de sabor, cor, odor e viscosidade); limpo (livre de sujeiras, microrganismos e resíduos); íntegro (composição correta e conservação adequada); seguro (não cause problemas à saúde do consumidor) (BRASIL, 1996).

O preenchimento desses critérios depende de um programa baseado principalmente na prevenção de doenças; adoção de medidas de higiene antes, durante e após a ordenha; conservação e transporte em condições adequadas. Para a obtenção da matéria-prima estão previstas na nova legislação medidas específicas de controle e profilaxia da mastite.

2.4.2 Composição

Rico em proteínas, energia e minerais, para a espécie humana o leite é um dos alimentos mais completos. É indicado para todas as idades e somente em casos limitados há restrições de seu uso (NOAL, 2006).

Os componentes naturais do leite são classificados como principais e secundários quanto a sua contribuição por unidade de massa. Os constituintes principais incluem água, glicídios (basicamente lactose), gordura e proteínas - principalmente caseína e albumina,

enquanto que os constituintes secundários englobam basicamente minerais e as vitaminas A, D, E e K (GONZÁLEZ et al., 2001; GONZÁLEZ; CAMPOS, 2003).

Outros componentes incluem metabólitos de excreção, como a uréia, produto do catabolismo dos aminoácidos. Também, alguns metabólitos presentes no sangue por desordens metabólicas, podem estar presentes ou aumentados no leite. Assim, em estado de cetose, podem aparecer corpos cetônicos no leite, principalmente o beta-hidroxibutirato (WITTEWER, 2000).

2.5 Microrganismos do Leite

Os principais microrganismos que contaminam o leite são as bactérias. Vírus, fungos e leveduras têm participação reduzida, embora sejam importantes em determinadas situações. Do ponto de vista de consumo, os microrganismos presentes no leite podem ser patogênicos ou saprófitas (contaminantes ou deteriorantes), que não causam doenças, mas promovem deteriorações dos produtos, dando origem a características sensoriais indesejáveis, interferindo nos processos de fermentação e diminuindo a vida de prateleira (HAYES, 1993; JAY, 2005).

As bactérias do leite podem ser classificadas de acordo com a temperatura de seu melhor crescimento em psicrófilas, mesófilas e termófilas. Além destas outras categorias de bactérias são importantes, as termodúricas e psicrotróficas. Outros microrganismos importantes são os coliformes (HAYES; BOOR, 2001). O tratamento térmico do leite, assim como a refrigeração do leite cru e do leite processado tornam o alimento mais seguro para o consumo e aumentam a durabilidade dos produtos lácteos.

2.5.1 Mesófilos

Microrganismos aeróbios mesófilos correspondem ao grupo de maior importância em alimentos por incluir a maioria dos contaminantes que crescem melhor em temperatura ambiente (OLIVEIRA; PARMELEE, 1976). Têm a temperatura ótima de multiplicação entre 25 °C e 40 °C, mínima entre 5 °C e 25 °C, e máxima entre 40 °C a 50 °C (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Bactérias mesófilas multiplicam-se rapidamente quando o leite não é armazenado sob refrigeração. Nessas condições lactobacilos, estreptococos, lactococos e coliformes se multiplicam rapidamente, principalmente nos meses mais quentes, fermentando a lactose e produzindo ácido láctico e outros ácidos orgânicos que causam a acidez do leite (BRITO et al., 2007).

2.5.2 Termófilos ou termodúricos

As bactérias termófilas são aquelas cuja temperatura ótima de crescimento situa-se entre 55-65 °C com o máximo, para algumas espécies, podendo atingir 75-90 °C e o mínimo em torno de 35 °C (ICMSF, 1980). São encontradas normalmente em pequeno número no leite cru, mas em determinadas situações, podem atingir grandes populações. Seus principais representantes são os gêneros *Bacillus spp.* e *Clostridium spp.*, encontrados em silagens, no solo e no esterco. Alta contagem de bactérias termófilas é frequentemente associada com deficiências crônicas ou persistentes de limpeza dos equipamentos de ordenha ou das tetas (BRITO et al., 2007).

2.5 3 Psicrófilos / psicrotróficos

Os psicrófilos constituem o grupo de bactérias que encontram em temperaturas que podem variar de 0° a 20°C sua temperatura ótima de crescimento. Na área de microbiologia de alimentos, os organismos capazes de se desenvolver na faixa de temperatura considerada adequada para os psicrófilos, mesmo que essa temperatura não seja ótima para o seu crescimento, são denominados psicrotróficos e são assim denominados por crescerem entre temperaturas de 0° a 40°C (COLLINS, 1981; SANTANA, 2001).

Os principais gêneros de bactérias psicrotróficas que contaminam o leite são não-patogênicos, como *Pseudomonas* spp, *Serratia* spp, *Lactobacillus* spp, *Flavobacterium* spp, *Corynebacterium* spp, *Micrococcus* spp e *Clostridium* spp. Entretanto, microrganismos como *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e *Bacillus cereus* são capazes, em condições especiais, de provocar doenças em seres humanos, quando da ingestão de leite cru (FONSECA; PEREIRA, 1999).

Altas contagens de psicrotróficos estão associadas a deficiências de higiene da ordenha e utensílios, refrigeração marginal (entre 5 e 15°C), ou tempo de estocagem do leite refrigerado é demasiadamente longo. Quando as condições de higiene da produção de leite são boas, a contagem de bactérias psicrotróficas é baixa, mas, se as condições são ruins, estas podem corresponder a 75% ou mais do total da população bacteriana (ROGICK, 1982).

Quanto maior o tempo de estocagem sob baixas temperaturas (7 a 10°C) de um leite com altas contagens iniciais de microrganismos, maiores serão as possibilidades de alterações pela ação de microrganismos psicrotróficos, com predomínio do gênero *Pseudomonas* spp. (MUIR, 1996). Este gênero, além de ser o mais prevalente, apresenta espécies capazes de produzir enzimas resistentes às temperaturas de processamento (GRIFFITHS, 1990).

A contaminação da água pode estar relacionada à presença de *Pseudomonas* spp. no leite, bem como o seu desenvolvimento em condições de refrigeração (COUSIN; BRAMLEY, 1991). Além disso, foi detectada a presença de *Pseudomonas* spp. em superfície de tetos e no leite de vacas com mastite (DESMASURES; GUEGUEN, 1997).

2.5 4 Coliformes

Os principais coliformes compreendem os gêneros *Escherichia* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* e *Klebsiella* spp. A principal fonte desses microrganismos é o trato intestinal dos animais. Embora sejam considerados como indicadores de contaminação fecal, há alguns que estão amplamente distribuídos no ambiente, e algumas cepas dos gêneros *Enterobacter* e *Klebsiella* podem não ter origem entérica (HAJDENWURCEL, 1998). A presença destes microrganismos no leite cru é frequentemente atribuída às práticas precárias de higiene durante a ordenha e nas etapas subsequentes (MORENO et al., 1990).

2.5 5 Microrganismos patogênicos

A qualidade do leite assume destacada importância também sob o ponto de vista de Saúde Pública. No Brasil, são freqüentes os relatos de doenças associadas ao consumo de leite ou derivados. Contribui para isto, entre outras causas, o fato de mais de 44% do leite consumido no país ser comercializado sem qualquer tratamento térmico ou controle laboratorial e proveniente do mercado informal (ANUÁRIO MILKBIZZ, 1999).

Existe um grande número de agentes de doenças infecciosas que podem ser transmitidos ao homem pelo leite. Os patógenos mais importantes atualmente são *Salmonella* sp., *Escherichia coli* patogênica, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* e *Staphylococcus aureus*. A maioria dos microrganismos patogênicos é

destruída pela pasteurização. Entretanto, existe a possibilidade de sobrevivência de alguns microrganismos, chamados termodúricos. É possível também a contaminação após a pasteurização e outra possibilidade é o tratamento térmico inadequado. Algumas bactérias, como *S. aureus*, produzem enterotoxinas que não são inativadas pelo calor e alguns vírus como o da febre aftosa não são destruídos pela pasteurização, e podem sobreviver à temperatura de 72 °C por 15-17 segundos (SILVA; GROOTENBOER, 2008).

2.6 Mastite

2.6.1 Importância

A mastite é considerada mundialmente a doença de maior impacto nos rebanhos leiteiros, devido à elevada prevalência e aos prejuízos econômicos que acarreta (GERMANO; GERMANO, 1995). A mastite pode proporcionar grandes prejuízos, não somente pela queda da produção devido à perda da capacidade secretora da glândula mamária, mas também pelas 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).

De acordo com o Conselho Nacional de Mastite dos EUA, rebanhos leiteiros que não adotam medidas de controle para mastite apresentam cerca de 50% das vacas infectadas, em média, em dois quartos (NMC, 1996). As estimativas brasileiras apontam valores de até 80% para a prevalência da doença em rebanhos dos estados de Minas Gerais e São Paulo (BRABES et al., 1999). Os prejuízos estimados no Brasil são de 2,8 bilhões de litros de leite/ano (FONSECA; SANTOS, 2000).

Philpot (1984) calculou que 70% das perdas econômicas, devido à mastite podem ser atribuídas à queda de produção, 8% ao descarte de leite contaminado, 8% à gastos com assistência veterinária e os 14% restantes a gastos com medicamentos e mão-de-obra, à diminuição do valor comercial e à reposição do plantel. Entretanto, muitos produtores ainda não se preocupam com este problema (SILVA, 1996; COSTA et al., 2000a). De Graves e Fetrow (1993) destacaram que um aspecto frustrante é que 75% das perdas são percebidas pelo produtor.

Em consequência da inflamação dos tecidos do úbere ocorrem alterações na composição do leite tanto em termos de qualidade quanto na quantidade dos componentes (BRAMLEY, 1992). Nos processos inflamatórios da glândula mamária aumentam as concentrações de sódio e cloretos, e as quantidades de cálcio, fósforo, magnésio e potássio diminuem. Estas alterações causam diminuição da tolerância ao calor, alteram as propriedades organolépticas e acarreta diminuição da qualidade dos produtos derivados do leite (DOMINGUES et al., 1999).

Os efeitos da mastite sobre a proteína do leite são de natureza qualitativa, uma vez que os valores absolutos de proteína bruta não sofrem alterações significativas. Assim, o leite proveniente de vacas com mastite apresenta menor teor de caseína, a proteína nobre do leite, acompanhada do aumento dos níveis de proteínas sérias, como albuminas e imunoglobulinas (SCHULTZ, 1997). As consequências mais importantes destas alterações manifestam-se sobre o rendimento industrial e o valor nutritivo dos produtos lácteos.

Durante a evolução da mastite há um influxo maior de células somáticas para a glândula mamária (BIBALKE, 1994; NICKERSON, 1994). Estas células estão normalmente presentes no leite em número reduzido. O aumento na CCS tem diversas consequências negativas sobre o leite fluído e seus derivados, com destaque para as perdas no rendimento industrial e diminuição do “tempo de prateleira” (*shelf-life*), devido principalmente à ação de

enzimas proteolíticas, as quais, em grande parte, permanecem ativas mesmo após a pasteurização do leite. As enzimas proteolíticas geram um sabor amargo, enquanto que as enzimas lipolíticas predispõem à ocorrência de sabor rançoso, em função da quebra dos ácidos graxos de cadeia curta (MURPHY, 1989; RENEAU; PACKARD, 1991).

Além disso, há ainda o risco de veiculação de microrganismos patogênicos e/ou suas toxinas através do leite (FORSYTHE, 2002).

O tratamento das mastites, por outro lado, também apresenta sérias implicações em saúde pública, devido, sobretudo, à presença de resíduos de antibióticos no leite representada, pela freqüente inoculação intramamária de antibióticos (ALLISON, 1995).

2.6.2 Definição e formas

O termo mastite refere-se à inflamação da glândula mamária geralmente de caráter infeccioso. Caracteriza-se por alterações físicas, químicas e geralmente bacteriológicas do leite, e por alterações patológicas do tecido glandular (RADOSTITS et al., 2002).

A mastite segundo a apresentação dos sintomas é classificada em clínica ou subclínica, e quanto às formas em superaguda, aguda, subaguda e crônica (PHILPOT; NICKERSON, 2002).

Existe outra grande divisão conceitual da mastite que está relacionada com o tipo de agente, geralmente classificados em dois grupos: os causadores de mastite contagiosa, que se disseminam de um quarto infectado para outro quarto ou vaca, e os promotores de mastite ambiental, geralmente presentes no meio ambiente e que a partir dessa fonte alcançam a teta (PHILPOT; NICKERSON, 1991; BRITO; BRITO, 1998a; FONSECA; SANTOS, 2000).

A) Mastite clínica

Manifesta-se por sinais evidentes como edema, aumento de temperatura, endurecimento e dor 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, morte (ROSENBERGER, 1993). O leite pode estar aquoso, contendo grumos além de fibrina, soro, sangue e pus (FONSECA; SANTOS, 2000).

A mastite clínica pode ser classificada em decorrência da gravidade em superaguda, aguda, subaguda e crônica (PHILPOT; NICKERSON, 2002). 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, desidratação e septicemia podendo ocorrer choque e morte (DOOD, 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).

B) Mastite subclínica

Na forma subclínica não se observam alterações macroscópicas 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; SANTOS, 2000).

As perdas na produção de leite atribuídas às mastites subclínicas alcançam de 10 a 26% do total da produção, de acordo com grau de intensidade do processo inflamatório, da prevalência da doença, da patogenicidade do agente infeccioso e do estágio de lactação. Além

da diminuição na produção, observa-se perda da qualidade do leite e da função do parênquima glandular, tornando o úbere uma reserva de patógenos (RATNAKUMAR et al., 1996).

No Brasil, segundo Brant e Figueiredo (1994), a mastite subclínica caracteriza-se pela alta incidência (44,8% a 97%), e redução da produção de leite entre 25,4% e 43%. Fonseca e Santos (2000) descreveram como alterações na composição do leite decorrentes da mastite o aumento da contagem de células somáticas (CCS), dos teores de cloreto, sódio e proteínas séricas e, diminuição dos teores de caseína, lactose e gordura.

C) Mastite contagiosa

É causada por patógenos cujo 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 panos usados na limpeza dos tetos (PHILPOT; NICKERSON, 2002).

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.

Tem sido estudada a participação de moscas como agentes transmissores da mastite contagiosa, e alguns estudos demonstram que estas podem ter papel importante como vetor em fazendas com alta presença desses insetos (HACHEM, 2005).

D) Mastite ambiental

Caracteriza-se pela alta incidência de casos clínicos, geralmente de curta duração e manifestação aguda (FONSECA; SANTOS, 2000). Causa consideráveis prejuízos econômicos ao sistema de produção, pela intensidade do quadro clínico que pode resultar em morte (MARQUES, 2003).

Diversos agentes que habitam preferencialmente o ambiente das vacas leiteiras (FONSECA; SANTOS, 2000) e as mãos dos ordenhadores (BRITO; BRITO, 1998a) 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 de 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).

2.6.3 Etiologia

A etiologia da mastite é complexa e a doença pode ser relacionada a diferentes causas: alérgica, fisiológica, infecciosa, metabólica, psicológica e traumática. Vários são os agentes etiológicos da mastite bovina. São citadas na literatura mais de 130 espécies de microrganismos envolvidos com sua etiologia (RIBEIRO et al., 2003), incluindo bactérias, fungos, algas e vírus (WATTS, 1998).

As mastites de origem bacteriana são as mais frequentes (GONÇALVES, 2006), com predominância de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* (HARMON, 1994).

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).

A) Agentes contagiosos

Staphylococcus aureus destaca-se como microrganismo causador de mastite contagiosa de maior importância, de maior ocorrência nos rebanhos mundiais, e de tratamento mais difícil devido à elevada resistência aos antibióticos (GODDEN et al., 2002; FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004).

Também no Brasil o *S. aureus* é apontado como o principal agente causador de mastite (LANGENEGGER et al., 1970, NADER FILHO et al., 1983, LANGONI et al., 1991, LARANJA; MACHADO, 1994, BRABES et al., 1999; RABELLO, 2003; FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004; SÁ et al., 2004; FREITAS et al., 2005).

S. aureus é capaz de causar infecções de longa duração, com tendência a se tornarem crônicas, com baixa taxa de cura e grande perda na produção de leite (SABOUR et al., 2004). Esta bactéria pode formar focos encapsulados nas porções altas do úbere, desenvolvendo uma forma subclínica, que dificulta a cura bacteriológica durante a lactação, pois os antibióticos usados nesta fase atuam por pouco tempo devido ao período de retirada no leite, não permanecendo em níveis terapêuticos por tempos suficientes para determinar a eliminação completa da bactéria (LISBOA; PIANTA, 1994; FIGUEIREDO, 1995).

Em artigo de revisão, Langeneger et al. (1981), relataram que as perdas por mastite subclínica causada por *S. aureus* são três vezes maiores que os prejuízos decorrentes da mastite clínica.

É fundamental destacar a importância do *Streptococcus agalactiae* pela alta CCS e também porque pode determinar uma alta contagem total de bactérias no leite (LARANJA; MACHADO, 1994). No entanto quando o diagnóstico é feito rapidamente são raros os casos de perda do quarto afetado (LARANJA, 1996). *S. agalactiae* não sobrevive fora do úbere e de lesões nos tetos por mais de três semanas e são isolados das mãos de ordenhadores até dez dias após a ordenha (FERNANDES, 2006).

B) Agentes ambientais

Escherichia coli, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp. e *Pseudomonas* sp são as bactérias gram-negativas mais relatadas como causadoras de mastites ambientais. As mastites causadas por esses agentes, com destaque para *E. coli* apresentam normalmente sintomatologia superaguda, com evolução rápida e na maioria das vezes com prognóstico sombrio, para saúde da glândula mamária e do animal, requerendo intervenção imediata e associação de antibioticoterapia sistêmica e intramamária. São isolados frequentemente no pós-parto, indicando falhas na higienização do úbere, uma vez que são basicamente intestinais e ambientais (FONSECA, 1996).

Streptococcus uberis e *Streptococcus dysgalactiae* são isolados frequentemente de lesões da pele do úbere, podendo também ser menos incidentes na pele sadia. Podem sobreviver fora da glândula mamária, em ordenhadeiras mal higienizadas e pêlos das vacas. São encontrados com frequência na fase seca e seu isolamento indica falha no processo de ordenha, seja ela manual ou mecânica (GONÇALVES, 2006).

C) Agentes oportunistas (Estafilococos Coagulase Negativos)

Estafilococos Coagulase Negativos (ECN) são patógenos comuns em casos subclínicos. *S. epidermidis*, *S. chromogenes* e *S. simulans* são encontrados com alta frequência no leite. ECN foram as bactérias mais isoladas em amostras de leite de vacas com e sem mastite ao longo de 120 dias após o parto (LAFRANCHI, et al., 2001). Outros autores (NADER FILHO, 1985; MYLLYS, 1995; BODDIE et al., 1987; TRINIDAD et al., 1990; BRANT; FIGUEIREDO, 1994; HALLBERG et al., 1995) também destacaram a importância do ECN como agente etiológico de mastite.

2.6.4 Diagnóstico

O diagnóstico de mastite clínica é simples em função das alterações que acarreta na glândula mamária e no leite. Entretanto mastites subclínicas, sobretudo crônicas não são diagnosticadas pelos métodos rotineiros de exame clínico: inspeção, palpação e alterações do leite (RADOSTITS et al., 2002). Os métodos de diagnóstico da mastite subclínica incluem exames microbiológicos, métodos químicos indiretos e a Contagem de Células Somáticas (CCS) do leite dos quartos mamários individuais, dos animais ou do rebanho (QUINN et al., 1994; PEREIRA, 2005).

A) Diagnóstico da mastite clínica

O teste da caneca telada 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 mastite clínica. Permite a detecção do leite clinicamente anormal pela presença de alterações como grumos, coágulos, pus, sangue e aparência aquosa (MARGATHO et al., 1998).

Fonseca e Santos (2000) e Philpot e Nickerson (2002) citam que nas salas de ordenha, onde o piso pode ser de fácil lavagem e imediatamente limpo com jatos de água, os primeiros jatos de leite podem ser observados diretamente sobre o piso. Philpot e Nickerson (2002) defendem esse procedimento, por evitar o esguicho do leite contaminado nos tetos e no úbere, e também que o ordenhador manipule uma caneca contaminada.

B) Diagnóstico da mastite subclínica

A CCS no leite é um método convencional e amplamente usado para o diagnóstico da mastite subclínica em regiões de pecuária leiteira desenvolvida. É também o parâmetro mais empregado para avaliação da qualidade do leite, e faz parte do conjunto de atributos essenciais para aceitação do leite pela indústria (BRASIL, 2002a).

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 e como indicativo da qualidade do leite produzido na propriedade (MÜLLER, 2002).

Células somáticas são todas as células presentes no leite, que incluem os leucócitos mobilizados da corrente sanguínea para o tecido mamário diante de alterações na permeabilidade capilar e as células de descamação do epitélio glandular secretor (HARMON, 1994). A CCS é influenciada por fatores como época do ano, raça, estágio de lactação, produção, número de lactações, estresse, nutrição, condições climáticas e doenças intercorrentes, mas especialmente pela presença de infecções intramamárias, tornando-se um

indicador bastante confiável de saúde da glândula mamária (OSTRENSKY, 1999; VIANA, 2000).

Em animais livres de infecção há pequeno número de células somáticas no leite, com contagens de 50 a 200 mil células/ml (KITCHEN, 1981; PAAPE et al., 2000). A ocorrência de infecção provoca a liberação de substâncias químicas que induz a migração de células brancas do sangue para o interior da glândula, com a finalidade de combater os agentes patogênicos. Na presença de inflamação são comuns CCS acima de 500 mil células/ml de leite (PHILPOT; NICKERSON, 1991) passando a predominar neutrófilos, seguidos por macrófagos, linfócitos e o número de células epiteliais permanece inalterado (PAAPE et al., 2000). Com o aumento na CCS, a composição do leite, a atividade enzimática, o tempo de coagulação, a produtividade e a qualidade dos derivados lácteos são influenciados negativamente (KITCHEN, 1981).

Vários testes são empregados para avaliar o teor de células somáticas do leite: contagem microscópica direta em lâminas, Califórnia Mastitis Test (CMT), Wisconsin Mastitis Test (WMT) e “Whiteside”, além da contagem eletrônica de células (RUPP et al., 2000). Dentre estes se destacam o CMT pela ampla utilização e praticidade e a contagem eletrônica pela precisão da técnica.

A contagem microscópica direta em lâminas permite distinguir os tipos celulares presentes nas amostras de leite, possibilitando a visualização do microrganismo. Embora seja um método padrão tem pouca praticidade, principalmente se for analisado um grande número de amostras (PEREIRA, 2005).

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 contagem de células (MARQUES, 2003).

O CMT que consiste na coleta de leite dos quartos individualmente, adicionando-se um detergente aniônico neutro, que atua rompendo a membrana das células e liberando o material nucléico (DNA), que apresenta alta viscosidade é um dos testes mais usados mundialmente para o diagnóstico da mastite subclínica (FONSECA; SANTOS, 2000), tendo a vantagem de poder ser empregado no momento da ordenha (SANTOS; FONSECA, 2007).

A interpretação do CMT se baseia 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) e os escores do CMT apresentam correlações variadas com a CCS (PHILPOT; NICKERSON 1991).

O uso do CMT como instrumento de diagnóstico da mastite subclínica 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 atestam a sensibilidade do CMT em identificar quartos mamários com mastite subclínica quando a interpretação é rigorosa e correlação positiva com a CCS (BRITO et al., 1997, CADEMARTORI, 2001; DELLA LIBERA et al., 2001, BARBOSA et al., 2002; REYES et al., 2005, MENDES JORGE et al., 2005).

Mesmo nas regiões onde os métodos automatizados são disponíveis, o CMT continua a ser um instrumento importante para avaliação de quartos mamários individuais, pelas vantagens de fornecer resultados imediatos, ser prático e ter baixo custo (CASURA et al., 1995, ENEVOLDSEN et al., 1995). Outras vantagens do uso do CMT são a possibilidade identificação de animais sob risco, selecionar amostras para exame laboratorial e servir de base para a organização de linhas de ordenha em rebanhos comprometidos (PHILPOT;

NICKERSON 1991). A correlação entre a CCS média no tanque e a ocorrência de mastite é alta, e varia de 0,50 a 0,96 (EMANUELSON; FUNKE, 1991).

A tendência internacional em termos de qualidade do leite e diagnóstico de quarto mamário negativo é o aumento da exigência na redução da CCS (HEESCHEN; REICHMUTH 1995).

No Brasil, para os produtores das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste foram estabelecidos limites máximos de CCS de $7,5 \times 10^5$, a partir de julho de 2008 e até julho de 2011 quando a CCS máxima não deverá ultrapassar 400 mil células./ml (BRASIL, 2002a).

Nos rebanhos brasileiros a CCS é amplamente variável segundo a região e as condições de estudo (MACHADO et al., 2000).

Dados da RBLQ demonstram alta porcentagem de amostras com cinco ou mais dias de coleta, bem como uma elevada porcentagem de amostras enviadas ao laboratório em temperatura ambiente ou acima da temperatura recomendada (BRITO et al., 2003; RIBAS et al., 2003). Meyer et al. (2002) verificaram diminuição dos valores iniciais de CCS em amostras de leite sob diferentes temperaturas e analisadas com até 15 dias após a coleta.

C) Exame microbiológico

A cultura bacteriana geralmente é feita em vacas selecionadas a partir da contagem de células somáticas ou de casos clínicos. A cultura de leite individual identifica as espécies bacterianas envolvidas (FONSECA; SANTOS, 2000).

Os métodos utilizados para a determinação da qualidade microbiológica podem ser qualitativos ou quantitativos. Entre os qualitativos, destacam-se os testes da redutase, fermentação e acidez. Apesar da praticidade de realização, estes testes são subjetivos e indiretos, sendo utilizados apenas para um diagnóstico geral e presuntivo da qualidade do leite (FONSECA; SANTOS, 2000).

Dentre os testes quantitativos, destaca-se a contagem bacteriana total (CBT) ou contagem global de bactérias (CGB), em que são estimadas as unidades formadoras de colônias de bactérias por mililitro de leite, sendo a Contagem Padrão em Placa (CPP), o método de referência (BRASIL, 1999).

Para avaliação da qualidade microbiológica do leite, a prova da redutase e a CPP constituem as técnicas tradicionalmente empregadas em laticínios. A primeira tem sido utilizada principalmente para leite de latões, e a CPP para leite entregue a granel.

A CPP pode subestimar a quantidade de bactérias presentes, pois apenas bactérias viáveis e que se multiplicam nas condições de cultivo formam colônias (BRITO et al., 1999; BERRY; HILLERTON, 2000). Também, a característica de agregação pode subestimar a contagem, sendo que uma colônia pode ter sido originada de várias bactérias (BERRY; HILLERTON, 2000). Suhren e Reichmuth (2000) citam que apesar de ser utilizado internacionalmente como método de referência a CPP não expressa a real qualidade bacteriológica do leite,

O exame microbiológico é o método padrão para determinação da saúde do úbere e diagnóstico da mastite bovina. O isolamento bacteriano e respectivo antibiograma além de úteis para confirmar o diagnóstico clínico podem indicar medidas específicas de controle de acordo com o padrão de infecção encontrado (BRITO et al., 1999). O isolamento bacteriano é decisivo, porém caro e demorado, sendo pouco aplicável a rebanhos com grande número de animais. Várias simplificações como a utilização de meios de cultura especiais e a criação de esquemas de identificação presuntiva vêm sendo estudadas (FIGUEIREDO, 1995).

O isolamento bacteriológico apresenta limitações devido à exigência de exames laboratoriais, tempo requerido para a cultura e custos. Adicionalmente, os testes

bacteriológicos não são confiáveis (MCDOUGALL et al., 2001; PYÖRALLÄ, 2003). De fato, a ocorrência da mastite pode não ser acompanhada pelo isolamento do agente etiológico por várias razões: (1) o microrganismo pode não ser eliminado intermitentemente ou ser eliminado em baixas concentrações; (2) patógenos que não são detectados pelos exames bacteriológicos usuais; (3) algumas enzimas e proteínas lácteas (lisozima e lactoferrina) podem dificultar a detecção do patógeno e (4) a infecção 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), sendo reportado que o isolamento bacteriano pode não ser identificado em mais de 50% das amostras (MARKOVEC; RUEGG, 2002).

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 produtor não pode esperar até sete dias após o envio da amostra ao laboratório para obtenção de resultados de isolamento e sensibilidade e assim, tomar uma decisão. Neste período perdem-se o leite de pelo menos seis ordenhas, e, dependendo da evolução do quadro clínico, poderá ocorrer comprometimento irreversível da glândula mamária (FERNANDES, 2006).

2.6.5 Tratamento

O tratamento adequado é uma das formas mais práticas e eficientes de controle da mastite, por eliminar um elo importante da cadeia epidemiológica desta enfermidade (LANGONI et al., 1999). Domingues (1993) demonstrou que o diagnóstico precoce e o tratamento adequado na mastite podem restabelecer a produção de leite do quarto mamário na mesma lactação, com aumento significativo da produção das tetas tratadas.

Uma vez detectada a mastite, alguns fatores como espectro de ação, fácil adaptação ao manejo, tempo decorrido entre última aplicação e a possibilidade de comercializar o leite, resultados de testes de sensibilidade, natureza da infecção e custo-benefício favorável devem ser levados em consideração para a escolha do antibiótico a ser adotado. Um produto que possua sucesso clínico anterior na região ou no próprio rebanho seria, de forma prática, o melhor argumento para a escolha rápida do tratamento, mesmo antes se conhecer os resultados laboratoriais, ganhando-se tempo precioso na luta contra a mastite e retorno mais rápido à produção (FERNANDES, 2006).

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). E ainda, o tipo de manejo é importante para o sucesso da terapia. Um adequado manejo de ordenha pode diminuir o número de animais acometidos, reduzir a taxa de novas infecções, melhorar a CCS do rebanho e a qualidade do leite produzido com benefícios diretos aos produtores, indústrias e consumidores (RUPP et al., 2000).

A avaliação do perfil de sensibilidade a fármacos antimicrobianos torna-se essencial para a adequada seleção da antibioticoterapia a instituir (GENTILINI et al., 2002). No entanto, e 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 antibióticos de forma preventiva, no período de secagem dos animais (NUNES et al., 2007). Raramente o veterinário tem informação sobre a identificação do agente patogênico e respectivo padrão de sensibilidade para guiá-lo na decisão terapêutica (OWENS et al., 1997).

A disponibilidade dos fármacos de novas gerações, com um maior espectro de ação, surge como uma alternativa fácil, associada a uma maior probabilidade de sucesso

terapêutico. No entanto, a seleção de estirpes com resistência a antibióticos é um processo rápido, pelo qual a utilização desses fármacos não deverá ser considerada para uma primeira escolha terapêutica (NUNES et al., 2007).

2.6.6 Controle e profilaxia

Várias medidas são propostas para controlar a mastite e em conseqüência diminuir os impactos econômicos na atividade leiteira (MULLER, 1999).

A antibioticoterapia visa auxiliar as defesas do hospedeiro na eliminação dos patógenos, porém, para algumas infecções intramamárias, o sucesso terapêutico pode ser medido melhor pela redução dos sintomas clínicos da mastite do que pela eliminação total do patógeno (ERSKINE et al., 1993; COSTA, 2002).

Os programas de controle devem aumentar o retorno econômico, ser altamente efetivos e aplicáveis a vários rebanhos, além de serem práticos e baratos. Devem ter como metas principais: reduzir novas infecções, encurtar a duração das infecções existentes, promover a redução dos casos clínicos (PHILPOT, 1984), controlar ou erradicar as mastites contagiosas e manter baixos os níveis da mastite ambiental (MULLER, 1999). Neste contexto, espera-se obter uma CCS abaixo de 200.000 células/ml de leite, menos de 2% de episódios clínicos ao mês e 85% das vacas livres de mastite subclínica (MULLER, 1999).

Diagnóstico e tratamento precoce dos casos clínicos; tratamento de mastite subclínica na interrupção da lactação; descarte de casos crônicos; manejo e higiene de ordenha corretos e monitoramento dos casos clínicos e subclínicos são essenciais (MASSEI et al., 2008).

A fim de evitar a contaminação de vacas com úberes sadios através de utensílios ou do próprio ordenhador é recomendado que as vacas sejam ordenhadas em uma seqüência estabelecida a partir do histórico clínico do rebanho: iniciar com as vacas de primeira lactação, seguidas pelas mais velhas que nunca tiveram mamite, vacas que já tiveram mamite, mas foram curadas e por último as vacas com mamite (SILVA et al., 2002).

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, é importante a higiene do ordenhador, e os cuidados com o equipamento de ordenha que pode facilitar a transmissão de patógenos entre vacas e entre quartos do úbere (DINGWELL et al., 2004). A imersão dos tetos em solução desinfetante antes e após a ordenha (pré e pós-dipping) reduz significativamente o número de novas infecções. O uso de toalhas de papel e a presença de selante na solução desinfetante no pós-dipping são medidas recomendadas para controle da mastite (VASCONCELLOS, 1990).

2.7 Mecanismo de Ação dos Antimicrobianos

Devido ao seu amplo espectro de ação sobre diferentes microrganismos, a enrofloxacinina passou a ser amplamente utilizada na Medicina Veterinária, principalmente nos processos inflamatórios da glândula mamária de bovinos (MONFARDINI et al., 1999; HOEBEN et al., 2000). A ação inibitória da enrofloxacinina caracteriza-se por inibir a enzima girase que é necessária aos processos de replicação, transcrição e ou recombinação do ácido desoxirribonucléico, como também pode interferir nos mecanismos de reparação da síntese do ácido nucléico (TAVARES, 1990).

A amoxicilina ou penicilina BRL 2333 (Beecham) é uma penicilina semi-sintética obtida pela hidroxilação da cadeia fenólica lateral da ampicilina, que possui como todas as penicilinas, uma estrutura essencial que sofre o ataque de microrganismos resistentes, os quais

possuem as enzimas β -lactamases que têm a capacidade de clivar o anel β -lactâmico, primordial para a atividade antibacteriana (LEVISON; JAWETZ, 1998).

A tetraciclina é bacteriostática e atua inibindo a síntese protéica bacteriana ligando-se à subunidade 30S ribossômica, impedindo que o RNAt se fixe ao ribossomo (SPINOSA, et al., 1999).

O cefoperazone é um antibiótico da família das cefalosporinas de terceira geração. Possui atividade bactericida, atuando frente a uma ampla variedade de bactérias gram-positivas e gram-negativas, e aeróbias causadoras de mastites. Sendo uma cefalosporina de terceira geração, o cefoperazone possui atividade antimicrobiana *in vitro* e maior capacidade de resistir às enzimas β -lactamases produzidas pela maioria dos patógenos gram-negativos, do que as cefalosporinas de primeira e segunda geração (CARRACEDO, 2009).

A gentamicina e a neomicina são aminoglicosídeos e agem interferindo na síntese protéica bacteriana promovendo a formação de proteínas defeituosas o que leva a morte da célula bacteriana, portanto são antibióticos bactericidas (SPINOSA, et al., 1999).

A bacitracina é um antibiótico polipeptídico composto de uma mistura de diversos polipeptídios estreitamente relacionados. Ela 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). O sal de zinco garante que a substância ativa permaneça estável durante o armazenamento. A bacitracina tem ação bactericida contra cocos Gram-positivos e bacilos, em particular contra determinadas estirpes de clostrídios (JAWATZ, 1995).

A cloxacilina é um antibiótico do grupo dos β -lactâmicos muito utilizado no tratamento de mamites bovinas devido ao espectro antimicrobiano, tanto para as bactérias Gram positivas como para as negativas (AURELI et al., 1996; BECKER et al., 2004).

2.8 Sensibilidade a Antimicrobianos

O tratamento das infecções é realizado com maior eficácia e segurança, se baseado no resultado da cultura microbiológica, complementada com o teste de sensibilidade. O antibiograma testa a sensibilidade do agente frente a uma variedade de drogas, determinando assim, a qual delas o microrganismo é resistente ou sensível (MARGATHO et al., 1998; PHILPOT; NICKERSON, 2002), permitindo escolher o tratamento com a certeza de se estar utilizando o produto que melhor se aplica no combate aos agentes de mastite na propriedade (FERNANDES, 2006).

É comum, entretanto, que a escolha do antimicrobiano se faça empiricamente, por indisponibilidade temporária ou definitiva de dados laboratoriais. 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. Estas indicações são limitadas pelo surgimento de resistência bacteriana, que varia com a região geográfica, o tempo e a extensão de uso de cada antimicrobiano (KUNIN, 1993; MARTINEZ et al., 1996).

Embora não haja correspondência perfeita entre o resultado do teste *in vitro* a antimicrobianos e a eficácia terapêutica *in vivo*, o antibiograma é um dos principais norteadores do uso desses fármacos na prática médica (MARTINEZ et al., 1996). No entanto é comum os autores mencionarem que em muitas situações um antibiótico apresenta-se sensível no teste *in vitro*, porém não tem boa eficácia *in vivo* (CRUZ et al., 1965; FREITAS et al., 2005).

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).

Muitos estudos foram desenvolvidos visando avaliar a sensibilidade *in vitro* de agentes isolados do leite de vacas com mastite clínica e subclínica. Os resultados são divergentes segundo o agente envolvido e os antimicrobianos testados.

Avaliando-se os resultados de diferentes autores pode-se concluir que há uma grande variação nos percentuais de sensibilidade *in vitro* destacando-se a gentamicina como o antibiótico de maior eficácia para tratamento das mastites de origem bacteriana (FERREIRO, 1980; NADER FILHO et al., 1986; LANGONI et al., 1991; LIMA JÚNIOR et al., 1993; VARGAS et al., 1996; ANDRADE, 2001; LANGONI et al., 2000; COSTA et al., 2000a; BRITO et al., 2001; WATANABE et al., 2001; BYARUGABA, 2004; NADER FILHO et al., 2007), embora algumas vezes com sensibilidade em torno de 50% (COSTA et al., 1986; DOMINGUES et al., 1994).

Os maiores índices de resistência foram constatados com o uso da penicilina (NADER FILHO et al., 1986; LANGONI et al., 1991; DOMINGUES et al., 1994; VARGAS et al., 1996; COUTINHO et al., 2006; NADER FILHO et al., 2007).

Devido ao seu amplo espectro de ação sobre diferentes microrganismos, a enrofloxacinina passou a ser amplamente utilizada em Medicina Veterinária, principalmente nos casos de mastite. A ação *in vitro* da enrofloxacinina foi verificada frente a alguns microrganismos isolados de leite bovino mastítico. Os resultados mostraram uma boa ação contra *Staphylococcus* sp., *Corynebacterium bovis* e bactérias Gram-negativas (MARINHO et al., 2002).

Steinberger (1986) verificou que todas as amostras de coliformes e de *Pseudomonas aeruginosa* testadas foram sensíveis à enrofloxacinina. Gedek (1987) confirmou essas observações e demonstrou, ainda, a eficiência da droga sobre o *Staphylococcus aureus*. Resultados semelhantes foram obtidos por Brito et al. (2001) que observaram 100% de eficácia para cepas isoladas de mastite bovina na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais.

Na Itália Caracappa et al. (1991) testaram a sensibilidade da enrofloxacinina frente a amostras resistentes de *Staphylococcus* sp isoladas de leite de vacas mastíticas e observaram eficiência inibitória de 90% do crescimento bacteriano. Hoffer (1990), na Alemanha, observou uma resposta positiva no tratamento de mastites clínicas em vacas, em que 66% dos animais submetidos à administração da enrofloxacinina intramuscular na dose de 3mg/kg em intervalos de 12 horas apresentaram-se curadas ao final do tratamento.

No Brasil, em estudo posterior Langoni et al. (2000) avaliaram a eficácia do tratamento da mastite bovina com enrofloxacinina e amoxicilina isoladas e em associação. Obteve-se independentemente do microrganismo envolvido índices superiores a 75% de cura nos tratamentos com amoxicilina, enrofloxacinina e a associação de ambas. O efeito terapêutico em vacas com mastite subclínica foi comprovado por Dinc et al. (1991), com a infusão de diária enrofloxacinina, durante três dias, obtendo cura bacteriológica em 83,3% dos tetos.

Hoeben et al. (2000), estudando o efeito da enrofloxacinina sobre os sinais clínicos da mastite causada por *E. coli* em vacas recém-paridas, concluíram que o tratamento acelerou o *clearance* da bactéria dos quartos afetados. Avaliando o efeito de drogas antimicrobianas em casos de mastite clínica causada experimentalmente por *E. coli*, Monfardini et al. (1999) observaram que o tratamento com a enrofloxacinina afetava a taxa de eliminação da bactéria às 14, 18, 24, 48 e 72 horas após a infecção, não havendo, entretanto, cura bacteriológica.

A sensibilidade antimicrobiana de 59 cepas de estafilococos coagulase positivo, isolados do leite de vacas com mastite foi avaliada através da técnica de difusão com discos para 13 antibióticos, verificando-se que os mais eficazes foram a vancomicina (100%) e norfloxacinina (96%) e os menos eficazes foram penicilina (20%) e amoxicilina (25%).

Algumas cepas apresentaram resistência múltipla para seis a nove antibióticos simultaneamente (FREITAS et al., 2005).

Segundo estudos de Lange et al. (1999), na região Sul do Brasil, 48,5% dos *S. aureus* isolados de casos de mastite bovina foram suscetíveis a todos os antimicrobianos testados, sendo observado que 43,9% dos isolados foram resistentes à penicilina G e ampicilina, de forma particular ou em associação.

Em estudo mais recente (FERREIRA et al., 2006) entre as 77 estirpes de *S. aureus* submetidas aos testes de sensibilidade *in vitro* frente a 12 antimicrobianos, 75,3% revelaram-se sensíveis a todos os princípios ativos testados.

Nader Filho et al. (2007) avaliaram a sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de 72 cepas de *S. aureus* isoladas de leite de vacas com mastite clínica e subclínica, em 10 propriedades do Estado de São Paulo. Os princípios ativos que apresentaram maior sensibilidade foram a gentamicina (98,6%) e a eritromicina (98,6%), seguidos pela estreptomicina (94,4%), oxacilina (84,7%), novobiocina (73,4%), vancomicina (72,2%), ampicilina (4,2%) e por último a penicilina (2,8%). Os resultados evidenciaram que 100% das cepas estudadas apresentaram resistência a pelo menos dois antibióticos ou quimioterápicos e que nenhum destes princípios ativos, agindo isoladamente, pode ser ativo contra qualquer uma das cepas experimentadas.

Para o cefoperazone Andrade (2001) detectou um percentual de sensibilidade de 89%, superior aos 65,4% encontrados anteriormente por Vargas et al. (1996).

Os resultados obtidos por Freitas et al. (2005) revelaram altos índices de resistência para amoxicilina (75%) e também um alto nível de resistência a gentamicina em um município onde este antibiótico era mais frequentemente utilizado para tratar os animais com mastite. Outros antibióticos como bacitracina e tetraciclina apresentaram índices de resistência de 37% e 26%, respectivamente. Os mais eficazes foram a vancomicina (100%), a norfloxacinina (96%), a enrofloxacinina (88%) e o cloranfenicol (83%).

A amoxicilina pertence ao mesmo grupo de antibióticos beta-lactâmicos e geralmente os estafilococos mostram elevada resistência (acima de 70%) à penicilina G, bem como, ampicilina, amoxicilina e carbenicilina (TAVARES, 2000).

Em estudo para avaliar o perfil de suscetibilidade e a detecção de marcadores genéticos de resistência em amostras de *Streptococcus agalactiae* isolados de animais e humanos Cunha (2008) identificou que as cepas isoladas de bovinos mostraram um perfil diferente quanto à sensibilidade à bacitracina, uma vez que apenas 33% delas se revelaram suscetíveis contra 100% de sensibilidade para os isolados de origem humana. Os isolados originados de bovino demonstraram percentuais de resistência ao conjunto de antibióticos analisados superiores aos observados em isolados de material humano.

Poubel et al. (2008) notificaram um aumento significativo da resistência dos *Streptococcus agalactiae* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica às tetraciclinas (92%), confirmando relatos de Guerin-Faublée et al. (2002, 2003) que apontaram para o aumento significativo da resistência às tetraciclinas em seus estudos.

2.9 Resíduos de Antibióticos no Leite

A presença no leite de resíduos de produtos farmacológicos utilizados como medida terapêutica ou profilática tem grande importância pelos efeitos que estes produzem sobre a saúde do consumidor, a inibição de cultivos utilizados na indústria de produtos lácteos fermentados e seletividade de populações microbianas resistentes (SISCHO, 1996).

Diversas investigações (SISCHO, 1996; GANDINO; CHIAPPETTA, 1998; SENYR et al., 1990), tem demonstrado que as provas microbiológicas comumente utilizadas para a detecção de resíduos de antimicrobianos apresentam diferenças nos limites de detecção; e que

os microrganismos utilizados como indicadores, geralmente diferem nos níveis de concentração inibitória mínima (REYES et al., 2002).

Brancher e Fagundes (1998) adaptaram o método da redutase para detectar antibióticos no leite, sendo menos sensível que o Antimicrobial Diffusion Method (ADM).

A presença de resíduos de antibióticos no leite resulta da aplicação de diferentes substâncias no efetivo leiteiro, para a prevenção ou tratamento de doenças, com destaque para infecções da glândula mamária e as doenças do trato reprodutivo (SANTOS, 2003).

Além dos altos custos o tratamento apresenta sérias implicações tecnológicas e em saúde pública devido, sobretudo, à presença de resíduos de antibióticos no leite. Quantidade de antibiótico acima do limite máximo de tolerância aprovado pela legislação para leite cru, torna a matéria-prima inadequada para o uso na indústria (SANTOS, 2003) e para o consumo humano (BRANDÃO, 2000). Esses resíduos interferem no processamento industrial, uma vez que as bactérias lácticas são sensíveis aos antibióticos dificultando a fermentação e inviabilizando a produção de queijos e iogurtes (NASCIMENTO, 2008). Os riscos à saúde do consumidor são representados entre outros, por reações alérgicas, freqüentemente associadas aos antibióticos beta-lactâmicos (penicilina), que podem desencadear choque anafilático em indivíduos sensíveis (NUNES; D'ANGELINO, 2007).

No Brasil, o leite é o alimento mais avaliado em pesquisas relativas à contaminação de antibióticos em alimentos. Alguns estudos têm demonstrado que a maior fonte destes resíduos é representada, pela freqüente inoculação de antibióticos utilizados no combate à mastite (ALLISON, 1999).

Albuquerque et al. (1996), observaram em Fortaleza no Ceará, que 69,7% das amostras analisadas continham antibióticos, entre elas 28% positivas para penicilina. Nascimento et al. (2001), analisaram 96 amostras de leite pasteurizado de seis marcas encontradas no mercado de Piracicaba, São Paulo, sendo 50% positivas para antibióticos. Barros et al. (2001), analisaram 26 amostras de leite tipo C pasteurizado obtidas no comércio de Salvador, sendo que 38,5% apresentavam resíduos. Denobile (2002) analisou 231 amostras de leite de um laticínio de Minas Gerais, das quais 32 se mostraram positivas para oxitetraciclina.

Rosario (2002) constatou em amostras de leite tipo A, B, C e UHT do comércio de Pirassununga - São Paulo, resíduos de tetraciclina e beta-lactâmicos entre 6,25% a 8,69% e 2,08 a 2,17%, respectivamente. Medeiros et al. (2004) analisando 30 amostras de leite *in natura* na cidade de Patos, na Paraíba, encontraram em 43% das amostras resultados positivos para beta-lactâmicos, tetraciclina e sulfonamidas. Couto e Tórtora (2005) analisaram 50 amostras de leite no Rio de Janeiro e 28% apresentaram resíduo de penicilina ou estreptomicina. Tetzner et al. (2005), ao avaliar 21 fazendas de produção de leite observaram a presença de resíduos de beta-lactâmicos na ordem de 33,3%. Nero et al (2007), analisaram 210 amostras de leite cru oriundas de 4 regiões brasileiras e observaram resíduos de antibióticos em 11,4% das amostras.

Outros estudos enfatizam que no caso do tratamento da mastite clínica o uso terapêutico de antibióticos, pode acarretar em tempo de carência maior do que o preconizado na bula dos medicamentos. Raia Junior (2001) constatou em animais com mastite clínica tratados por via sistêmica, após do período de carência de 96 horas que 52,4 % de amostras de leite apresentaram resultados positivos para penicilina e estreptomicina e 60% para sulfadiazina e trimetoprim. Raia Junior (2001), também observou que o tratamento intramamário de mastite acarretou, após período de carência, 18,7% de amostras positivas para cefacetil, 18,1% para gentamicina e 11% para tetraciclina.

Os antibióticos utilizados no tratamento das mamites podem aparecer no leite até 144 horas após sua aplicação, em função de fatores como concentração, estágio de lactação

volume de leite produzido, intensidade de infecção, dose administrada, excipiente e via de aplicação (FAGUNDES, 1980).

Devido ao alto custo para a realização da cultura, isolamento e identificação dos agentes infecciosos e testes de sensibilidade antimicrobiana, muitas propriedades usam antibióticos que não apresentam eficácia, aumentando o número de bactérias resistentes, além de muitas vezes aumentar a dosagem dos produtos na tentativa de melhorar sua eficiência contribuindo assim para a presença de resíduos no leite (FREITAS et al., 2005).

A preocupação crescente com a presença de resíduos de antibióticos no leite gera uma busca por métodos alternativos para a abordagem clássica dos antibióticos (COSTA et al., 1996).

2.10 Resistência Bacteriana

A descoberta e o amplo uso de antimicrobianos tiveram um impacto profundo sobre a vida e a saúde dos seres humanos e dos animais. Verifica-se na atualidade que apesar da disponibilidade de vários antimicrobianos para tratamento da mastite, o problema de resistência dos microrganismos acentuou-se pelo uso indiscriminado e inadequado de antibióticos (COSTA et al., 1996; OLIVEIRA, 2006).

Há evidências de que o tratamento de animais com antibióticos torne seus produtos e derivados, fonte para resistência aos antibióticos na espécie humana. A resistência é a capacidade inerente ou adquirida da bactéria não responder aos efeitos inibitórios das drogas antimicrobianas, por diversos mecanismos, entre eles, uma rápida biotransformação do antibiótico - diminuindo o efeito nocivo, ou modificando o sítio de ação do antibiótico de modo a não afetar a função bacteriana (OLIVEIRA, 2006).

A resistência pode estabelecer-se entre microrganismos de uma mesma população ou de diferentes populações. O alto nível de resistência múltipla apresenta um risco potencial para a saúde pública e pode dificultar o tratamento de doenças de animais e humanos, agravando quadros clínicos (SENA, 2000).

Oliveira et al. (2002) demonstraram grande percentual de resistência para amostras de *Staphylococcus* spp isoladas de leite de vacas com mastite clínica e subclínica procedentes da Região Agreste do Estado 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.

Alguns autores consideram que o uso de antibióticos 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 extremamente resistentes a um amplo espectro de antibióticos. Se tais bactérias forem transferidas aos homens através do consumo de alimentos, podem, em última análise, colonizar novos hospedeiros ou passar sua resistência aos antibióticos para outras bactérias (MANIE, 1997, DENOBILE, 2002).

Moreno et al. (1990) trabalhando com resíduos de antibióticos e bactérias resistentes à drogas isoladas de carne bovina e de frango, verificaram que a penicilina não foi detectada em nenhuma das amostras de frango. A tetraciclina estava presente em 23%, estreptomicina, cloranfenicol e gentamicina estavam presentes em baixos níveis de concentração, mas numa grande quantidade das amostras (93%, 67% e 97%, respectivamente). Em galinhas, 63% das amostras estavam contaminadas com resíduos de estreptomicina, cloranfenicol e gentamicina.

A ausência de crescimento bacteriano em amostras de leite com elevada CCS ocorre em casos em que a infecção já foi eliminada ou a bactéria ainda não está sendo eliminada (eliminação intermitente) e em casos em que o agente não é identificado pelos exames laboratoriais de rotina, como o *Mycoplasma* spp. (PHILPOT; NICKERSON, 2002).

É importante lembrar que no antibiograma os medicamentos não sofrem interferência de fatores fisiológicos como a presença de tecido residual e de descamação presente no processo inflamatório que impede a penetração e concentração adequada da droga em todos os sítios de infecção da glândula mamária, fato que esclarece porque algumas bactérias são destruídas *in vitro* e não *in vivo* (PHILPOT, 2002).

2.11 Teste de Redução do Azul de Metileno

O leite por sua riqueza de nutrientes é um meio de cultura ideal para a maioria dos microrganismos e a multiplicação dos microrganismos 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 ou medir a diminuição do potencial de O-R. O azul de metileno (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 um corante bacteriológico e como indicador de O-R. O AM em sua forma oxidada é azul (AM^+) e é facilmente reduzido a sua forma hidrogenada (azul de leucometileno, LM^+) que é incolor. Quando introduzido em uma cultura bacteriana ou em qualquer meio contendo bactérias, o AM age como aceptor de elétrons, se reduzindo e tornando-se incolor (LEVINE, 1983). A velocidade dessa transformação é diretamente proporcional a concentração bacteriana do meio, o que possibilita a determinação da concentração bacteriana pela determinação do tempo de descoloramento (PLASZEZESKI et al., 2005).

O teste de redutase utilizando o azul de metileno 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).

Em geral, o tempo de redução é inversamente proporcional ao número de bactérias presentes na amostra de leite no início da incubação. Quanto mais bactérias estiverem presentes na amostra, mais rapidamente se dará a redução da substância indicadora (BRITO et al., 2007).

O resultado do teste de redutase é dado em horas e não pelo número de bactérias embora haja uma correlação entre o TRAM e o número de bactérias da amostra (NADER FILHO et al., 1983; SOUZA et al., 1999).

Essa prova é utilizada nos laboratórios de controle de qualidade de estabelecimentos beneficiadores para classificação do produto para consumo “*in natura*” e para fins industriais (WANDECK et al., 1977). O teste se aplica bastante bem a leite de qualidade mediana e pobre, sendo pouco sensível para produto de boa qualidade com reduzido número de microrganismos (BRITO et al., 2007).

As condições para estimar o número de bactérias pela redutase são padronizadas, porém nem todas as espécies de bactérias possuem a mesma atividade redutora. Por exemplo, as bactérias termotóxicas e psicrotóxicas são menos redutoras do que outros contaminantes comuns do leite. Se os microrganismos predominantes são psicrotóxicos, o que pode acontecer no caso do leite resfriado, o teste poderá dar falsos resultados (SOUZA et al., 1999). O teste é mascarado na presença de antibióticos (RODRIGUES et al., 1993; BRANCHER; FAGUNDES, 1998).

Embora com estas limitações este teste pode ser aplicado para a maioria dos casos e, dado sua simplicidade e baixo custo justifica sua recomendação como parâmetro geral para avaliar a qualidade do leite (VALLE, 1985).

A correlação entre a contagem total de microrganismos aeróbios obtida por plaqueamento em PCA (Plate Count Agar) e pelo sistema Petrifilm®, e a relação dessas duas metodologias com as respostas do teste de redutase foi investigada por Carvalho et al. (2002). Pelos resultados as metodologias, para a contagem total de microrganismos aeróbios, contagem de coliformes totais e o teste de redutase mostraram ser equivalentes.

Pela Instrução Normativa nº 51/2002, os parâmetros estabelecidos para o tempo de redução do AM para o leite cru tipos A, B e C são 5 horas; 3 horas e 30 minutos e 90 minutos respectivamente (BRASIL, 2002a).

Para avaliação da qualidade pelo TRAM 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 da viragem ou descoloração (mudança de cor da amostra, de azul para branco leitoso) e anotar o tempo final. Para estimativa do número de bactérias presentes na amostra utilizar os critérios apresentados nas tabelas a seguir (Tabela 01 e 02).

Segundo os tempos de redução as seguintes características são atribuídas ao leite: excelente (não reduz em 8 horas), bom (reduz entre 5 horas e meia e 8 horas), regular (reduz entre 3 horas e meia e 5 horas), ruim (reduz entre 1 e 3 horas) e péssimo (reduz em menos de 1 hora).

Tabela 01: Interpretação dos resultados para o teste de Redutase. Tempo de descoloração em função da carga microbiana segundo a Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro 2002 / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

Leite	Tempo de Descoloração	Nº de bactérias (estimado)
Leite tipo A	Mínimo 5h	Maximo 10^4 UFC/mL
Leite tipo B	Mínimo 3h 30'	Maximo 5×10^5 UFC/mL
Leite tipo C	Mínimo 90'	Não há previsão

Tabela 02: Relação entre o número de bactérias presentes no leite e o tempo de redução do azul de metileno.

Tempo de redução	Número aproximado de bactérias por ml
Inferior a 20 minutos	Acima de 20.000.000
20 à 120 minutos	4.000.000 – 20.000.000
2 à 5 ½ horas	500.000 – 4.000.000
5 ½ à 8 horas	100.000 – 500.000
Acima de 8 horas	Inferior à 100.000

Fonte: UFSC (2009)

Brancher e Fagundes (1998) avaliaram o método da redutase utilizando o azul de metileno, 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, a amostra foi aquecida a 85-95°C por 10 minutos e resfriada até 37°C, seguindo-se a adição de 2% fermento láctico (*Streptococcus thermophilus*) e 1 ml de azul de metileno (0,02%). O tempo necessário para completa descoloração do azul de metileno constituiu-se em parâmetro para avaliar a atividade do *Streptococcus thermophilus*. Verificou-se que as amostras com antibióticos demandaram intervalos de tempo significativamente

maiores do que os controles para descoloração do azul de metileno. Os autores concluíram que o método é sensível para os antibióticos testados e pode ser utilizado na pesquisa presuntiva dos mesmos.

Rodrigues et al. (1993) avaliaram diferentes testes para verificar a capacidade de redução dos corantes azul de metileno e resazurina pelo *Streptococcus thermophilus*, frente a várias diluições de ampicilina, cefalosporina, oxitetraciclina, estreptomicina, quemisetina, espectinomicina e gentamicina. As amostras de leite esterilizadas contendo diferentes diluições dos antibióticos foram analisadas quanto ao potencial de redução dos corantes com e sem aquecimento (85-90 °C/10 min.). Os resultados demonstraram a grande capacidade de detecção de pequenas quantidades dos antibióticos, tanto pelo método de resazurina, como pelo do azul de metileno. Os autores sugeriram que este teste pode ser utilizado pelos serviços de inspeção e pelas próprias indústrias, para avaliação da qualidade e presença de antibióticos no leite.

Considerando que os antibióticos adicionados nas amostras de leite devem limitar ou impedir o crescimento das bactérias sensíveis, resultando assim, em maior tempo de redução do corante, foi proposto neste trabalho a adaptação do método de redutase como um método prático, rápido e de fácil realização para orientar a escolha do antibiótico no tratamento de mastites clínicas de origem bacterianas à campo, na indisponibilidade de resultados microbiológicos definitivos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e Período

Amostras de leite foram obtidas em três fazendas no Município de Resende, Região Sul Fluminense e rebanho da Pesagro - Rio, Estação Experimental de Seropédica na Baixada Fluminense, entre dezembro de 2008 e junho de 2009.

Os exames foram realizados na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no Laboratório de Pesquisas Clínicas do Instituto de Veterinária / Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária e no Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Veterinária / Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária.

3.2 Amostras

Foram coletadas amostras de leite *in natura* de vacas mestiças com diferentes graus de sangue holandês-zebú, de diferentes idades, diversas fases de lactação e gestação, e características diversas quanto ao manejo sanitário e nutricional, submetidas a duas ordenhas diárias em propriedades com ordenha mecânica.

3.3 Testes para Identificação de Mastite Clínica e Subclínica

Durante a ordenha da manhã todas as vacas foram avaliadas quanto à ocorrência de mastite clínica através do exame físico da glândula mamária e teste da caneca telada para observação de alterações das características do leite. A seguir foram avaliadas quanto à mastite subclínica através do California Mastitis Test (CMT) imediatamente após a preparação higiênica do úbere para a ordenha, descarte e exame dos primeiros jatos de leite (PHILPOT; NICKERSON, 1991). Para estas finalidades foram mantidos os procedimentos e a rotina de ordenha em cada propriedade.

De cada quarto mamário foi coletada uma amostra de 2,0 ml de leite em uma bandeja própria para o exame à qual foi adicionado, na mesma proporção, um detergente aniônico (alquil-lauril sulfato de sódio) (ALMEIDA et al., 2005). Após homogeneização por alguns segundos, o resultado foi obtido através do grau de viscosidade formado pela reação do detergente com as células somáticas do leite e avaliado em cinco escores: negativo (-), suspeito (traços), fracamente positivo (+), positivo (++) e fortemente positivo (+++) (SCHALM; NOORLANDER 1957), anotando-se os resultados individuais em formulários específicos.

Em seguida ao CMT foram coletadas, em frascos esterilizados, amostras de 200 ml de leite de quartos mamários com reação positiva ao CMT (+, ++ e +++) e de vacas com mastite clínica após lavagem dos tetos com água, secagem com papel toalha, eliminação dos primeiros jatos e desinfecção da pele da teta e do óstio com algodão embebido em álcool a 70%. Após a coleta, as amostras foram imediatamente acondicionadas em caixas térmicas contendo gelo e mantidas em temperatura igual ou inferior a 4 °C durante o transporte até o laboratório de Pesquisas Clínicas do Instituto de Veterinária / UFRRJ onde foram avaliadas e encaminhadas para os testes específicos.

3.4 Isolamento e Identificação de Microrganismos

No Laboratório de Bacteriologia as amostras foram incubadas a 37°C por 18 horas para pré-enriquecimento. Posteriormente 0,1 ml de cada amostra foram semeados em placas

de Petri descartáveis contendo Ágar-sangue bovino 5%, seguidas de incubação à 37 °C e observação das culturas após 24 e 48 horas.

Após incubação, se procedeu à avaliação das características morfológicas das colônias e inóculos individuais foram semeados em meios seletivos e diferenciais, para observação dos aspectos fenotípicos característicos dos gêneros (KONEMAN et al., 2008).

Os microrganismos isolados foram inicialmente estudados morfológicamente pelo método de Gram e repicados em caldo cérebro coração (BHI), incubadas a 37°C por 48 horas quando então foram realizadas as provas taxonômicas para identificação dos gêneros e espécies segundo Krieg e Holt (1984).

A identificação presuntiva dos microrganismos Gram-positivos foi realizada pelas características morfotintoriais e presença de hemólise. Quanto aos agentes Gram-negativos, a identificação procedeu-se pela observação das características das colônias e semeadura em meio Ágar Tríplice Açúcar-Ferro® (TSI), para verificar a capacidade de os isolados produzirem ácido na inclinação, e ácido e gás, no fundo do tubo. Verificou-se, ainda, a reação de sacarose e indol segundo Ferreira et al. (2007).

Para as amostras suspeitas de enterobactérias, as seguintes provas de identificação foram realizadas: comportamento em Ágar (TSI), motilidade em tubo, produção do indol, produção de ácidos a partir da glicose, fermentação de açúcares, redução do nitrato, produção de gelatinase, produção de urease, degradação do citrato e do malonato, e outros diferenciais de acordo com o microrganismo envolvido. O gênero *Streptococcus* spp foi avaliado através do isolamento em Ágar enriquecimento com azida sódica (0,2g/L) e violeta cristal (0,0002g/L), potencial de oxidação, hidrólise de esculina e hipurato. Para o gênero *Corynebacterium* spp, foi efetuado o crescimento em ágar de enriquecimento com telurito potássico (0,1g/L) acompanhado das provas bioquímicas pertinentes. Após a identificação presuntiva das colônias de *Staphylococcus* spp, estas foram submetidas ao método de Gram, teste da catalase, hidróxido de potássio a 30%, prova da coagulase livre, testes Voges-Proskauer, urease e redução de nitratos (KONEMAN et al., 2008).

3.5 Teste de Sensibilidade *In Vitro*

Testes de difusão em Ágar foram efetuados para as amostras identificadas segundo metodologia recomendada pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2000).

3.6 Adaptação do Teste da Redutase

As amostras foram avaliadas quanto ao tempo de redução do azul de metileno (TRAM) 0,02% com e sem a adição de agentes antimicrobianos em diferentes etapas.

3.6.1 Efeito da concentração do antibiótico

Inicialmente foi realizado um teste para determinação do efeito da concentração dos princípios ativos sobre as bactérias presentes nas amostras e respectivos tempos de redução.

Cem (100) amostras de leite de vacas com mastite subclínica (escores +, ++ e ++++) foram avaliadas quanto ao TRAM frente aos antibióticos contidos em formulação antimastíticas disponíveis no mercado, em três concentrações diferentes em relação ao controle adicionado da solução de azul de metileno (AM).

Os antibióticos testados foram: (A) Cloxacilina (20mg/ml), (B) Gentamicina (25mg/ml), (C) Espiramicina (20mg/ml) + Neomicina (20mg/ml), (D) Cefoperazone

(25mg/ml) e (E) Tetraciclina (25mg/ml) + Bacitracina (3,5mg/ml) + Neomicina (45,625mg/ml).

Para esta finalidade cada amostra foi dividida em 20 alíquotas de 2 ml distribuídas em tubos estéreis identificadas com o número da amostra e divididas em cinco grupos de três, acrescidas dos antimastíticos (A, B, C, D, E) em três concentrações, utilizando-se os volumes de 100 µL, 160 µL e 200 µL de cada formulação.

Imediatamente após a adição do antibiótico foram adicionados 200µL de azul de metileno 0,02% em todos os tubos. Para cada grupo de antibiótico foi mantido um tubo controle adicionado de azul de metileno 0,02% sem adição do antibiótico.

Após homogeneização os tubos foram acondicionados em estufa a 37 °C e mantidos nessas condições por 48 horas, com leituras efetuadas em intervalos de uma hora para visualização da descoloração e registro dos tempos de redução das amostras.

O número da amostra, o antibiótico e o volume adicionado, bem como o controle (AM) para cada antibiótico foram identificados nos tubos e a ordem de apresentação nas estantes anotada em caderno de registro.

Ao final desse período foi calculado o tempo médio de redução do AM de cada concentração de antibiótico em relação aos controles.

3.6.2 Efeito do tempo de ação do antibiótico

Num segundo momento foi avaliado o efeito do tempo de ação dos antibióticos sobre as bactérias do leite em relação ao TRAM.

Para esta finalidade foram avaliadas cinco amostras de leite de vacas com mastite clínica e subclínica, divididas em 15 alíquotas de 2,0 ml, adicionadas de quatro antimastíticos (A, B, C, D) em uma única concentração utilizando-se um volume fixo de 100µl de cada formulação e 200µL da solução de azul de metileno (0,02%) que foram adicionadas em quatro momentos distintos: 0h (imediatamente), 1h, 3h e 4h após a adição do antimastítico. Foram utilizadas três repetições para cada tempo dos respectivos antibióticos e um controle com o azul de metileno (AM) para cada antibiótico em cada tempo. Após a inoculação as amostras foram homogeneizadas e mantidas em estufa a 37°C por 12 horas, com leituras efetuadas em intervalos de uma hora.

Os antimicrobianos testados foram aqueles de uso freqüente em propriedades leiteiras e de fácil aquisição, num total de sete princípios ativos isolados ou associações de antibióticos segundo a formulação disponível no mercado: A) Enrofloxacina (30mg/ml) + Amoxicilina (6,25mg/ml); B) Gentamicina (25mg/ml); C) Cefoperazone (25mg/ml); D) Tetraciclina (25mg/ml) + Bacitracina (3,5mg/ml) + Neomicina (45,625mg/ml).

3.6.3 Efeito da temperatura de incubação

Dezesseis amostras de leite provenientes de vacas com mastite clínica foram testadas quanto à redução do AM em duas temperaturas distintas, 23°C e 37°C, mantidos nessas condições por 48 horas, com leituras efetuadas em intervalos de uma hora para visualização da descoloração e registro dos tempos de redução das amostras.

3.6.4 Tempo de redução do azul de metileno mediante adição de antibióticos no leite em relação ao antibiograma

Após determinação do volume e tempo de adição do azul de metileno, 27 amostras de leite de vacas com mastite subclínica (escore +++ ao CMT) e 37 com mastite clínica foram testadas quanto ao TRAM (200µL da solução 0,02% em 2 ml de leite) em relação a quatro

antibióticos de uso intramamário comercial com diferentes composições (100µL de cada formulação): A) Enrofloxacina (30mg/ml) + Amoxicilina (6,25mg/ml); B) Gentamicina (25mg/ml); C) Cefoperazone (25mg/ml); D) Tetraciclina (25mg/ml) + Bacitracina (3,5mg/ml) + Neomicina (45,625mg/ml).

Para cada amostra quatro tubos com 2,0 ml de leite contendo 200µL do azul de metileno 0,02% foram mantidos como controle (AM). Após adição dos antimastíticos e do azul de metileno, as amostras foram homogeneizadas e acondicionadas em estufa a 37°C. As leituras foram efetuadas em intervalos de uma hora durante 48 horas. O tempo necessário para descoloração do leite foi anotado e posteriormente comparado com o tempo de descoloração dos controles.

Paralelamente uma alíquota de 4ml de cada amostra foi acondicionada assepticamente em tubo estéril e encaminhada sob refrigeração para o Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária do Instituto de Veterinária da UFRRJ para cultura, identificação e teste de sensibilidade *in vitro*.

3.6.5 Teste clínico

A eficácia clínica da prova da redutase para avaliação da sensibilidade a antimicrobianos foi testada em 26 vacas com mastite clínica em dois rebanhos do Município de Resende – RJ.

Após a identificação da ocorrência de mastite e coleta das amostras para avaliação do TRAM frente aos antimastíticos e concomitante isolamento e antibiograma, os animais foram tratados aleatoriamente segundo a disponibilidade dos medicamentos no comércio local. Dessa forma foram utilizados os produtos comerciais Cefavet¹, Gentocin® mastite² e Mastijet Forte®³, contendo os princípios ativos cefoperazone, gentamicina e associação de tetraciclina, bacitracina e neomicina respectivamente. Produtos a base de enrofloxacina + amoxicilina (Enrocilin L⁴) não foram testados por não estarem disponíveis em quantidade suficiente no mercado da região por ocasião do teste.

Para tratamento de mastites clínicas recomenda-se entre uma e três aplicações medicamentosas, via intramamária com melhores resultados quando o número de aplicações é maior (BURAGOHAİN; DUTTA, 1990; TYLER et al., 1992; FRITON et al., 1998) ou quando se faz uma terapia associada por via parenteral nos casos agudos ou superagudos (OWENS et al., 1993, 1994). Com base nesses aspectos, os animais deste experimento foram tratados por um período de três dias consecutivos.

Os animais e respectivos tratamentos a serem instituídos foram registrados em uma planilha apresentada aos produtores e disponibilizada em local visível na sala de ordenha. A primeira aplicação intramamária foi efetuada pela equipe (Dia 1), na presença dos proprietários e as drogas necessárias para o tratamento foram disponibilizadas aos mesmos. Os proprietários foram orientados a manter a rotina de ordenha com aplicação dos respectivos produtos por três dias consecutivos após esgotamento dos quartos afetados, descartando o leite das vacas tratadas por sete dias a partir do início do tratamento.

¹ Cefavet (Vetbrands): 250 mg de Cefoperazone sódico (equivalente a 233,149 mg de cefoperazone base). 4,0 mg de Prednisolona acetato, veículo oleoso q.s.p. 10 ml

² Gentocin® mastite 250 mg (Schering Plough): 250 mg Gentamicina base (sulfato), veículo q.s.p. 10 ml

³ Mastijet Forte® (Intervet - Schering Plough): 200mg Cloridrato de tetraciclina, 250 mg Sulfato de Neomicina (equivalente a 365 mg de neomicina), 2.000 UI Bacitracina de zinco (equivalente a 28 mg), 10 mg Prednisolona.

⁴ Enrocilin L (Biovet): 300mg Enrofloxacina, 62,5mg Amoxicilina, 50mg de Cloridrato de Bromexina, veículo q.s.p 10ml.

Noventa e seis horas (Dia 7) após a última aplicação, os animais foram novamente avaliados pelo teste da caneca de fundo escuro e CMT.

Os resultados obtidos ao CMT nessa última avaliação foram comparados com os testes de sensibilidade no antibiograma e TRAM realizados antes do início do tratamento. Para esta finalidade foram atribuídos pontos (zero ou um) segundo a sensibilidade ao teste *in vitro* e pelo teste da redutase e resultado do tratamento clínico: para amostras sensíveis com resultado favorável no tratamento ou resistentes que não resultaram em cura ou melhora do quadro de mastite atribuiu-se 1 ponto. Para resultados discordantes se atribuiu zero ponto (Quadro 01).

Quadro 01: Critérios de avaliação da eficácia clínica dos produtos utilizados para tratamento da mastite clínica em 26 vacas em relação à sensibilidade ao antibiograma e Tempo de Redução do Azul de Metileno.

Resultados no Tratamento	Satisfatório	Não satisfatório
Sensibilidade		
Sensível	1	0
Intermediária	1	0
Resistente	0	1

3.7 Análises Estatísticas

Os dados quantitativos foram submetidos à análise de variância, e os valores médios comparados pelo teste T a 5% de probabilidade, enquanto que os valores percentuais foram submetidos à análise não-paramétrica e as médias comparadas pelo teste de Qui-Quadrado, a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito do Concentração de Antibiótico Sobre o Tempo de Redução das Amostras

O tempo de redução do azul de metileno das 100 amostras analisadas variou entre uma e 48 horas, sendo que os controles apresentaram em média um tempo de redução (23,57 horas) menor que as amostras tratadas com antibiótico cujos tempos de redução variaram segundo o antibiótico adicionado (Tabela 03).

Não houve diferença significativa quanto ao tempo de redução em relação antibióticos utilizando-se os volumes de 100 µL, 160 µL e 200 µL para cada formulação. Houve, no entanto, diferença entre os volumes e respectivos controles que reduziram em tempo menor em todos os antibióticos e volumes testados (Tabela 03).

Tabela 03: Tempo médio de redução do azul de metileno em amostras tratadas com os antibióticos A (cloxacilina - 20mg/ml), B (gentamicina - 25mg/ml), C (espiramicina - 20mg/ml + neomicina - 20mg/ml), D (cefoperazone - 25mg/ml) e E (tetraciclina - 25mg/ml + bacitracina - 3,5mg/ml + neomicina - 45,625mg/ml) em relação aos controles (AM) e volumes adicionados 100 µL, 160 µL e 200 µL.

A		B		C		D		E	
AM	23,96 ^a	AM	23,92 ^a	AM	23,93 ^a	AM	23,64 ^a	AM	23,91 ^a
100 µL	34,52 ^b	100 µL	43,10 ^c	100 µL	28,90 ^b	100 µL	31,54 ^b	100 µL	44,25 ^c
160 µL	34,52 ^b	160 µL	43,10 ^c	160 µL	28,90 ^b	160 µL	31,54 ^b	160 µL	44,27 ^c
200 µL	34,63 ^b	200 µL	43,01 ^c	200 µL	28,90 ^b	200 µL	31,54 ^b	200 µL	44,28 ^c
p=4,76E-09		p=3,53E-29		p=0,001872		p=2,27E-05		p=1,72E-38	

Números seguidos de letras diferentes na mesma linha e colunas indicam diferença significativa quanto aos tratamentos a um grau de confiança de 99% ($p \leq 0,01$).

O TRAM foi diferente entre amostras adicionadas dos diferentes antibióticos. A associação de antibióticos C (espiramicina + neomicina) resultou em menor tempo de redução (28,9 h), porém sem diferença significativa em relação aos antibióticos A (cloxacilina) (34,74 h) e D (cefoperazone). Por outro lado, os maiores tempos de redução foram verificados nas amostras tratadas com os produtos B (gentamicina) e E (tetraciclina + neomicina + bacitracina) com diferença significativa em relação aos demais ($p=5,13481E-19$).

A ausência de diferença nos tempos de redução em relação aos volumes de antimicrobianos adicionados indica que a menor concentração testada apresentou eficácia semelhante às demais, com ação sobre o crescimento da bactéria ou grupos de bactérias presentes nas amostras, visto que todas as concentrações diferiram dos controles onde a redução ocorreu em tempo menor, portanto com crescimento bacteriano maior.



Figura 1 – Tempo de Redução do Azul de Metileno três horas após início do teste (Tubo A1 – amostra contendo 100 μ L de antimastítico A - cloxacilina) evidenciando uma amostra resistente.



Figura 2 – Teste de Redução do Azul de Metileno 24 horas após início do teste (nos tubos E1 ao E5 não houve redução do azul de metileno).

4.2 Efeito do Tempo de Ação do Antibiótico Sobre o Tempo de Redução do Azul de Metileno

Todos os controles reduziram o azul de metileno na primeira hora, caracterizando uma alta carga microbiana nas amostras. Não houve diferença significativa quanto ao tempo de redução (TR) em relação ao momento de adição do corante (0h, 1h, 3h ou 4h) para um mesmo produto. Na presença dos antibióticos as amostras reduziram o azul de metileno em tempos distintos (Tabela 04).

Amostras adicionadas dos produtos A (enrofloxacina + amoxicilina) e D (bacitracina + neomicina + tetraciclina) reduziram o azul de metileno na média em 9,8 horas, sendo quatro amostras e respectivas repetições em tempo igual ao controle (1 h) e as demais não reduziram durante o período de observação. Os produtos B (gentamicina) e C (cefoperazone)

apresentaram seis e nove amostras com TRAM igual ao controle o que representou na média um tempo de redução menor (4,0 e 5,4 respectivamente) e sem diferença significativa ($p=0,44559$), mas com diferença em relação ao controle e produtos A e D (9,8 h).

Tabela 04: Tempo médio de redução do azul de metileno dos controles e amostras adicionadas dos produtos A (enrofloxacina + amoxicilina), B (gentamicina), C (cefoperazone) e D (bacitracina + neomicina + tetraciclina) em relação ao momento de adição do azul de metileno (0, 1, 3 e 4 horas).

Grupo	Controle	A	B	C	D
Controle	1,0 ^a				
0h	1,0 ^a	9,8 ^b	4,0 ^c	5,4 ^c	9,8 ^b
1h	1,0 ^a	9,8 ^b	4,0 ^c	5,4 ^c	9,8 ^b
3h	1,0 ^a	9,8 ^b	4,0 ^c	5,4 ^c	9,8 ^b
4h	1,0 ^a	9,8 ^b	4,0 ^c	5,4 ^c	9,8 ^b

Números seguidos de letras diferentes na mesma linha e colunas indicam diferença significativa quanto aos tratamentos a um grau de confiança de 99% ($p \leq 0,01$).



Figura 3 – Teste de Redução do Azul de Metileno duas horas após início do teste. O azul de metileno foi reduzido em todos os tubos controles e grupo com cloxacilina.

A ausência de diferença significativa nos tempos de redução em relação aos diferentes momentos de adição do azul de metileno indica que em até quatro horas após a adição do antibiótico ao leite, o azul de metileno pode ser adicionado sem interferir no tempo de redução pelas bactérias presentes nas amostras.

4.3 Efeito da Temperatura de Incubação Sobre o Tempo de Redução das Amostras

Comparativamente as mesmas amostras em temperatura ambiente (23°C) reduziram o azul de metileno em média em 16,5 horas. Apesar de tempos distintos não houve diferença significativa ($p= 0,24573$) e todas as amostras que reduziram em até 48 horas na estufa também o fizeram em temperatura ambiente e 56% (9/16) apresentaram o mesmo tempo de redução nas diferentes temperaturas.

As amostras que apresentaram TR maior em temperatura ambiente apresentam provavelmente uma população de bactérias distintas com temperatura ótima de crescimento mais elevada e crescimento limitado à 23°C.

Os dados sugerem a possibilidade de realização do teste em condições de campo onde não haja estufa para incubação, contudo o período de observação deve ser ampliado.

4.4. Tempo de Redução do Azul de Metileno Segundo a Qualidade da Amostra

Como os controles em geral apresentaram TRAM menor que as amostras adicionadas de antibióticos, pode-se deduzir que os antibióticos interferiram sobre o crescimento bacteriano com reflexos no tempo de descoloração concordando com Brito et al. (2007) que alertam para a possibilidade de resultados incorretos quando se avalia a qualidade do leite pelo teste da redutase, visto que a presença de antibióticos na amostra pode interferir sobre os resultados.

Neste estudo a adição de antibióticos interferiu significativamente sobre o tempo de redução das amostras, sendo o tempo médio de redução variável em função do tipo de antimicrobiano adicionado e características da amostra quanto ao CMT. Como a velocidade de descoloração é inversamente proporcional ao número de bactérias presentes na amostra no início da incubação, quanto mais rapidamente se dá a descoloração, maior a concentração bacteriana do meio (BRITO et al., 2007).

Uma amostra controle não reduziu o corante em 48 horas e 12 reduziram em menos de 5 horas. No Brasil, o leite é considerado adequado pela indústria quando a descoloração ocorre a partir de duas horas e trinta minutos (BRASIL, 2002a). Assim, pelo tempo de redução dos controles a maioria das amostras (88%) seria classificada como excelente quanto à qualidade (quantidade de microrganismos) visto que reduziram o azul de metileno em mais de 5 horas.

Presuntivamente amostras com maiores tempos de redução em relação ao controle, apresentaram maior sensibilidade aos antibióticos adicionados. Dos 12 controles que reduziram o azul de metileno em menos de 5 horas, sete (7%) apresentaram o mesmo tempo de redução para os tratamentos (≤ 3 horas), indicando além de uma carga bacteriana elevada, uma provável resistência aos antimicrobianos testados.

A redução em menos de 90 minutos caracteriza essas amostras como de baixa qualidade microbiológica (mais que 5×10^5 UFC/ml) e fora dos padrões estabelecidos pela IN51/2002 para leite tipo C. Os tempos médios de redução das amostras controle em relação aos tratamentos estão representados na Tabela 05.

Tabela 05: Tempo médio de redução do azul de metileno (TMRAM) de amostras tratadas com antibióticos em relação aos controles e número de amostras que apresentaram redução em menos de 5 horas ou não reduziram (NR) em 48 horas.

Grupo	Tratamento	TMRAM	NR 48 h	Menos 5 h
	Controle	23,6 ^a	3	12
A	Cloxacilina	34,7 ^b	45	12
B	Gentamicina	43,0 ^c	85	10
C	Espiramicina + Neomicina	29,0 ^b	2	9
D	Cefoperazone	31,7 ^b	16	8
E	Tetraciclina + Neomicina + Bacitracina	44,2 ^c	89	7

TRAM: números seguidos de letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa quanto aos tratamentos a um grau de confiança de 99% ($p=5,134 \text{ E-}19$).

Considerando as medidas de higiene adotadas para coleta das amostras e a manutenção das mesmas sob refrigeração até o momento do teste que ocorreu em no máximo 12 horas, um tempo maior para redução do azul de metileno já era esperado, mesmo para amostras positivas ao CMT.

Neste sentido os estudos realizados com o teste da redutase para avaliação da qualidade microbiológica do leite cru referem-se a amostras de leite de conjunto mantidas sob refrigeração. Nestes casos, o tempo prolongado de armazenagem favorece a multiplicação de bactérias no leite mesmo sob refrigeração. No leite obtido sob condições de higiene inadequadas, a refrigeração pode atuar de modo a apenas substituir a microbiota mesófila pela psicrotrófica, mantendo elevada a carga microbiana (GUIMARÃES, 2002).

Diversos autores (NADER FILHO et al., 1983; SOUZA et al., 1999; NASCIMENTO; SOUZA, 2002) alertam para as limitações da prova de redutase como parâmetro de avaliação do estado higiênico-sanitário do leite cru, visto que há uma grande variação na capacidade redutora do azul de metileno pelos diferentes grupos de microrganismos, principalmente psicrotróficos que apresentam menor poder de redução, sugerindo um leite de boa qualidade mesmo estando presente um elevado número de bactérias. E ainda, alguns *Streptococcus* sp causadores da mastite bovina não reduzem o AM (SOUZA et al., 1999). Neste estudo, o leite foi mantido sob refrigeração por um período curto e as amostras foram obtidas de forma a permitir o mínimo de contaminação possível. Portanto o efeito de contaminantes e de bactérias que crescem sob a temperatura de refrigeração foi, se não eliminado, pelo menos reduzido.

Os resultados de avaliação da qualidade pelo teste da redutase variam em diferentes estudos. Almeida et al. (1999) relataram 28,57% das amostras com baixa qualidade microbiológica pelo teste da redutase, o que também foi verificado por Freitas et al. (1995). Barcelos (2006) encontrou 16,7% das amostras com tempo de redução inferior aos 90 minutos exigido pela legislação em Parauapebas – PA, enquanto que Carvalho et al. (2004) verificaram que 100% de 30 amostras de leite cru analisadas apresentaram tempos de redutase superiores a 90 minutos (leite tipo C), portanto de acordo com o estabelecido pela legislação.

Por outro lado, Martins et al. (2008) analisaram 60 amostras de leite colhidas do silo de armazenamento com TRAM variando entre 120 e 210 minutos (2 h e 3 horas e meia). Resultados semelhantes foram obtidos por Lorenzetti (2006) que analisou amostras de leite coletadas em caminhões isotérmicos de duas regiões de Curitiba. Em ambas as regiões o tempo médio de redução foi superior a 90 minutos.

Como as condições para estimar o número de bactérias pelo teste da redutase são padronizadas e nem todas as espécies de bactérias possuem a mesma atividade redutora, o TRAM variou entre as amostras e especialmente segundo o escore ao CMT, confirmando o efeito da carga microbiana sobre a atividade de redução.

Amostras de vacas com mastite clínica e subclínica com reação fortemente positiva (+++) e positiva (++) ao CMT reduziram o azul de metileno em tempo menor que as amostras fracamente positivas (+). A diferença entre os tempos de redução foi significativa, sobretudo em relação aos controles ($p=3,958E-05$), mas também entre amostras com escore +++ (23,11h) e + (25,35 h) e entre amostras com escore ++ (21,31h) e + ($p=0,00013$), porém sem diferença significativa entre amostras ++ e +++ ($p=0,11047$), o que se justifica provavelmente pela dificuldade de diferenciação da reação desses escores, caracterizando uma subjetividade do CMT.

Os tempos médios de redução de amostras com mastite clínica e subclínica em relação aos controles e tratamento com os antibióticos estão representados na Tabela 06.

Tabela 06: Tempo médio de redução do azul de metileno (em horas) de amostras de leite procedentes de vacas com mastite clínica (MC) ou subclínica (MSC) em diferentes escores (+, ++, +++) ao CMT, adicionadas dos antibióticos A, B, C, D E e resultados da análise estatística (Anova).

Grupo	MC	MSC +	MSC ++	MSC +++	Valor de p
Controle	10,52 ^a	25,35 ^b	21,31 ^c	23,11 ^c	3,958E-05
A	29,26 ^b	36,84 ^c	31,35 ^b	40,33 ^b	0,162
B	24,59 ^b	46,16 ^c	40,42 ^c	42,78 ^b	3,52E-06
C	23,19 ^b	29,14 ^b	28,42 ^b	30,33 ^c	0,287
D	30,70 ^b	30,81 ^b	31,40 ^b	35,78 ^c	0,868
E	X	46,00 ^c	42,96 ^c	42,78 ^b	0,444
Valor de p=	0,00636	2,39E-25	2,03E-12	0,0860	

Números seguidos de letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa quanto aos tratamentos a um grau de confiança de 99% ($p \leq 0,01$). (X) O antimicrobiano E não foi testado para MC.

Para amostras com mastite clínica os menores tempos de redução foram registrados entre amostras tratadas com os produtos B (24,59 horas) e C (23,19 horas) que não apresentaram diferença significativa entre si e com os demais antimicrobianos. Todos os tratamentos, no entanto diferiram significativamente do controle ($p=0,00636$).

Souza (2006) analisou 72 amostras de leite cru refrigerado, provenientes de propriedades rurais localizadas em Sacramento-MG, com diferentes níveis de células somáticas (CCS). Os resultados indicaram TRAM acima de 3 horas sem correlação com a CCS. As amostras com menores CCS (menos de 100.000 células/ml de leite) apresentaram TRAM acima de 4 horas. Nessas condições obteve-se uma alta contagem de microrganismos mesófilos e psicrotróficos e também não houve correlação entre as contagens desses microrganismos e o tempo de redução. No presente estudo amostras com reações fracas ao CMT (baixa CCS) reduziram o azul de metileno em tempos muito maiores, o que provavelmente se deve ao efeito das medidas de higiene adotadas durante a coleta e acondicionamento em recipientes esterilizados.

Do ponto de vista de controle de qualidade, o leite e os derivados lácteos estão entre os alimentos mais testados e avaliados, principalmente devido à importância que representam na alimentação humana e à sua natureza perecível (FERREIRA, 2007). Diferentes autores (ALBUQUERQUE et al., 1996; NASCIMENTO et al., 2001; DENOBILE, 2002; ROSARIO, 2002, NASCIMENTO et al., 2003; MEDEIROS et al., 2004; KOIDE; GIROTO, 2004; COUTO; TÓRTORA, 2005; TETZNER, et al., 2005; BARREIRA et al., 2005; NERO, et al., 2007) verificaram a ocorrência de resíduos de antibióticos no leite com valores variando de 1,68% (KOIDE e GIROTO, 2004) a 69,7% (ALBUQUERQUE et al., 1996). Os autores sugerem o uso indiscriminado de antibióticos para tratamento de mastite como causa da presença dos resíduos no leite.

Segundo Oliveira et al. (1999), em condições ideais de higiene na ordenha, a contagem bacteriana total inicial do leite situa-se em torno de 10^3 a $9,0 \times 10^3$ UFC/mL. Pelas normas estabelecidas pela legislação atual o leite é considerado adequado pela indústria quando a redução do azul de metileno ocorre a partir de duas horas e trinta minutos (BRASIL, 2002a) o que corresponde a uma carga microbiana em torno de 10^4 UFC/ml, portanto com uma pequena modificação da flora bacteriana em relação ao leite fresco ordenhado em boas condições de higiene.

Após a obtenção, os principais fatores responsáveis pelo aumento da carga microbiana, incluem a temperatura de armazenagem e o tempo decorrido até o seu

beneficiamento. Por sua vez, a carga microbiana inicial está entre outros fatores, associada à limpeza dos utensílios utilizados na ordenha, acondicionamento e transporte do leite.

A temperatura de armazenamento e transporte interfere diretamente na contagem total de microrganismos do leite. O resfriamento imediato em tanques de expansão e a coleta a granel em caminhões com tanque isotérmico tem tido grande enfoque para manutenção da qualidade do leite cru (FONTES et al., 2002). Entretanto, a manutenção do leite em temperaturas de refrigeração por períodos longos pode ocasionar problemas de qualidade associados à multiplicação e atividade metabólica de microrganismos psicotróficos (COUSIN, 1982; SANTOS; FONSECA, 2001). Essas bactérias se multiplicam em temperaturas abaixo de 7°C, embora a temperatura ótima de desenvolvimento se situe entre 20 e 30°C (JEFREY, 1990; BRITO; BRITO, 1998b).

A prova de redutase utilizada como parâmetro da avaliação do estado higiênico-sanitário do leite cru, através do estabelecimento de uma relação entre o TRAM e o número de bactérias, possui limitações quanto à variação da capacidade redutora de diferentes microrganismos (NADER FILHO et al., 1983; SOUZA et al., 1999) e presença de resíduos de antimicrobianos no leite (BRANCHER; FAGUNDES, 1998). Altas contagens de psicotróficos em leite cru refrigerado têm sido evidenciadas (MENDONÇA et al., 2001), o que não pode ser excluído, mas provavelmente foi minimizado no presente estudo.

Avaliamos o tempo de redutase de amostras de leite com diferentes reações ao CMT e de vacas com mastite clínica, obtido em condições de higiene em frascos estéreis e armazenado sob refrigeração por pouco tempo. Assim, presumimos que o TRAM neste estudo está diretamente relacionado ao efeito dos agentes usuais de mastite sobre a redutase e uma população diferenciada, o que justifica os tempos de redução mais elevados.

4.5. Adaptação do Teste da Redutase para Avaliação da Sensibilidade a Antimicrobianos.

Excluindo-se as amostras que apresentaram TRAM menor que o tempo de redução do controle (consideradas resistentes) e aquelas que não reduziram no período de observação (48 horas), calculou-se a média da relação entre o TR da amostra (TMRA = 36,46) pelo tempo médio de redução do controle (TMRC = 23,57) e o intervalo de confiança destes valores ($1,91 \pm 0,365$). Assim, consideramos o intervalo de 1,54 a 2,28 como o tempo a partir do qual o crescimento foi inibido, estabelecendo-se estes tempos como indicadores de sensibilidade ao antibiótico adicionado (Tabela 07). Amostras que reduziram o corante entre 1,08 e 1,54 vezes o tempo de redução do controle foram consideradas pouco sensíveis, este intervalo caracterizado como intermediário e acima desse como sensível.

Tabela 07: Tempo médio de redução do azul de metileno da amostra (TMRA) em função do tempo médio de redução do controle (TMRC) na relação entre TMRA / TMRC e intervalo de confiança dos controles.

TRATAMENTO	TMRA / TMRC
Resistente	$\leq 1,0$
Intermediário	1,08 a 1,54
Sensível	1,55 a 2,08
Muito sensível	$\geq 2,1$

Pelos critérios estabelecidos, das 100 amostras provenientes de vacas com mastite subclínica adicionadas dos produtos A, B, C, D e E avaliadas quanto ao TRAM em relação aos controles, as menores resistências seriam observadas para gentamicina (B) e associação de

tetraciclina, bacitracina e neomicina (E). Por outro lado, 45 amostras seriam resistentes ao produto C (espiramicina + neomicina), 39 ao produto D (cefoperazone) e 23 ao produto A contendo cloxacilina (Tabela 08).

O resultado é consistente com os achados de diferentes autores que apontam elevado padrão de sensibilidade de amostras isoladas do leite de vacas com mastite à gentamicina (LANGONI et al., 2000; COSTA et al., 2000b; BRITO et al., 2001; WATANABE et al., 2001; BYARUGABA, 2004), à cloxacilina, tetraciclina e bacitracina (FREITAS et al., 2005) e ao cefoperazone (VARGAS et al., 1996).

Tabela 08: Perfil de sensibilidade de 100 amostras de leite aos antimicrobianos A (cloxacilina), B (gentamicina), C (espiramicina + neomicina), D (cefoperazone) e E (tetraciclina + bacitracina + neomicina) segundo o TRAM em relação aos controles.

Produto / Antimicrobiano	Resistente	Sensível	Intermediário
A	23	53	24
B	9	76	15
C	45	30	25
D	39	38	23
E	7	81	12

Do total de amostras, apenas uma seria resistente a todos os princípios ativos contidos nos diferentes produtos testados, porém 34 seriam resistentes a dois (20/100) ou mais produtos (14/100) e respectivos princípios.

Amostras de leite de vacas com mastite clínica (64) foram testadas pelo TRAM com produtos diferentes. O produto A (cloxacilina) foi substituído pela associação de enrofloxacina e amoxicilina e o C (espiramicina + neomicina) pelo cefoperazone. Assim, os produtos testados tinham a seguinte composição: A – (enrofloxacina e amoxicilina), B - (gentamicina), C - (cefoperazone) e D - (bacitracina, neomicina e tetraciclina). Neste caso, 38 (63,3%) e 39 (65%) amostras evidenciaram sensibilidade à gentamicina (B) e cefoperazone (C) respectivamente, enquanto 42 (70%) apresentaram sensibilidade aos princípios ativos contidos nos produtos A e D, sendo 22 amostras (36,7%) com sensibilidade intermediária ou resistência a mais de dois produtos e princípios ativos.

Guilloux et al. (2008) ao analisarem a epidemiologia de um surto de mastite bovina em uma propriedade leiteira no Estado do Rio Grande do Sul observaram não haver uma boa resposta ao tratamento administrado, inclusive com progressão do surto e progressão de casos clínicos e subclínicos em animais tratados com um produto contendo os princípios ativos neomicina e espiramicina. O teste de sensibilidade revelou a existência de amostras de *S. aureus* resistentes aos princípios ativos que estavam sendo utilizados.

O teste da redutase foi utilizado para verificar a capacidade de redução do azul de metileno e resazurina pelo *Streptococcus thermophilus*, em amostras de leite esterilizadas contendo diferentes diluições de antibióticos (RODRIGUES et al., 1993). O mesmo método utilizando o azul de metileno, como indicador, foi utilizado para detectar a presença de resíduos de antibióticos no leite de vacas com mastite tratadas por via intramamária com gentamicina, oxitetraciclina e penicilina (BRANCHER; FAGUNDES, 1998). Os resultados demonstraram a possibilidade de detecção de pequenas quantidades de antibióticos nas amostras, tanto pelo método de resazurina, como pelo do azul de metileno. Os autores sugeriram que este teste pode ser utilizado para avaliação da qualidade do leite e na pesquisa presuntiva de resíduos de antibióticos nas amostras.

Com o mesmo princípio, bactérias sensíveis aos antibióticos adicionados na amostra de leite devem presuntivamente apresentar crescimento limitado refletindo-se em maior tempo de redução do corante.

4.6 Tempo de redução do azul de metileno mediante adição de antibióticos no leite em relação ao antibiograma.

Sessenta e quatro amostras de leite avaliadas quanto ao TRAM na presença de antibióticos foram submetidas aos procedimentos para isolamento e identificação de agentes microbianos. Destas obteve-se crescimento de bactérias em 61 amostras, com predominância dos gêneros *Streptococcus* sp (23/61) e *Staphylococcus* sp (13/61) isolados ou em associação (13/61). *E. coli* foi isolada em uma amostra na propriedade A e em dez na propriedade B.

Embora não se tenha obtido amostras de vacas em tratamento ou com tratamento recente, nove amostras (26%) procedentes de uma mesma propriedade foram resistentes a um ou mais antimicrobianos testados. Nesta propriedade havia um grande número de vacas com mastite e o uso de antibiótico intramamário era freqüente. A observação está de acordo com relatos de Freitas et al. (2005) que apontam para diferentes perfis de sensibilidade entre propriedades segundo a frequência de utilização de antibióticos. Deve-se atentar que no caso do tratamento da mastite clínica o uso terapêutico de antibióticos pode acarretar em tempo de carência maior do que o preconizado na bula dos medicamentos. Esse efeito foi observado em animais tratados por via sistêmica, com penicilina, estreptomina, sulfadiazina e trimetoprim e também no tratamento intramamário com cefacetil, gentamicina e tetraciclina (RAIA JÚNIOR, 2001), não sendo possível, portanto garantir a inexistência de antibióticos residuais nas amostras, apesar da garantia dos proprietários de não haver utilizado antibiótico nas vacas nos dias anteriores.

Como o teste da redutase não foi realizado com os princípios ativos isoladamente, mas com produtos contendo um ou mais antibióticos, consideramos para efeito de comparação com o antibiograma, a sensibilidade ao produto como sensibilidade aos princípios ativos do mesmo. No caso do antibiograma em que foram testados os princípios ativos separadamente, consideramos a sensibilidade ao produto quando ocorreu sensibilidade a pelo menos um dos princípios da fórmula. Assim, obteve-se média de 88,2% de coincidência nos resultados de sensibilidade pelo teste da redutase em comparação com o antibiograma (Tabela 09). Os princípios ativos contidos nos antimastíticos A e C apresentaram os maiores índices de coincidência nos resultados (91,2%).

A coincidência de resultados entre os testes foi considerada elevada indicando a possibilidade de utilização do método da redutase para avaliação da sensibilidade a antimicrobianos em amostras de leite de vacas com mastite da mesma forma que o método havia sido proposto para detecção de antibióticos na amostra (RODRIGUES et al., 1993; BRANCHER; FAGUNDES, 1998).

Tabela 09: Número de amostras resistentes, sensíveis e com sensibilidade intermediária (SI) aos antimastíticos A (enrofloxacina + amoxicilina), B (gentamicina), C (cefoperazone) e D (bacitracina + neomicina + tetraciclina) pelo Tempo de Redução do Azul de Metileno (TRAM) e antibiograma, e porcentagem de resultados coincidentes.

Produto	TRAM			Antibiograma			% de Coincidência
	Resistente	Sensível	SI	Resistente	Sensível	SI	
A	0	29	5	3	30	1	91,2
B	0	28	6	5	28	1	85,3
C	3	26	5	2	28	4	91,2
D	0	28	6	6	26	2	85,3
Média da % de coincidência							88,2

A resistência é a capacidade inerente ou adquirida da bactéria de não responder aos efeitos inibitórios das drogas antimicrobianas, por diversos mecanismos, e atualmente é um importante problema de saúde pública. Uma das principais causas de resistência é o uso indiscriminado e inadequado de antimicrobianos. No mundo inteiro, surgem relatos de resistência aos mais diversos tipos de antimicrobianos, mesmo os mais modernos.

Neste contexto, duas amostras foram resistentes a todos os princípios ativos testados, incluindo o cefoperazone, uma cefalosporina de terceira geração, com ação sobre microrganismos Gram positivos e negativos como *E. coli*, *Staphylococcus spp* e *Pseudomonas aeruginosa*. Essa resistência é preocupante uma vez que estes agentes estão frequentemente envolvidos como agentes etiológicos de mastite e outras enfermidades nos animais e no homem. A menor sensibilidade foi verificada em relação ao produto D que compreende a associação de tetraciclina, neomicina e bacitracina.

4.7. Teste Clínico

Das 26 vacas tratadas, 24 (92,3%) se recuperaram (melhora clínica e redução do escore ao CMT) após o tratamento intramamário. Considerando a alta correlação entre a sensibilidade avaliada pelo antibiograma e teste da redutase, o resultado do teste clínico foi surpreendentemente favorável.

Do total de vacas tratadas, o TRAM indicava que o microrganismo ou grupo de microrganismos presentes em 24 eram sensíveis aos princípios ativos utilizados, o que corresponde a 92,3% de resultados positivos pelo TRAM (Tabela 10).

Não foi possível realizar o antibiograma em cinco das 26 amostras de leite submetidas ao isolamento. Nestes casos não houve crescimento não sendo possível o isolamento das colônias. Dificuldade de isolamento do agente etiológico da mastite é relatada em diferentes estudos. São diversas as causas apontadas, sendo reportado que o isolamento bacteriano pode não ser identificado em mais de 50% das amostras (MARKOVEC; RUEGG, 2002).

As duas vacas que não se recuperaram foram tratadas com gentamicina (B) e associação de tetraciclina, neomicina e bacitracina (D) e em ambos os casos o antibiograma, diferentemente do teste da redutase indicava que os agentes etiológicos (*Staphylococcus sp.* e associação deste com *Streptococcus sp.*) eram resistentes aos produtos ou princípios ativos utilizados no tratamento. Assim, o TRAM não foi útil para identificação da resistência dessas amostras aos antimicrobianos testados.

Esse resultado pode em parte ser justificado pela capacidade redutora das diferentes bactérias. Nader Filho et al. (1983) alertam que alguns *Streptococcus sp.* causadores da mastite bovina não reduzem o azul de metileno. De uma das amostras procedentes de vacas

que não se recuperaram após o tratamento foram isolados *Staphylococcus* sp. em associação com *Streptococcus* sp, concordando com os relatos de Nader Filho et al. (1983).

Neste estudo, embora o microrganismo isolado com maior frequência tenha sido o *Streptococcus* sp., não se observou interferência significativa no tempo de redução do azul de metileno. Os controles das amostras em que foram isolados *Streptococcus* sp. reduziram o azul de metileno em tempo maior (13,6 horas) que as demais (9,8 horas), mas sem diferença significativa ($p=0,130051$).

Tabela 10: Número de resultados positivos e negativos mediante tratamento clínico de 26 vacas com mastite clínica em relação ao perfil de sensibilidade dos princípios ativos dos produtos utilizados pelo antibiograma e Tempo de Redução do Azul de Metileno (TRAM).

	<i>Positivos</i>	<i>Negativos</i>	<i>% ACERTOS</i>
TRAM	24	2	92,3
Antibiograma	18	3	85,7
$p= 0,077293$			

Um estudo desenvolvido no Ambulatório da Escola Paulista de Medicina (CRUZ et al., 1965), com a intenção de avaliar a terapêutica exclusivamente tópica das otites médias supuradas agudas e crônicas frente a várias medicações, em casos resistentes ou não a tratamentos anteriores obteve-se pouca correspondência dos resultados *in vivo* e *in vitro* (37,5%), apesar de ser usado nos testes de sensibilidade, a mesma concentração de medicamento receitado a cada paciente. Neste estudo foi demonstrado o valor relativo e duvidoso dos antibiogramas. Os resultados obtidos *in vivo* e *in vitro*, em relação aos germes encontrados, não foram concordantes em 62,5% dos casos, evidenciando segundo os autores o valor relativo e discutível dos antibiogramas.

Quadro 2: Microrganismos isolados em 26 amostras de leite de vacas com mastite clínica submetidas ao tratamento intramamário em duas propriedades no município de Resende, Rio de Janeiro.

Microrganismos isolados	Propriedade A (16)	Propriedade B (48)
<i>Bacillus</i>	0	1
<i>E coli</i>	1	10
<i>Streptococcus</i> spp.	7	16
<i>Staphylococcus</i> spp.	1	12
<i>Streptococcus</i> spp. + <i>Staphylococcus</i> spp.	6	7
Não identificados	1	2

Quadro 3: Resultados do tratamento clínico com antimastíticos e respectivos agentes antimicrobianos A (enrofloxacina + amoxicilina), B (gentamicina), C (cefoperazone) e D (bacitracina + neomicina + tetraciclina) e perfil de sensibilidade pelo Tempo de Redução do Azul de Metileno (TRAM) e antibiograma.

Nº	CMT		Tratamento Produto	TRAM				Antibiograma			
	Dia 0	Dia 10		A	B	C	D	A	B	C	D
1	MC	+++	B	S	S	S	S	S	S	S	R
2	MC	+	C	S	S	S	S	S	S	S	S
3	MC	+++	B	S	S	S	S	S	S	S	S
4	MC	+++	B	I	I	I	I	R	R	R	R
5	MC	+++	C	I	I	I	I	R	R	R	R
6	MC	++	B	S	S	S	S	S	S	S	S
7	MC	T	C	S	S	S	S	S	S	I	R
8	MC	T	B	S	S	S	S	S	S	S	S
9	MC	MC	B	S	S	S	S	I	S	S	S
10	MC	++	B	S	S	S	S	S	S	S	S
11	MC	T	D	S	R	I	S	S	R	I	S
12	MC	-	B	I	I	I	I	S	S	I	S
13	MC	++	D	I	I	I	I	S	S	S	S
14	MC	++	C	I	I	I	I	S	I	S	S
15	MC	-	D	I	I	I	I	I	S	S	S
16	MC	T	C	I	I	I	I	S	S	S	S
17	MC	++	D	S	S	S	S	-	-	-	-
18	MC	T	B	S	S	S	S	S	S	S	S
19	MC	MC	D	I	I	I	S	R	R	R	R
20	MC	+++	C	I	I	I	I	I	S	I	S
21	MC	T	D	I	I	I	I	-	-	-	-
22	MC	-	B	S	I	R	S	-	-	-	-
23	MC	++	D	S	I	R	I	-	-	-	-
24	MC	++	B	I	I	I	I	S	I	S	S
25	MC	+	D	S	S	S	S	-	-	-	-
26	MC	+++	C	I	I	I	I	R	S	S	S

Mastite Clínica (MC); Traços (T); Resistente (R); Sensível (S); Intermediário (I); Sem resultados (-)

5 CONCLUSÕES

O conhecimento do perfil de sensibilidade dos agentes etiológicos da mastite em uma propriedade é útil como auxiliar no tratamento.

O teste da redutase na forma adaptada demonstrou elevada concordância com os resultados do antibiograma, e ambos se apresentaram eficientes no auxílio ao tratamento.

O teste da redutase mediante adição de antibióticos é útil na escolha do antimicrobiano a ser utilizado no tratamento do quarto mamário afetado por mastite clínica e subclínica.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, L.M.B.; MELO, V.M.M.; MARTINS, S.C.S. Investigações sobre a presença de resíduos de antibióticos em leite comercializado em Fortaleza – CE - Brasil. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.10, n.41, p.29-32, 1996.
- ALLISON, J.R.D. Antibiotics residues in milk. **British Veterinary Journal**, 141: 9-16, 1995.
- ALMEIDA, A.C.; MOTA E SILVA, G.L.; SILVA, D.B.; FONSECA, Y.M.; BUELTA, T.T.M.; FERNANDES, E.C. Características físico-químicas e microbiológicas do leite cru consumido na cidade de Alfenas, MG. **Revista da Universidade de Alfenas**, Alfenas, v.5, p.165-168, 1999.
- 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.
- ANDRADE, M. A. Mastite bovina subclínica: prevalência, etiologia e testes de sensibilidade a drogas antimicrobianas. **A Hora Veterinária**, v.20, p.119-126, 2001.
- ANUÁRIO MILKBIZZ. **Anuário Milkbizz** 1999/2000. São Paulo: Milkbizz. 326p, 1999.
- 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.
- 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.
- BARCELOS, S. S.; OLIVEIRA, L. R. S.; ALVES, K. S. Caracterização físico-química do leite fluído exposto ao consumo no município de Parauapebas – PA. In: **Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite**, 2, 2006, Goiânia. Anais...Goiânia, 2006.
- BARREIRA, V.B.; MELO, L.H.M.S.; RISTOW, A.M.; MARINI, S.; LACERDA, S.S.P. Pesquisa de resíduos de antibióticos em amostras de leite da Cooperativa Regional Agropecuária de Macuco Ltda., no município de Macuco, estado do Rio de Janeiro. In: **XXII Congresso Nacional de Laticínios**, 2005, Juiz de Fora. **Anais do XXII Congresso Nacional de Laticínios**. Juiz de Fora, CD-Rom 2005.
- BARROS, G.M.S.; JESUS, N.M.; SILVA, M.H. Pesquisa de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado tipo C, comercializado na cidade de Salvador. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.2, n.3, p.69-73, 2001.
- 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.

BEM, A.; FABRINI, J. E.. A comercialização informal de leite como componente de resistência camponesa em Marechal Cândido Rondon - PR. **Revista NERA (UNESP)**, Presidente Prudente - SP, v. 6, p. 14-23, 2005.

BERRY E.A., J.E. HILLERTON. Dry cow treatment strategies. In Proc. 39th Ann. Mtg. Natl. Mastitis Council, Atlanta GA. **National Mastitis Council, Inc.**, Madison, Pp 213-214 2000.

BIBALKE, D The effect of high somatic cell count on the quality of dairy products. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, 15: 67-8, 1994.

BODDIE, B.S., NICKERSON, S.C., OWENS, W.E., WATTS, J.L. Udder microflora in nonlactating heifers. **Agricultural Practices Bovine. Medical Immunology**, v.1, p.22-25, 1987.

BRABES, K. C. S.; CARVALHO, E. P.; DIONÍZIO, F. L. ; PEREIRA, M. L. ; GARINO JÚNIOR, F.; COSTA, E. O. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas do gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos Estados de São Paulo e Minas Gerais. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, n. 3, p. 4-11, 1999.

BRAMLEY, A. J. Factors affecting milk quality. In: ANDREWS, A. H.; BLOWEY, R. W.; BOYD, H.; EDDY, R. G. ed. **Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle**. Oxford: Blackwell Scientific Publications. p.291-334, 1992.

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

BRANDÃO, S.C.C. O futuro da qualidade do leite brasileiro. **Indústria de Laticínios**, n.25, p.68-70, 2000.

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. Decreto-Lei nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Rio de Janeiro, p.10.785, 07 jul., 1952.

BRASIL. Portaria 146, de 07 de março de 1996. Ministério da Agricultura. Regulamentos Técnicos de Identidades e Qualidades de Produtos Lácteos . **Diário Oficial da União**, 1996.

BRASIL. Instrução Normativa nº 42 de 20 de dezembro de 1999. Plano nacional de controle de resíduos em produtos de origem animal. MAPA. Brasília: **Diário Oficial da União**, 1999.

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 37 de 18 de abril de 2002. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**, 2002b.

BRASIL, Resolução nº 3.088, de 25 de junho de 2003. Dispõe sobre o programa de incentivo à mecanização, ao resfriamento e ao transporte granelizado... **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 de junho 2003.

BRITO J. R. F.; CALDEIRA G. A. V.; VERNEQUE R. S.; BRITO M. A. V. P. Sensitivity and specificity of the California Mastitis Test as a diagnostic tool for subclinical mastitis in quarter somatic cell count estimation. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 2, 1997.

BRITO, J. R.; 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., 1998a.

BRITO, J.R.F.B.; BRITO, M.A.V.P. **Qualidade higiênica do leite**. Embrapa - Juiz de Fora - CNPGL-ADT, 17p, 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, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; SILVA, M.A.S.; CARMO, R.A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *S. aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.10-17, 2001

BRITO, J.R.F.; SOUZA, G.N.; BRITO, M.A.V.P. Panorama da qualidade do leite na região Sudeste: Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. **In: BRITO, J.R.F.; PORTUGAL, J.A.B. Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite; Epamig/CT/ILCT, p.47-61, 2003.

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 do brasileiras. **In: CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE**, 6, 2007, Resende. Anais...CD Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2007.

BURAGOHAJN, J.; DUTTA, G.N. Increased milk yield through treatment of bovine subclinical mastitis and its economic implications. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.60, p.965-966, 1990.

BYARUGABA, D.K. A view on antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. **International Journal Antimicrobial Agents**, v.24, p.105-110, 2004.

CADEMARTORI, A. Contagem eletrônica de células somáticas no leite como método auxiliar no controle de mastite bovina em uma propriedade leiteira no Rio Grande do Sul. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS**. v. 29, n. 1, p. 69 – 70, 2001.

CARACAPPA, S., LORIA, G. R., NOTO, A. M., BALBO, S. M., Di NOTO, A. M. Sensibilita e resistenza verso alcuni chemio-antibiotici in ceppi di *Staphylococcus aureus*

isilati da latte mastitico bovino in Sicilia. **Atti della Societa Italiana di Buiatria**, Palermo, v.23, p.229-33, 1991.

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.

CARVALHO, M. G. X.; MEDEIROS, N. G. A.; ALVES, A. R. S.; SANTOS, M. G. O. dos; LIMA, S. C. P.; AZEVEDO, S. S. . Análises microbiológicas do leite in natura e pasteurizado tipo C proveniente de uma mini usina da cidade de Patos, Paraíba.. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo-SP., v. 18, n. 123, p. 62-66, 2004.

CARVALHO, G.R.; OLIVEIRA, A.F. O setor lácteo em perspectiva. **Circular Técnica**, 11. Campinas, SP, 2006.

CARVALHO, G.; CARNEIRO, A.V. **Principais Indicadores Leites e Derivados**. – Ano 2, n. 7 (jan/2009) - Juiz de Fora : Embrapa Gado de Leite, 2009. Disponível em: http://www.cileite.com.br/publicacoes/arquivos/2009_01_Indicadores_leite.pdf

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.

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

COLLINS, E. B. Heat resistant psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, Baltimore, v. 64, n. 1, p. 157-160, jan, 1981.

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, R. R., CARVALHO FILHO, F. D., ANDRADE, M. A. Mastite bovina: sensibilidade de agentes etiológicos a antibióticos e quimioterápicos. **Anais da Escola de Agronomia e Veterinária**, n.1, p. 79-85, 1986.

COSTA, E. O, MANGERONA, A. M., BENITS, N.R. Avaliação de campo de quatro tratamentos intramamários de mastite clínica bovina. **A Hora Veterinária**, ano 16, n.93, p.19-21, 1996.

COSTA, E. O.; MELVILLE, P. A. ; RIBEIRO, A. R. ; WATANABE, E. T. Estudo da etiologia das mastites bovinas nas sete principais bacias leiteiras do Estado de São Paulo. **Revista Napgama**, Brasil, n. 4, p. 6-13, 2000a.

COSTA, E.O.; BENITIS, N.R.; GUERRA, J.L.; GUERRA, J.L.; MELVILLE, P.A. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus spp.* Isolated from mammary parenchymas of slaughtered dairy cows. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v.47, p.99-103, 2000b.

COSTA, E. O.; GARINO Jr., 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 Nappama**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 12-15, 2001.

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

COUSIN, M.A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, Ames, v.45, n.2, p.172-207, 1982.

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.

COUSIN, M.A.; BRAMLEY, A.J. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R.K. **Dairy microbiology of milk**. London: Applied Science Publishers, p.119-163, 1991.

COUTINHO, D.A; COSTA, J.N; RIBEIRO, M.G; TORRES, J.A. **Etiologia e sensibilidade antimicrobiana in vitro de bactérias isoladas de ovelhas da raça Santa Inês com mastite subclínica**. Rev. Bras. Saúde Prod. An., v.7, n2, p. 139-151, 2006. Disponível em: <http://www.rbspa.ufba.br>

COUTO, C. R. A.; TÓRTORA, J. C. O. Leite, uma alimento nem sempre perfeito. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 89, p. 45-50, 2005.

CRUZ, N. A.; MANGABEIRA ALBERNAZ, P. L.; GANANGA, M. M.; CAHALI, S.; SPINOLA, R. S.; ASZALOS, F. - **Terapêutica local das otites médias supuradas agudas a crônicas não colesteatomatosas**. Rev. Brasileira de Otorrinolaringologia, v.33, p.89-102, 1965. Disponível em http://www.rborl.org.br/conteudo/acervo/print_acervo.asp?id=232

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.

CUNHA, C.M.M. Perfil de suscetibilidade e detecção de marcadores genéticos de resistência em *Streptococcus agalactiae* isolados de amostras animais e humanas. **Dissertação de Mestrado**. UFRRJ, Mestrado em microbiologia Veterinária, UFRRJ. 44f., 2008.

DEGRAVES, F. J., FETROW, J. F. Economics of mastitis and mastitis control. *Vet. Clin. N. Amer.*: **Food Animal Practice**, v.9, n.3, p. 421-433, 1993.

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.

DENOBILO, M. Análise de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. São Paulo, 2002. **Dissertação de Mestrado** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo. 121p. 2002

DESMASURES, N.; GUEGUEN, M. Monitoring the microbiology of high quality milk by monthly sampling over 2 years. **Journal of Dairy Research**, v.64, p.271-280, 1997.

DINC, D.A., ERGANIS, O., GULER, M., *et al.*. Imeklerin subklinik mastitilerinde Baytril in etkisi. **Hayvancilik Arastirma Derg**, v. 1, p. 12-5, 1991.

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**. 63:75-89, 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.

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

DOMINGUES, P. F., PADOVANI, C. R., DOMINGUES, L. R. Estudo da eficácia *in vitro* dos antibióticos e quimioterápicos usados no tratamento da mastite bovina por *Staphylococcus sp.* **A Hora Veterinária**, n. 82, p. 27-29, 1994.

DOMINGUES, P.F.; SILVA, A.V.; MENDONÇA, A.O.; CAUDURO, R.O. Tratamento de mastite com cefapirina sódica em vacas em lactação. **A Hora Veterinária**, n.112, p.37, 1999.

DOOD, F. H. Mastitis progress on control. **Journal of Dairy Science**, v. 66, p. 1773-80, 1983.

EMANUELSON, U.; FUNKE, H. Effect of milk yield on relationship between bulk milk somatic cell count and prevalence of mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.2479-2483, 1991.

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**, 62: 69-81, 1995.

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, n. 3, p. 499-517, 1993.

FAGUNDES, C. M. **Persistência de antibióticos no leite bovino em condições experimentais e prevalência no leite tipo B e C consumido em Belo Horizonte, 1978.** (Dissertação de Mestrado). Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, 1980. 49 p, 1980.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Revista Ciência Rural**, v.34, p.1315-1320, 2004.

FAO. **FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAOSTAT database, 2006.** Disponível em <<http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>>. Acesso em: 10 de maio 2006.

FERNANDES, D. **Diagnóstico laboratorial em mastites bovinas: Sua real importância e aplicação prática.** Atualização Técnica 33, Div. Agropec. Pfizer, 2006. Disponível em www.pfizersaudeanimal.com.br/bov_atualizações5.asp. Acesso em 19/12/2008.

FERREIRA, L.M.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, E.; ZAFALON, L. F.; SOUZA, V. Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p. 1228-1234, jul-ago, 2006.

FERREIRA, M. A. Análises Microbiológicas para Leite Fluído. **Dossiê Técnico. Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico da Universidade de Brasília – CDT/UnB**, setembro, 2007.

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.

FERREIRO, L. Susceptibility patterns of bovine milk strains of *Staphylococcus aureus* originated from herds in USA (CA) and Brazil (R.G.). **Arquivo da Escola de Veterinária UFMG**, Belo Horizonte, v. 32, n. 3, p. 393-406, 1980.

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.

FINEP. **Relatório Setorial Preliminar.** Disponível em http://www.finep.gov.br/PortalDPP/relatorio_setorial/impresao_relatorio.asp?lst_setor=14. Acesso em 20/04/2008.

FONSECA, L. F. L. Princípios básicos sobre funcionamento, dimensionamento, manutenção e avaliação dos sistemas de ordenha. São Paulo. **Anais. 2º Encontro de Pesquisadores em Mastites Bovinas do Estado de São Paulo**, p.11-27, 1996.

FONSECA, L.F.L.; PEREIRA, C.C. Por que a qualidade microbiológica do leite é importante? **Revista Balde Branco**. Ano 35, n. 418. São Paulo, 1999.

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

FONTES, A.C.L.; CASTRO, P.R.S.de; BRANDÃO, S.C.C. Avaliação do uso da redutase para determinação da qualidade do leite coletado a granel. **In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS**, 19, 2002, Juiz de Fora. Anais... Juiz de Fora: Templo. p.47-52. 2002.

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

FRANCO, B.G.M.F; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 182p, 1996.

FREITAS, J. A., SILVA, R. A. G., NASCIMENTO, J. A. C. Características do leite fluido consumido em Belém, Pará. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 47, n. 3, p. 435-445, 1995.

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.

FRITON, G.M.; SOBIRAJ, A.; RICHTER, A. Effects of various antibiotic treatments of lactating cows with subclinical mastitis. **Tier. Prax. Ausg. G. Gross. Nutz.**, v.26, p.254-260, 1998.

GANDINO L, CHIAPPETTA G. **Comparison of rapid methods for determination of beta-lactam antibiotics in milk**. *Latte*, v.23, n.3, p.71-74, 1998

GEDEK, W. Antibacterial effect of new quinolines and nalidixic acid against bovine mastitis pathogens of cattle **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v.94, nº 10, p.545-8, 1987.

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**, 85: 1913-1917. 2002.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Higiene do leite: aspectos gerais das mastites. **Revista Higiene Alimentar**, 9(36): 12-16, 1995.

GODDEN, S.M.; JANSEN, J.T.; LESLIE, K.E. et al. The effect of sampling time and sample handling on the detection of *Staphylococcus aureus* in milk from quarters with subclinical mastitis. **The Canadian Veterinary Journal**, v.43, p.38-42, 2002.

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

GONZÁLEZ F.H.D.; DURR, J.W.; FONATANELLI, R.S. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. UFRGS, Porto Alegre, 2001.

GONZÁLEZ, F.H.D.; CAMPOS, R. Indicadores metabólico-nutricionais do leite. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; CAMPOS, R. (Ed). **Anais do I simpósio de patologia clínica veterinária da região sul do Brasil**. Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, p.31-46, 2003.

GRIFFITHS, M.W. Toxin production by psychrotrophic *Bacillus spp* present in milk. **Journal of Food Protection**, v.59, n.9, p.790-792, 1990.

GUÉRIN-FAUBLÉE V., TARDY F., BOUVERON C; CARRET G. Antimicrobial resistance of *Streptococcus* species isolated from clinical mastitis in dairy cows. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.19, p.219-226, 2002.

GUÉRIN-FAUBLÉE V., CARRET G., HOUFFSCHMITT P. In vitro activity of 8 antimicrobial agents against bacteria isolated from clinical mastitis in cows. **The Veterinary Record**, v.152, p.466-471, 2003.

GUILLOUX, A.G.A; CARDOSO, M.R.I.; CORBELLINI, L.G. Análise epidemiológica de um surto de mastite bovina em uma propriedade leiteira no Estado do Rio Grande do Sul. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.36, n.1, p.1-6, 2008.

GUIMARÃES, R. Importância da matéria-prima para a qualidade do leite fluido de consumo. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, p.25-34, 2002.

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.

HAJDENWURCEL, J.R. **Atlas de microbiologia de alimentos**. São Paulo: Fonte, v. 1, 1998.

HALLBERG J.W., DAME K.J., CHESTER S.T., MILLER C.C., FOX L.K., PANKEY J.W., NICKERSON S.C.; WEAVER L.J. The visual appearance and somatic cell count of mammary secretions collected from primigravid heifers during gestation and early postpartum. **The Journal of Dairy Science Reserch**. v.78, p.1629-1636. 1995.

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**. 77: 2103-2112, 1994.

HAYES, P.R. **Microbiologia e Higiene de los Alimentos**. . Zaragoza, Acribia, 369p, 1993.

HAYES, M. C., BOOR, K. Raw Milk and Fluid Milk Products. **In E. H. Marth & J. L. Steele** (Eds.), Applied Dairy Microbiology. (2nd ed.). New York: Marcel Dekker, Inc., p. 77-91, 2001.

HEESCHEN, W.; REICHMUTH, J. Mastitis: influence on qualitative and hygienic properties of milk. **In: INTERNATIONAL MASTITIS SEMINAR**, 3, Tel Aviv. *Proceedings...* Tel Aviv: M. Lachmann Printers, 1995. Book 1, section 3, p.3-13, 1995.

HOEBEN, B. D., MONFARDINI, E., BURVENICH, C. HAMANN, J. Treatment of acute Escherichia coli mastitis in cows with enrofloxacin: effect on clinical signs and

chemiluminescence of circulating neutrophils. **The Journal of Dairy Science Reserch**, v.67, p.485-502, 2000.

HOFFER, M. Treatment of acute bovine mastitis enrofloxacin (Baytril). Muchen. 125p. **Tese (Doutorado)** Tierarztliche Facultat, Ludwig Maximilians Universitat. 1990

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. 2006. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 21/01/2009.

ICMSF. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microrganismos de los alimentos. 1. técnicas de análisis microbiológico**. Zaragoza: Acribia, 431p, 1980.

JANK, M. S.; FARINA, E.M.M.Q.; GALAN, V.B. **O agribusiness do leite no Brasil**. São Paulo: Milkbizz, 1999.

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

JAY, J.J. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed Porto Alegre, Art med, 2005.

JEFREY, D.C. Microorganisms and refrigeration temperatures. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Desmoines, v.10, n.4, p.192-194, 1990.

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, n. p.167-188, 1981.

KOIDE, E.M.; GIROTO, J.M. Verificação da presença de resíduos de antibióticos no leite in natura na região dos Campos Gerais – Paraná. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 21., 2004, Juiz de Fora. **Anais... Juiz de Fora**: Templo. p.436- 438. 2004.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; WINN Jr., W.C. **Diagnóstico Microbiológico**. 6.ed., Guanabara Koogan, 1488p., 2008.

KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (Eds.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1268p., 1984.

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

LAFRANCHI, A., MULLER, 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.

LANGE, C.; CARDOSO, M.; SENCZEK, D.; SCHWARZ, S. Molecular sub typing of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.67, p.127-141, 1999.

LANGENEGGER, J.; COELHO, N.M; LANGENEGGER, C.H.; CASTRO R. P. Estudo da incidência da mastite bovina na bacia leiteira do Rio de Janeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.5, p.437-440, 1970.

- LANGENEGGER, J.; VIANI, M. C. E.; BAHIA, M. G. Efeito do agente etiológico da mastite subclínica sobre a produção de leite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.1, n.2, p. 47-52. 1981.
- LANGONI, H., DOMINGUES, P. F., PINTO, M. P., LISTONI, F. J. P. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 43, n. 6, p. 507-515, 1991.
- LANGONI, H. L., DOMINGUES, P. F., SILVA, A V.; MENDONÇA, A. O.; CAUDURO, R. O. Tratamento da mastite bovina com cefapiridina sódica em vacas em plena lactação. **A Hora Veterinária**. V.19, n.112, p.37-39- 1999.
- LANGONI, H.; MENDONÇA, A. O.; DEVELLEY, A. Avaliação do uso da associação da bromexina com gentamicina no tratamento da mastite subclínica bovina. **Revista Napgama**, n. 1, p. 4-7, 2000.
- LARANJA, L.F., Programa de controle de mastite. **Periódico técnico – informativo elaborado pelo Departamento técnico da RHODIA – MÉRIEUX**, Ano II – número 4 – Maio 1996.
- LARANJA, L. F.; 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.
- 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.
- LIMA JÚNIOR, A. D; NADER FILHO, A; VIANNI, M. C. E. Sensibilidade *in vitro* dos *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase* negativos, isolados em casos de mastite caprina, à ação de antibióticos e quimioterápicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**;45(3):291-6, jun, 1993.
- LISBOA, C. S.; PIANTA, C. Redução da mastite através do tratamento duplo no período seco. **Anais. Congresso Pan-americano de Ciências Veterinárias**, XIV, Acapulco, México, p.32, 1994.
- LOREZETTI, D. K. Influência do Tempo e da Temperatura no Desenvolvimento de Microrganismos Psicrotóxicos no Leite Cru de Dois Estados da Região Sul. **Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)**, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR, 67 f. 2006.
- MACHADO, P.P.; PEREIRA, A.R.; SILVA, L.F.P.; ADRIAN, G.. Células somáticas no leite em rebanhos brasileiros. **Scientia Agricola**, v.57, n.2, p.359-361, 2000.
- 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, 35p., 1998.

MARINHO, M., BALDINE, S., SILVA, A. V., LISTONI, F. J. P., LANGONI, H. Ação *in vitro* da enrofloxacin em microrganismos isolados de leite mastítico da região de Botucatu-SP. / *The in vitro action of enrofloxacin on the microorganisms isolated from mastitic bovine milk.* **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, SP, Vol. 18, nº 2, 120-124, 2002.

MARKOVEC, J.A.; RUEGG, P.L.. Characteristics of milk samples submitted for culture in Wiscosin from 1994- 2000. **International Journal of Dairy Science**, Suplemento 1, v. 85, p.85, 2002.

MARQUES, D.C. Criação de Bovinos. 7.ed. rev., atual e ampl., 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, A. M. C. V.; ROSSI JUNIOR, O. D.; SALOTTI, B. M.; BURGER, K. P.; CORTEZ, A. L. L.; CARDOZO, M. V. Efeito do processamento UAT (Ultra Alta Temperatura) sobre as características físico-químicas do leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 295-298, 2008.

MASSEI, R.A.; SANTOS, W.R.M.; INFORZATO, G.R. PICCININ, A. **Mastite – diagnóstico, tratamento e prevenção: revisão de literatura.** Revista Científica Ele tônica de Medicina Veterinária. n.1, n.10 – Janeiro de 2008 – ISSN: 1679-7353. Disponível em: <http://www.revista.inf.br/veterinaria10/revisao/edic-vi-n10-RL55.pdf>

MCDUGALL, 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.

MEDEIROS, N; ARAÚJO, G. ; CARVALHO, M.G.X.; SANTOS, M.G.O; LIMA, S.C.P. Detecção de antibióticos no leite in natura consumido no município de Patos- PB. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 124, p. 85-88, 2004.

MENDES JORGE, A., 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**. Viçosa, v.34, n.6, p.2039-2045, 2005.

MENDONÇA, A. H.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M.; SIQUEIRA, T. L.; CAMARGOS, C. R. M. Qualidade microbiológica de leite cru resfriado: comparação de diferentes procedimentos e locais de coleta.. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora (MG), v. 56, n. 321, p. 282-288, 2001.

MEYER, P.M.; MACHADO, P.M.; COLDEBELLA, A., D. Methods of milk storage and age of samples on milk components percentage, somatic cells count and urea nitrogen. **Journal of Dairy Science.**, v.85, suppl.1, p.285, 2002.

MONFARDINI, E., BURVENICH, C., MASSARTLEEN, A. M., SMITS, E., PAAPE, M. J. Effect of antibiotic induced bacterial clearance in the udder on L-selectin shedding of blood neutrophils in cows with *Escherichia coli* mastitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.67, nº 4, p. 373-84, 1999.

MORENO, L.V.; BERMÚDEZ, M.C.; LANGURÉ, A.; HIGUERA-CIAPARA, I.; AGUAYO, MD.. Antibiotic residues and drugs resistant bacteria in beef and chicken tissues. **Journal of Food Science.**, v. 55, n. 3, p. 632-635, 1990

MUIR, D. D. The shelf life of dairy products: factors influencing raw milk and fresh products. **Journal of the Society of Dairy Technology.** v. 49, p. 24-32, 1996.

MULLER, 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.

MURPHY, S.C. Influence of bovine mastitis on lipolysis and proteolysis in milk. **Journal of Dairy Science**, 72:620-6, 1989.

MYLLYS, V. Staphylococci in heifer mastitis before and after parturition. **Journal of Dairy Research**, v.62, p.51-60. 1995.

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.

NADER FILHO. A Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Ribeirão Preto, São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, v. 5, n. 2, p. 53-56, 1985.

NADER FILHO, A., SCHOCKEN-ITURRINO, R. P., ROSSI JÚNIOR, O. D., AMARAL, L. A. Sensibilidade dos *Staphylococcus aureus*, isolados em casos de mastite bovina, à ação de antibióticos e quimioterápicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 38, n.4, p. 581-588, 1986.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; AMARAL, L.A.; ROSSI JUNIOR, O.D.; OLIVEIRA, R.P. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.74, n.1, p.1-4, jan./mar., 2007

NASCIMENTO, G.G.F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M.S.P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Revista de Nutrição**, Campinas, 14(2): 119-124, maio/ago., 2001

NASCIMENTO, M.S.; SOUZA, P.A. Estudo da correlação linear entre a contagem padrão em placa, a contagem de psicotróficos e a prova de redutase em leite cru refrigerado. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.97, p.81-86, 2002.

NASCIMENTO, I. R.; MACHADO, D. B.; MELO, C. B.; MENEZES, I. C. Avaliação da qualidade da matéria-prima destinada a produção de derivados de leite- Estado de Sergipe. . In: XX Congresso Nacional de Laticínios, 2003, Juiz de Fora. XX Congresso Nacional de Laticínios. Publicado nos Anais do XX Congresso Nacional de Laticínios - **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora : Templo, v. 58. p. 216-219. 2003.

NASCIMENTO, E. S.; DENOBILE, M.; ESTEBAN, C.; OLIVEIRA, M. W. M. Resíduos de Antibióticos em alimentos no Brasil e potenciais riscos à saúde humana. **ILSI Brasil Notícias**. A n o 16, Nº1, janeiro a março d e 2008.

NATIONAL Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved Standards M2-A6. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 4.ed. **Approved Standards**. NCCLS, Villanova, Pa., 2000.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Current concepts of bovine mastitis**. 4.ed. Madison NMC. 64p. 1996.

NEIVA, R. **EMBRAPA CNPGL**,. 2008 Disponível em <http://www.cnpgl.embrapa.br/nova/sala/noticias/jornaldoleite.php?id=413>. Acesso em 10/07/2009.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; FRANCO, B. D. G. M. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**., Campinas, 27(2): 787-792, abr.-jul. 2007

NICKERSON, S.C. Bovine mammary gland: structure and function; relationship to milk production and immunity to mastitis. **Agri-practice**, 15: 11-8, 1994.

NOAL, R. M. C. Ações de melhoria contínua para incrementar a qualidade e produtividade da cadeia do leite. 2006. 95p **Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção, Qualidade e Produtividade)**. Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RJ, 2006.

NUNES, M. T.; D`ANGELINO, J. L. . Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite, em fazendas produtoras e no leite pronto para consumo. **Revista Higiene Alimentar**. v.21, p. 57-61, mar., 2007.

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.

OLIVEIRA, J. S.; PARMELEE, C. E. Rapid enumeration of psychrotrophic bacteria in raw and pasteurized milk. **Journal of Milk and Food Technology**. v. 39, n. 4, p. 269-272, 1976.

OLIVEIRA, C. A. F.; FONSECA, L. F. L.; GERMANO, P. M. L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.62, p.10-16, 1999.

OLIVEIRA, A.A.F.; M OTA, 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, M. W. M. Avaliação de resíduos de oxitetraciclina em leite de vacas com dermatite digital papilomatosa tratadas pelas vias intramuscular e dérmica. São Paulo, 2006. 84p. **Dissertação de Mestrado** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

OSTRENSKY, A. Efeitos de ambiente sobre a contagem de células somáticas no leite de vacas da raça Holandesa no Paraná. Curitiba, 1999. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)** – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. 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.; NICKERSON, S.C.; WASHBURN, P.J. et al. Antibiotic therapy of intramammary infections in bred dairy heifers. **Louisiana Agricultural.**, v.37, p.20- 23, 1994.

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.

PEREIRA, F. C., A importância da contagem de células somáticas na qualidade do leite e derivados. **Dissertação (Pós Graduação Lato Sensu em Ciência dos Alimentos)** UFLA – Lavras – MG, 2005.

PHILPOT, W. N. Economics of mastitis control. Symposium on mastitis. Veterinary Clinics of North America.: *Large Animal Practice*, v. 6, n. 2, p. 233-245, 1984.

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

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. Vencendo a Luta Contra a Mastite. Piracicaba: **Westfalia Landtechnik do Brasil**, 192p, 2002.

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, Jí-Paraná. Resumos/ III Salão de Iniciação Científica, 2005.

POUBEL, I.T; CUNHA, C.M.M.; PEREIRA, I.A.; SOUZA, M.M.S. Avaliação genotípica e do perfil de suscetibilidade da resistência à tetraciclina por *Streptococcus agalactiae* isolados de amostras clínicas de bovinos na região sul do Rio de Janeiro. In **anais do Congresso brasileiro de medicina veterinária**, 2008. Disponível em: <http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R1261-2.pdf>

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

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

RABELLO, R. F. Susceptibilidade aos antimicrobianos e diversidade genética de amostras de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* isoladas de casos de mastite subclínica no Estado do Rio de Janeiro. **Dissertação (Mestrado em Ciências Microbiológicas)** – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 100p., 2003.

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

RAIA JUNIOR, R.B. Influência da mastite na ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite. **Dissertação de Mestrado** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo. 78p. 2001.

RATNAKUMAR, A.V.; HAMZA, P.A.; CHOUDHURI, P.C. Treatment of subclinical mastitis in early lactation. **Indian Veterinary Journal.**, v.73, p.970-972, 1996

REIS, G.L.; ALVES, A.A.; LANA, A.M.Q.; COELHO, S.G.; DE SOUZA, M.R.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; PENNA, C.F.A.M.; MENDES, E.D.M. Procedures of individual raw milk sampling and their influence on physico-chemical composition and somatic cell count. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, 2007.

RENEAU, J.K.; PACKARD, V.S. Monitoring mastitis, milk quality and economic losses in dairy fields. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, 11: 4-11, 1991.

REYES, J. F.; URDANETA, A. G.; IZQUIERDO CORSER, CORSER, P.I.; CAGNASSO, M.A.; LEAL, K.V. **Aislamiento de bacterias gram positivas de leche cruda con residuos de antimicrobianos**. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, v.52, n.1, p.68-73, 2002. Disponible em: http://www.alanrevista.org/ediciones/2002-1/aislamiento_bacterias_gram_positivas_leche_cruda_residuos_de_antimicrobianos.asp. Acesso em 13 de agosto de 2009.

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.

RIBAS, N.P.; PAULA, M.C.; ANDRADE, U.V.C. Contagem e escore de células somáticas em amostras de leite de tanques nos Estados de Santa Catarina, Paraná e São Paulo. In:

BRITO, J.R.F.; PORTUGAL, J.A.B. *Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos.* Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite; Epamig/CT/ILCT, p.27-38. 2003.

RIBEIRO, M. E. R.; PETRINI, L. A.; AITA, M. F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF JR, 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 JR, 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.

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.

ROGICK, F.A., Produção higiênica do leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 37, n. 221, p.35-38, 1982.

ROSARIO, T.R. Avaliação da presença de resíduos de antibióticos no leite comercializado no município de Pirassununga, São Paulo. **Dissertação de Mestrado**– Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP, Pirassununga. 89f. 2002.

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

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.D; CUNHA, M.L.R.S; ELIAS, A.O.; VITÓRIA, C; LANGONI, H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. [online]. V. 41, n. 5, pp. 321-326, 2004.

SABOUR, P.M.; GILL, J.J.; LEPP, D. et al. Molecular Typing and Distribution of *Staphylococcus aureus* Isolates in Eastern Canadian Dairy Herds. **Journal of Clinical Microbiology**., v.42, p.3449-3455, 2004.

SANTANA, E. H. W. Contaminação do leite por microrganismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos e psicrotróficos proteolíticos em diferentes pontos do processo de produção leiteira. 1v. 78p. **Tese de Mestrado**. Universidade Estadual de Londrina – Ciência Animal. nov, 2001.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. Importância e efeito de bactérias psicrotóxicas sobre a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n.82, p.13-19, 2001.

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. **Biossegurança aplicada ao controle da mastite**. Revista Balde Branco. São Paulo, v 463, p 62-65 01 de maio de 2003. Disponível em <www.mastiteonline.com.br/download/trabalhos_tecnicos/conceitos_de_bio_seguranca_b_branco_2003.pdf> - Resultado Adicional> acesso 30/09/06.

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

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.

SCHULTZ, L.H. Somatic cell in milk-physiological aspects and relationship to amount and composition of milk. **Journal of Food Protection** 40: 125, 1997.

SENA, M. J. Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de *Staphylococcus* sp. isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE. 2000, 75 p, **Tese (Doutorado)** - Escola Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

SENYR GF, DAVIDSON JH, BROW JM, HALLTEAD EP, SHERBON JW. Comparison of rapid test used to detect antibiotic residues in milk. **Journal of Food Protection**. v.53, n.2, p.158-164, 1990

SILVA, D.M. Mastite prevenir ou remediar? **Revista Batavo**, v. 8, n. 53, p. 8-11, 1996.

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, W.O., GROOTENBOER, C.S. **Sugestão de plano de análise de perigos e de pontos críticos de controle na produção de iogurte**. PUBVET, Londrina, v.2, n.33, 2008. Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/texto.php?id=315>>. Acesso em: 08 de julho de 2009.

SISCHO, W.M. Quality milk and test for antibiotic residues. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.6, p.1065-1073, 1996.

SMITH, K. L.; HOGAN, J. S. Epidemology of mastitis and physiopathology. In: Panamerican Congress on Mastitis Control and Milk Quality, 23 a 27 de março de 1998. **Proceedings...** p.100-113, Yucatan, México. 1998.

SOUZA, V. Características físico-químicas, microbiológicas, celulares e detecção de resíduos de antibióticos em amostras de leite de tanque comunitário. **Dissertação (mestrado)**. 2006.

69p. UNESP, Campus de Jaboticabal, Mestrado em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva). 2006.

SPINOSA H. S.; GÓRNIAC, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 361-432. 1999.

STEINBERGER, A. Empfindlichkeitsprüfung von euterpathogenen coliformen Keimen gegenüber BAY VP 2674 - Baytril und Gentamicin. Munchen, 1986. Inaugural Dissertation (**Doctor Medicinae Veterinariae**) - Tierärztliche Facultat, Ludwig Maximilians Universität, 1986.

SUHREN, G. e REICHMUTH, J. Interpretation of quantitative microbiological results. **Milchwissenschaft**. v.55, p.18-22, 2000.

TAVARES, W. Manual **de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. Rio de Janeiro: Atheneu. p.585-96. 1990.

TAVARES, W. Bactérias gram positivas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, n.3, p.281-301, 2000.

TETZNER, T.A.D., BENEDETTI, E., GUIMARÃES, E.C., PERES, R. F. G. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.19, n.130, p. 69-72, 2005.

TRINIDAD, P.; NICKERSON, P.C.; ALLEY, T.K. Prevalence of intramammary infection and teat canal colonization in unbred and primigravid dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, n.73, p.107, 1990.

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

TYLER, J.W.; WILSON, R.C.; DOWLING, P. Treatment of subclinical mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.8, p.17-27, 1992

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC. EQA http://www.enq.ufsc.br/disci/eqa5216/material_didatico/Roteiro_aula_pratica.doc Acesso em: 08 de agosto de 2009.

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

VARGAS, A. C., LAZZARI, A., DUTRA, V., WEISS, L. H. N., FERREIRA, G. L., FLORES, L. A. S. Agentes infecciosos mais prevalentes em mastite bovina na região de Santa Maria, RS – Perfil de sensibilidade in vitro. **In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA**, 24., 1996, Goiânia: Anais... Goiânia: Sociedade Goiana de Medicina Veterinária, 251 p., p. 119, 1996.

VASCONCELLOS, P. M. B. **Guia prático para o inseminador e Ordenhador**. . São Paulo: Nobel, 179p., 1990.

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

WANDECK, F. A.; BARROS, G. C.; MATTOS NETO, P. J. ; SILVA, C. A. B. . **Análises do leite e derivados**. 1ª. ed. Itaguaí - Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, v. 01. 147 p., 1977.

WATANABE, E.T.; RIBEIRO, A.R.; SILVA, J.B.; GARINO JUNIOR, F.; COSTA, E.O. Avaliação in vitro e in vivo da eficiência dos antimicrobianos no tratamento de casos de mastite clínica bovina. **Revista Napgama**, v.4, n.1, p.9- 14, 2001

WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.16, p.41-46, 1998.

WITTEWER, F., Diagnóstico dos desequilíbrios metabólicos de energia em rebanhos bovinos. **In: González, F. H. D., Barcellos, J.O., Ospina, H., Ribeiro, L. A. O.** Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre, Brasil, Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

7 ANEXO

Anexo 1: Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos enrofloxacina (EN), amoxicilina (AM) (A = Enrocilin L), gentamicina (GE) (B = Gentocin® mastite 250mg), cefoperazone (CF) (C = Cefavet), bacitracina (BA), neomicina (NE) e tetraciclina (TE) (D = Mastijet Forte®) pelo Tempo de Redução do Azul de Metileno (TRAM) do leite total e antibiograma (ATB) e coincidência entre os testes.

	ANTIBIOGRAMA							TRAM							ATB X TRAM			
	A		B	C	D			A		B	C	D			A	B	C	D
	EN	AM	GE	CF	NE	BA	TE	EN	AM	GE	CF	NE	BA	TE				
1	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	I	S	S	S	+	+	+	+
2	S	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	+	+	-
3	S	S	S	S	I	R	S	S	S	I	I	S	S	S	+	+	+	+
4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	+	+	+
5	S	S	S	S	S	S	I	I	I	I	I	I	I	I	+	+	+	+
6	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	-
7	R	R	R	R	R	R	R	I	I	I	R	I	I	I	-	-	+	-
8	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	+	+	+	+
9	S	S	S	I	R	R	R	I	I	I	R	I	I	I	+	+	+	-
10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	+	+	+
11	R	R	R	S	S	R	S	I	I	I	R	I	I	I	-	-	+	+
12	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	+	-	+	+
13	I	I	S	S	I	S	S	I	I	I	I	I	I	I	+	+	+	+
14	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	+	+	+	+
15	S	S	S	S	S	S	S	I	I	I	R	I	I	I	+	+	-	+
16	S	S	S	S	I	I	R	S	S	S	S	S	S	S	+	+	+	+
17	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	+	+	+
18	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	+	+	+	+
19	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	+	+	+
20	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	+	+	+
21	S	R	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	+	+	+	+
22	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	+	+	+
23	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	+	+	+
24	S	I	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	+	+	+	+
25	R	S	R	S	I	I	S	I	I	I	R	I	I	I	+	-	-	+
26	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	+	+	+
27	S	S	S	I	R	R	R	I	I	I	I	I	I	I	+	+	+	-
28	S	R	S	I	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	+	+	+	+
29	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	+	+	+
30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	+	+	+
31	S	S	S	S	I	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	+	+	+
32	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	+	+	+
33	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	+	+	+	+
34	S	S	S	I	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	+	+	+	-