

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

**DISSERTAÇÃO**

**QUALIDADE DO LEITE, MASTITE E SENSIBILIDADE A  
ANTIMICROBIANOS EM UNIDADES DE PRODUÇÃO DE LEITE  
COM ALTAS CONTAGENS DE CÉLULAS SOMÁTICAS**

**Paula Suzana Elisa Maciel Poll**

**2012**



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

**QUALIDADE DO LEITE, MASTITE E SENSIBILIDADE A  
ANTIMICROBIANOS EM UNIDADES DE PRODUÇÃO DE LEITE  
COM ALTAS CONTAGENS DE CÉLULAS SOMÁTICAS**

**PAULA SUZANA ELISA MACIEL POLL**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Rita de Cássia Campbell Machado Botteon**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ

Setembro de 2012

636.2089819

P771q

T

Poll, Paula Suzana Elisa Maciel, 1983-  
Qualidade do leite, mastite e  
sensibilidade a antimicrobianos em unidades  
de produção de leite com altas contagens de  
células somáticas / Paula Suzana Elisa  
Maciel Poll - 2012.  
87 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. 54-82.

1. Bovino de leite - Doenças - Teses. 2.  
Mastite - Teses. 3. Leite - Análise -  
Teses. 4. Leite - Qualidade - Teses. 5.  
Bactérias - Teses. 6. Drogas - Resistência  
em microorganismos - Teses. I. Botteon,  
Rita de Cássia Campbell Machado, 1964-. 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  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**PAULA SUZANA ELISA MACIEL POLL**

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 04/09/2012.

---

Rita de Cássia Campbell Machado Botteon, Dra, UFRRJ  
(Orientadora)

---

Maria Helena Cosendey de Aquino, Dra, UFF

---

Teresinha Ferreira, Dra, UFF

---

Sandra Maria Gomes Thomé, Dra, UFRRJ

Dedico à minha mãe;

E a todos os colegas da Pós-graduação, que entram nesta selva, em uma luta volátil diária combatendo leões.

## AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos é a textualização mais sincera dentro da dissertação, é agora que o escritor tenta demonstrar a humanização e problematização de dois anos de trabalho, com muitos erros, alguns poucos acertos, desencontros, discussões e alegrias. E tentar demonstrar a importância dos colegas, amigos, confidentes e familiares não somente neste momento, mas sim em toda a nossa existência.

Início agradecendo aos que me educaram, com muito amor, dedicação e apoio, mas recheado também de alguns puxões de orelha e castigos, à minha mãe Linda, ao meu pai Poll, à Celeuma e à minha irmã Suzana que não somente é uma amiga, como é o meu orgulho. Amo vocês.

Continuo, agradecendo, aos companheiros da lida diária, muitos deles são hoje meus amigos. Muitos deles participaram daqueles momentos de frustração e de alegria, sem contar os pequenos deslizes que acontecem no decorrer do percurso, e são a eles que recorreremos aos amigos. Tenho uma longa lista pra citar, no entanto espero não esquecer ninguém, e já peço perdão caso isso ocorra.

Começando pelo início é sempre um bom negócio, e como não fazer isso sem lembrar-se dos meninos da Anatomia. Posso citar com o maior orgulho essa turminha, são eles: Marcelo Antunes, Anderson, Wesley Barbosa e Prof. Paulo Scherer. Eles foram o motivo da minha propulsão da Residência em Patologia Veterinária para o mestrado. Eu era uma gaúcha formada em Brasília e completamente perdida em terreno fluminense. Eles sempre dispostos e motivados a ajudar durante toda a minha permanência aqui, seja para arrumar o carro que sempre está bambo, para beber ou para ajudar em algum pepino que eu me metia, e que não eram poucos.

À família Botteon, nela inclui umas pessoas muito especiais que aguentam um batente sempre com sorriso no rosto: Renata Lanna, Luana Vilela, Janne Paula, Ana Paula Lopes, Manuel Badaró, Diego e Bruno B2, As coletas de material foram muito loucas, durante as madrugadas, em locais muito distantes, mas sempre uma nova e divertida aventura.

Por falar em aventura, o curso todo do mestrado poderia se resumir desta forma. Nela algumas pessoas foram importantes nesse trânsito entre os diversos temas pela qual passei, que variaram entre resistência a antibióticos, imunidade, metabolismo oxidativo, etc. E para que isso acontecesse foi vital a ajuda deles: Prof. Carlos Henrique, Profa. Ângela Oliveira, Prof. Francisco Baroni, Amanda Wardini, Aline Bernardo, e principalmente a Profa. Maria das Graças Miranda, ela que muitas vezes me dava bronca, mas também sentava comigo para avaliar e questionar a metodologia e execução. Uma pessoa extraordinária com quem eu tive o prazer de trabalhar.

Não poderia esquecer o alojamento da pós-graduação da UFRRJ, minha moradia por quase três anos. Únicos. Muita história poderia ser citada com altos e baixos, como tudo na vida. Eram as conversas na cozinha e desavenças nas reuniões extraordinárias, mas de lá eu vou lembrar com muito carinho e para sempre das amizades que conquistei: Tatiana Pires, Franciny Marota, Laís Alves, Fernanda Gandini, Natália Coelho, Osvanira Alves, Eduardo Lucas e Elizabeth dos Santos. E dos meus amores: Daniela Felix, Luciana Assis, Erica Bertha

e Geórgia. Foram momentos de choro, risos e segredos divididos naquelas paredes grossas, nossas decepções e medos que somente entre nós tinha sentido. Nos abraçávamos diversas vezes, numa tentativa de ajudar uma à outra, na busca por entender um mundo às vezes duro, mas doce enquanto estivermos juntas.

Assim, finalizo agradecendo à banca pela atenção e disponibilidade. À orientadora Rita Botteon, por tornar este trabalho possível, agradeço aos professores, ao coordenador, às secretárias Lorena e Regina pelo auxílio e paciência. Vocês são responsáveis pelos sucessos de cada um dos alunos, e fazem isso com incrível desenvoltura. Eu os parabenizo pela excelência no trabalho.

## RESUMO

POLL, P.S.E.M. **Qualidade do leite, mastite e sensibilidade a antimicrobianos em unidades de produção de leite com altas contagens de células somáticas.** 2012. 102p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Considerando a complexidade de fatores relacionados à qualidade do leite e controle da mastite, objetivou-se avaliar a dinâmica da infecção mamária e o perfil de sensibilidade dos agentes isolados do leite refrigerado em relação aos índices de mastite e sua etiologia em seis unidades de produção leiteira (UPL) com altas contagens de células somáticas (CCS). Em três visitas com intervalos de 20 dias foi realizado um levantamento dos casos de mastite e amostras de leite de quartos mamários afetados com mastite clínica foram destinadas ao isolamento, identificação e testes de sensibilidade. Amostras de leite do conjunto coletadas do tanque de expansão foram avaliadas quanto à composição, CCS, contagem bacteriana total (CBT), resíduos de antibióticos, estabilidade ao etanol, isolamento e identificação de agentes microbianos e sensibilidade *in vitro*. Entre as propriedades avaliadas a incidência de mastite clínica variou entre 0 e 24%, enquanto que a prevalência oscilou entre 2,9% e 36%. A partir de 83 quartos mamários acometidos isolaram-se 107 agentes bacterianos em 74 amostras. Fungos foram isolados de 27 amostras. Os principais agentes bacterianos isolados de amostras de leite de vacas com mastite foram *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli*. Também foram relevantes os isolamentos de *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas* spp. Estes agentes bacterianos isolados, tanto dos tanques de refrigeração quanto dos casos de mastite, foram condizentes entre si. No entanto houve uma moderada divergência entre a sensibilidade *in vitro* de amostras isoladas de leite de vacas com mastite clínica e do leite do tanque. Os antimicrobianos que apresentaram melhor resultado quanto à sensibilidade dos casos de mastite foram: enrofloxacina e doxiciclina (100%), seguidos da cefalotina (99,1%); e os isolados do tanque apresentaram: danofloxacina (100%), enrofloxacina (85,2%) e gentamicina (74,1%). As formulações com maior resistência frente aos isolados dos casos de mastite foram penicilina G associada à novobiocina (53,3%), amoxicilina (49,5%) e ampicilina (42,1%); e frente aos isolados do tanque as maiores resistências foram observadas para ampicilina (74,1%), oxacilina (74,1%) e amoxicilina (66,7%). A presença de múltiplas resistências pode estar relacionada ao uso indiscriminado de antibióticos para tratamento de enfermidades diversas, incluindo a mastite.

Palavras-chave: gado leiteiro, mastite bovina, agentes etiológicos e resistência bacteriana.



## ABSTRACT

POLL, P.S.E.M. **Quality of milk, mastitis and antimicrobial susceptibility on units of milk production with high somatic cell counts.** 2012. 102p. Dissertation (Magister of Science in Veterinary Medicine). Institute of Veterinary, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Considering the complexity of related factors to milk quality and mastitis control, it was aimed to evaluate the dynamic of breast infection and the sensitivity profile of the isolated agents from refrigerated milk in relation to mastitis index and their etiology on six units of Milk Production (UMP) with high level of Somatic Cell Counts (SCC). During three visits between a 20 days interval were conducted an assessment of clinic mastitis cases and milk samples of those infections were collected to isolation, identification and sensitivity trials. The totalities of each herd were represented by some samples of milk cooling tanks to different analysis: milk composition, somatic cell counts, total bacterial count, antibiotic residues, stability to ethanol, isolation microbial agents' identification and *in vitro* susceptibility. Between all the proprieties studied the incidence of the mastitis clinic was 0 to 24%, whereas the prevalence was 2,9% to 36%. Among 83 mastitis mammary quarters were isolate 107 bacterial agents in 74 samples and the isolation of fungus came from 27 samples. The main bacterial agents isolated were *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli*. Others bacterial also showed a significant isolates were *Klebsiella* spp. and *Pseudomonas* spp. The bacterial agents isolated from milk cooling tanks were consistent with the bacterial agents isolated from mastitis cases. However it was a soft divergence between the sensitivity of the milk from affected cows and the milk cooling tanks. Antimicrobial with major *in vitro* susceptibility from bacterial agents from mastitis cows was enrofloxacin and doxycycline (100%), followed by cefalotin (99,1%); and the isolation from the tanks were: danofloxacin (100%), enrofloxacin (85,2%) and gentamicin (74,1%). The Formulations with higher resistance front to isolated from the mastitis cases was penicillin G associated with novobiocin (53,3%), amoxicillin (49,5%) and ampicillin(42,1%) and compared to isolated from tanks the higher resistances were ampicillin (74,1%), oxacillin (74,1%) and amoxicillin (66,7%). Presence of multiples resistances could be related to indiscriminate use of antibiotics for the treatment of various diseases including mastitis.

Keywords: dairy cattle, bovine mastitis, etiologic agents and bacterial resistance.

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 01:</b> Limites Máximos de Resíduos (LMR) de antimicrobianos permitidos por quilograma de leite no Brasil, Canadá, União Europeia (UE) e Estados Unidos (EUA).....	<b>16</b>
<b>TABELA 02:</b> Composição centesimal de amostras de leite de tanques de expansão individuais de 18 unidades de produção na zona rural do Município de Resende, RJ em maio de 2011. ....	<b>26</b>
<b>TABELA 03:</b> Contagem de Células Somáticas (CCS) e Contagem Bacteriana Total (CBT) em amostras de leite de tanques de expansão individuais de 18 unidades de produção na zona rural do Município de Resende, RJ em maio de 2011. ....	<b>27</b>
<b>TABELA 04:</b> Índices de mastite clínica em seis rebanhos no município de Resende, RJ em abril, maio e junho 2012 em relação ao número (média) de vacas em lactação e caracterização da infecção. ....	<b>31</b>
<b>TABELA 05:</b> Agentes bacterianos (números absolutos e porcentagem) isolados de 62 casos de mastite clínica, em seis rebanhos no Município de Resende, RJ, em abril e maio de 2012. ....	<b>33</b>
<b>TABELA 06A:</b> Sensibilidade <i>in vitro</i> das bactérias isoladas de 62 casos de mastite clínica em seis rebanhos no Município de Resende, RJ, entre abril e junho de 2012.....	<b>37</b>
<b>TABELA 06B:</b> Sensibilidade <i>in vitro</i> das bactérias isoladas de 62 casos de mastite clínica em seis rebanhos no Município de Resende, RJ, entre abril e junho de 2012.....	<b>38</b>
<b>TABELA 07:</b> Perfil de sensibilidade de 107 agentes bacterianos (números absolutos e porcentagens) isolados de 83 amostras de leite de 62 casos de mastite clínica em seis rebanhos no Município de Resende, RJ entre abril e junho de 2012. ....	<b>39</b>
<b>TABELA 08:</b> Composição centesimal de amostras de leite de tanques de expansão individuais de seis unidades de produção no Município de Resende, RJ em abril, maio e junho de 2012. ....	<b>41</b>
<b>TABELA 09:</b> Contagem de Células Somáticas (CCS) e Contagem Bacteriana Total (CBT) em amostras de leite de tanques de expansão individuais de seis unidades de produção no Município de Resende, RJ em abril e maio de 2012. ....	<b>42</b>
<b>TABELA 10A:</b> Sensibilidade <i>in vitro</i> a antimicrobianos, dos agentes isolados em amostras de leite de tanque de expansão individuais em seis Unidades de Produção (UPL) no Município de Resende, RJ em abril, maio e junho de 2012.....	<b>48</b>
<b>TABELA 10B:</b> Sensibilidade <i>in vitro</i> a antimicrobianos, dos agentes isolados em amostras de leite de tanque de expansão individuais em seis Unidades de Produção (UPL) no Município de Resende, RJ em abril, maio e junho de 2012.....	<b>48</b>
<b>TABELA 11:</b> Perfil de sensibilidade e resistência dos agentes bacterianos (números absolutos e porcentagens) isolados em amostras de leite de tanque de expansão individuais em seis Unidades de Produção (UPL) no Município de Resende, RJ em abril, maio e junho de 2012. ....	<b>49</b>
<b>TABELA 12:</b> Sensibilidade de agentes bacterianos isolados em amostras de leite de tanque de expansão e de 62 casos de mastite em seis propriedades, no Município de Resende, RJ em	

abril, maio e junho de 2012, e princípios ativos contidos nos antimastíticos disponíveis no comércio e usados nas propriedades em estudo. ....52

## LISTA DE QUADROS

- QUADRO 01:** Relação entre contagem de células somáticas (CCS) em amostras de leite composta de tanques de refrigeração, perda de produção (%) e prevalência de mastite subclínica no rebanho. .... **12**
- QUADRO 02:** Agentes fúngicos isolados de 83 amostras de leite de vacas com mastite clínica, em seis rebanhos no Município de Resende, RJ, em abril, maio e junho de 2012. .... **36**
- QUADRO 03:** Isolamento de fungos e leveduras em amostras de leite de tanque de expansão individuais em seis unidades de produção na zona rural do Município de Resende, RJ em abril, maio e junho de 2012. .... **44**
- QUADRO 04:** Isolamento de bactérias em amostras de leite de tanque de expansão individuais em seis unidades no Município de Resende, RJ em abril, maio e junho de 2012. **45**

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Centígrados
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	Ágar infusão de cérebro e coração
CBT	Contagem Bacteriana Total
CCS	Contagem de Células Somáticas
CCSArit	Média aritmética da CCS individual de todas as vacas em lactação
CCSProd	Resultado da media da produção leiteira diária de cada vaca vezes a CCS individual do animal
CCSTanque	Correlação entre os índices de CCS
cels/mL	Células por mililitro
cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrados
CMT	California Mastitis Test
CNF	Citotóxico
CPP	Contagem Padrão em Placa
DMIV	Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECN	Estafilococos Coagulase Negativos
ECP	Estafilococos Coagulase Positivos
ESALQ – USP	Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz - Universidade de São Paulo.
ESD	Extrato Seco Desengordurado
et al.	E outros, do latim “ <i>et alli</i> ”
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramma
GO	Goiás
IDF	International Dairy Federation
IN	Instrução Normativa
IV	Instituto de Veterinária
kg	Quilograma
LMR	Limites Máximos de Resíduos de Antimicrobianos
LPS	Estruturas Lipopolissacarídicas
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimentos
mcg	Micrograma
mg	Miligrama
MG	Minas Gerais
mil/mL	Mil células por mililitro

mm	Milímetros
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMN	Células Polimorfonucleares
PNCRB	Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal
ppb	Partes por bilhão
R\$	Real
RBQL	Rede Brasileira de Qualidade do Leite
RJ	Rio de Janeiro
SEDEX	Serviço de Encomenda Expressa da Empresa Brasileira de Correios e Telégrafos
SILA	Síndrome do leite anormal
SP	São Paulo
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UHT	Ultra High Temperature
UPL	Unidades de Produção de Leite

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>2</b>
2.1. Qualidade do Leite.....	2
2.1.1. Legislação .....	2
2.1.2. Características e composição .....	3
2.1.3. Microrganismos do Leite .....	3
2.2. Mastite .....	3
2.2.1. Definição e conceitos .....	3
2.2.2. Classificação e Formas de Apresentação .....	4
2.2.3. Importância .....	4
2.2.4. Etiologia.....	5
<i>Staphylococcus</i> spp. ....	7
<i>Streptococcus</i> spp.....	8
<i>Corynebacterium</i> spp. ....	9
<i>Escherichia coli</i> .....	9
2.2.5. Patogenia.....	9
2.2.6 Diagnóstico .....	11
2.2.7 Controle e Profilaxia .....	13
2.2.8 Tratamento .....	14
2.3. Resíduos de antibióticos no leite .....	15
2.4. Resistência bacteriana.....	18
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
3.1. Local e amostragem.....	21
3.2. Critérios de seleção - Adequação aos critérios de qualidade.....	21
3.4. Mastite: Ocorrência e Etiologia.....	22
3.5. Leite cru refrigerado .....	22
3.5.1. Composição, CCS, CBT, resíduo de antibióticos e estabilidade.....	22
3.6. Isolamento e Identificação de Agentes Microbianos.....	23
3.7. Testes de sensibilidade <i>in vitro</i> .....	24
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>26</b>
4.1. Leite cru refrigerado – Caracterização das Propriedades .....	26

4.1.1. Composição .....	26
4.1.2. Parâmetros de qualidade .....	27
4.1.3. Resíduos de antibióticos .....	28
4.2. Aspectos da Produção.....	29
4.3. Mastite .....	31
4.3.1. Ocorrência.....	31
4.3.2. Etiologia.....	33
4.3.3. Perfil de sensibilidade de agentes bacterianos associados à mastite clínica.....	37
4.4. Leite cru refrigerado .....	41
4.4.1. Composição .....	41
4.4.2. Parâmetros de qualidade .....	41
4.4.3. Agentes microbianos isolados .....	44
4.4.4. Sensibilidade <i>in vitro</i> .....	47
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>53</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>823</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A busca pela qualidade tem mudado o nível de tecnologia nas unidades de produção, promovendo incremento no uso de ordenhadeiras mecânicas e tanques de refrigeração individuais. A indústria mudou o perfil da coleta de leite, adotando a granelização, e o uso de critérios como CBT e CCS que já são realidades em muitos programas de pagamento por qualidade do leite nas indústrias brasileiras. Apesar dos avanços evidentes, aspectos associados à qualidade do produto ainda representam desafios a serem superados. A grande limitação da qualidade do leite produzido no Brasil ainda é a elevada carga microbiana e a alta contagem de células somáticas.

Apesar de destacados avanços recentes em produtividade e qualidade, o leite produzido em várias regiões do Brasil, ainda possui baixa qualidade, derivada de práticas inadequadas na obtenção, conservação e transporte. As inadequadas condições de higiene de ordenha, as deficiências nos procedimentos de limpeza de equipamentos e utensílios e os problemas ligados ao resfriamento do leite estão entre as mais importantes causas da baixa qualidade do leite, destacando-se como uma das principais limitações para adequação aos critérios de qualidade exigidos pela IN 62/2011 em substituição a 51/2002.

A mastite bovina é uma doença multifatorial, de etiologia complexa e variada, e se encontra disseminada em todas as regiões produtoras de leite. A mastite de qualquer forma reduz a intensidade da produção e causa modificações na composição do leite, que compromete sua qualidade, tornando-o inadequado para a indústria e consumo. O risco de veiculação de microrganismos patogênicos e/ou toxinas e a presença de resíduos de antibióticos no leite destinado ao consumo humano reforçam a importância das mastites e suas implicações em Saúde Pública. O tratamento dos animais infectados constitui o maior problema da pecuária leiteira, sobretudo, pela possibilidade de desenvolvimento de resistência em bactérias potencialmente patogênicas.

Considerando a complexidade de fatores relacionados à qualidade do leite e controle da mastite, objetivou-se com este trabalho avaliar a dinâmica da infecção mamária e o perfil de sensibilidade dos agentes ambientais e patogênicos isolados do leite cru refrigerado em relação aos índices de mastite e sua etiologia em unidades de produção de leite com altas contagens de células somáticas, bem como a presença de resíduo de antibióticos no leite cru refrigerado.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Qualidade do Leite

#### 2.1.1. Legislação

Na última década todo o sistema de produção de leite no Brasil passou por um processo de atualização visando adequação às exigências de qualidade do mercado interno e externo. A Instrução Normativa 51 (IN 51) editada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e implantada em julho de 2005 estabeleceu os requisitos mínimos para produção, identidade e qualidade de leites A, B, e C pasteurizado e cru refrigerado, além de regulamentar a coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel (BRASIL, 2002).

Dentre as suas principais características, a IN 51/2002 (BRASIL, 2002) estabelece limites para a contagem de células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT), critérios de composição, determina o resfriamento obrigatório do leite na fazenda, além de prever medidas específicas de controle e profilaxia da mastite (BEM; FABRINI, 2005).

Além dos critérios de higiene e saúde da glândula mamária, a IN 51/2002 (BRASIL, 2002) estabelece que nenhum tipo de aditivo ou coadjuvante pode ser admitido, da mesma forma que resíduos de antibióticos e de outros agentes inibidores do crescimento microbiano devem estar ausentes.

Foi previsto um calendário para a progressiva adaptação de produtores e laticínios às novas exigências de qualidade que se estendeu de 2005 a 2011 para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, e de 2005 a 2012 para as regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2002).

Diante das dificuldades de adaptação às novas regras, o MAPA prorrogou por seis meses a próxima etapa da IN 51/2002 (BRASIL, 2002), que entraria em vigor em 1º de julho de 2011. Nessa etapa, o limite de CBT, que atualmente é de 750 mil UFC/mL baixaria para 100 mil UFC/mL e para a CCS, a nova exigência seria 400 mil cels/mL. Novamente em 2011 o Ministério da Agricultura por meio da Instrução Normativa nº 62 (IN 62/2011) (BRASIL, 2011) modificou os prazos e limites para adequação da CBT (UFC/mL) e da CCS (cels/mL), as quais passam a ter como limite máximo 600 mil cel/mL, em vez de 750 mil/mL, para os produtores das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste a partir de 1º de janeiro de 2012, e para os do Norte e Nordeste em janeiro de 2013.

A IN 62 (BRASIL, 2011) propõe que a exigência para adequação aos critérios de qualidade seja progressiva, dos atuais 600 mil para 100 mil UFC/mL para CBT e 400 mil cels/mL para CCS, chegando assim até 2016 às metas propostas pela IN 51 para 2011 (BRASIL, 2002), que se mostraram inviáveis na prática devido à discrepância da realidade dos produtores brasileiros.

A busca pela qualidade tem mudado o nível de tecnologia nas unidades de produção, promovendo incremento no uso de ordenhadeiras mecânicas e tanques de refrigeração individuais. A indústria mudou o perfil da coleta de leite, adotando a granelização, e o uso de critérios como CBT e CCS que já são realidades em muitos programas de pagamento por qualidade do leite nas indústrias brasileiras. Apesar dos avanços evidentes, aspectos associados à qualidade do produto ainda representam desafios a serem superados. A grande limitação da qualidade do leite produzido no Brasil ainda é a elevada carga microbiana e a alta contagem de células somáticas.

### **2.1.2. Características e composição**

Rico em proteínas, energia e minerais, o leite é um dos alimentos mais completos. 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). Os constituintes secundários englobam basicamente minerais e as vitaminas A, D, E e K (GONZÁLEZ; DÜRR; FONTANELI, 2001; GONZÁLEZ; CAMPOS, 2003).

O leite destinado ao consumo humano deve ter as seguintes características: propriedades de sabor, cor, odor e viscosidade preservadas; livre de sujeiras, microrganismos e resíduos; composição correta e conservação adequada, e que não cause riscos ou danos à saúde do consumidor (BRASIL, 1999). 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 (MAKOVEC; RUEGG, 2002; PHILPOT; NICKERSON, 2002).

### **2.1.3. Microrganismos do Leite**

O leite ao ser sintetizado e secretado nos alvéolos da glândula mamária de animais hígidos é estéril, mas assim que este é ejetado, manuseado e armazenado pode se contaminar com microrganismos originários da pele do animal, do ar, dos equipamentos e utensílios de ordenha ou pela manipulação, incluindo os próprios ordenhadores (BRITO et al., 1999).

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, sendo que estes últimos 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).

De acordo com a temperatura ideal de crescimento, os microrganismos contaminantes do leite podem ser divididos em três grupos principais: os mesófilos, que se multiplicam rapidamente quando o leite não é armazenado sob refrigeração, os termodúricos que sobrevivem à pasteurização (30 minutos a 63° C ou 15 segundos a 72°C) e os psicotróficos, que se multiplicam em temperaturas baixas (7°C ou menos) (FRANK; CHRISTEN; BULLERMAN, 1992; HAYES; BOOR, 2001).

O tratamento térmico torna o leite mais seguro para o consumo e aumenta a durabilidade dos produtos lácteos, entretanto, por si só, não é suficiente para assegurar a qualidade ou melhorar o rendimento industrial (HAYES; BOOR, 2001).

## **2.2. Mastite**

### **2.2.1. Definição e conceitos**

Mamite (do latim *mammae*) ou mastite (do grego *mastos*) refere-se ao processo inflamatório das glândulas mamárias, que pode se localizar dos canais glandulares até os alvéolos e interstício (FONSECA; SANTOS, 2000). Caracteriza-se por alterações patológicas do tecido glandular e por alterações físicas, químicas e geralmente bacteriológicas do leite (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002), o que culmina na diminuição da qualidade e aumento

do descarte do leite resultando em problema na indústria leiteira e também de saúde pública (BANDOCH; MELO 2011).

### **2.2.2. Classificação e Formas de Apresentação**

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

A mastite clínica caracteriza-se por apresentar os sinais clássicos da inflamação: rubor, hipertermia, algesia, tumefação e edemaciação na glândula mamária e pode ou não estar acompanhada de reações sistêmicas e às vezes, morte (SMITH, 1994; MACHADO, DEMETRIO; BORGES, 2003, BENEDETTE et al., 2008).

De acordo com Rosenberg (1993) o leite mastítico pode apresentar aparência aquosa, contendo grumos além de outras substâncias como fibrina, soro, sangue e pus.

A mastite superaguda tem início abrupto, com inflamação grave do quarto afetado, e envolvimento sistêmico com apatia, anorexia, febre, desidratação, septicemia e choque, e pode ser fatal ao indivíduo portador. O leite apresenta mudanças no aspecto macroscópico (DOOD, 1983; RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002; MARQUES, 2006).

Na mastite aguda há inflamação grave do úbere, caracterizada principalmente pela dor intensa, porém sem reação sistêmica evidente (COSTA et al., 1995, RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002). A inflamação moderada com persistência de anormalidades macroscópicas do leite caracteriza a forma subaguda (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

Mastite crônica é clinicamente persistente. Devido à destruição interna da glândula ocorre substituição do tecido lesado por tecido conjuntivo fibroso, resultando em decréscimo permanente na produção leiteira (OKERMAN, et al., 1984; SMITH, 1994).

A forma subclínica que é mais prevalente nos rebanhos leiteiros não se observam alterações macroscópicas do leite e sinais de inflamação do úbere. É de difícil detecção, longa duração e cerca de 40% dos casos evoluem para a forma clínica (ANDRADE, 2001).

### **2.2.3. Importância**

Mundialmente a mastite é a doença que exerce maior importância sobre a qualidade do leite (BRITO; BRITO 1997; FONSECA; SANTOS, 2000), pois provoca diminuição na produção, perda da qualidade do leite e da função do parênquima glandular. As perdas podem variar de acordo a intensidade do processo inflamatório, com a prevalência da doença no rebanho, com a patogenicidade dos agentes envolvidos e com o estágio de lactação (BRANT; FIGUEIREDO, 1994).

Todas as fêmeas, independente de idade ou período lactacional, são passíveis de serem afetadas pela mastite (FONSECA; SANTOS, 2000; PRESTES; FILAPPI; CECIM, 2002).

A forma subclínica determina as maiores perdas econômicas devido à elevada prevalência (44,9% a 97%) e redução da produção de leite entre 25,4 e 43% (BRANT; FIGUEIREDO, 1994), sendo de 15 a 40 vezes mais frequente que a forma clínica (BRITO; BRITO 1998; FONSECA; SANTOS, 2001, 2002; RIBEIRO et al., 2003).

Anualmente, três de cada dez vacas leiteiras apresentam inflamação mamária clinicamente aparente, sendo 7% destes animais descartados por lesões irreversíveis e 1% por morte (SMITH, 2006).

Bueno et al. (2002) identificaram em São Paulo uma frequência de 7,4% de mastite clínica para 63,6% de casos subclínicos. Em Minas Gerais, Pinheiro et al. (2009) relataram uma prevalência de 14% de novas infecções e 7% de infecções crônicas em casos clínicos.

Schepers e Dijkhuizen (1991) estimaram que um quarto afetado pudesse produzir de 25 a 45% menos durante uma lactação, quando comparado com um quarto sadio. Enquanto que segundo Bartlett et al. (1991), em decorrência da mastite clínica há redução na produção de leite de aproximadamente 30% na fase aguda. Janzen (2010) relatou perdas de produção variando entre 5,0 e 25,0%, com um extremo de 83,9%.

Devido à alta prevalência da mastite, esta pode representar prejuízo de 12 a 70% na produção no Brasil (FONSECA; SANTOS, 2000, RIBEIRO et al., 2003). De acordo com Fonseca e Santos, 2000 estimaram que haja uma perda de produção, devido aos incidentes de mastite, entre 12 e 15%, que pode totalizar, em relação à produção brasileira anual total de 20 bilhões de litros, na perda de 2,8 bilhões de litros de leite anualmente.

Os efeitos da mastite clínica sobre a produção de leite foram revistos por Hortet e Seegers (1998) e posteriormente por Seegers; Fourichon e Beaudeau (2003), que estimaram perda superior a 700 kg de leite em casos clínicos com duração superior a dois meses.

A estimativa do custo de um caso de mastite clínica no Brasil, no estado de Minas Gerais, entre 2002 a 2004, fica em torno de R\$ 228,99 ou US\$ 100,4. As maiores despesas foram relacionadas aos exames, medicamentos e mão-de-obra adicional (37%); descarte de leite (29%); descarte e morte de vacas (28%) e honorários do médico veterinário (6%) (CARNEIRO et al., 2012).

Schepers e Dijkhuizen (1991) por um apanhado de trabalhos, concluíram que os custos dos programas de controle da mastite variam de US\$ 19,65 a US\$ 275 por vaca por ano.

As perdas econômicas, nos Estados Unidos, atribuíveis à mastite variam anualmente de 200 a 300 dólares por vaca, estimando-se uma perda de mais de 20 milhões de dólares para indústria láctea (HOGAN; SMITH, 1997) e um prejuízo de aproximadamente US\$ 1,8 bilhões por ano nos EUA, devido à ocorrência de mastites (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1996).

Na Região Sudeste, nos estados de Minas Gerais e São Paulo, onde encontra a maior bacia leiteira, esses valores variam entre 20 e 71% para a prevalência da doença (FONSECA, 1992; COSTA et al., 1999).

#### **2.2.4. Etiologia**

Trata-se de uma enfermidade plurietiológica e multifatorial, podendo estar relacionada a agressões físicas, químicas, térmicas, alérgicas, fisiológicas, metabólicas, psicológicas e mais frequentemente infecciosas. A intensidade da infecção é influenciada por fatores relacionados ao animal, ao ambiente e ao manejo, como: espécie, perfil sanitário, fatores ambientais, nível de produção e tecnificação da propriedade, características do processo de ordenha, ordenhador, uso de medicamentos, estação do ano, número de ordenhas, qualidade nutricional, idade, conformidade física dos tetos, estágio da lactação, perfil imunológico individual, resistência natural da glândula, hereditariedade e características, virulência, viabilidade e potencial patogênico do agente etiológico (HARROP et al, 1975; MC DERMOTT et al, 1983; OLIVEIRA, 1989; PRESTES; FILAPPI; CECIM, 2002; RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

São citadas na literatura mais de 130 espécies de microrganismos pertencentes a 35 gêneros envolvidos na etiologia da mastite bovina (SCHOCKEN-ITURRINO; NADER FILHO; AVILA, 1996; RIBEIRO et al., 2003).

Apesar de diferentes agentes possíveis, a etiologia bacteriana assume um lugar de destaque na epidemiologia do processo infeccioso (ANDERSON; HUL; PUGH, 2004), e o esfíncter do teto comumente é a porta de entrada dos agentes ao interior da glândula. Assim sua integridade torna-se uma importante barreira contra a infecção, agindo como um fator essencial de resistência (HAMMAN, 1987; GLEESON; O'CALLAGHAN; RATH, 2003).

Philpot e Nickerson (1991) já indicavam que 90% das mastites são causadas por bactérias com predominância dos gêneros *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Corynebacterium* spp. e *Mycoplasma bovis*. Além destes patógenos, fungos, leveduras, algas e vírus também podem estar envolvidos na etiologia da doença, porém a ocorrência é baixa (WATTS, 1998; BRABES et al., 1999; SÁ et al., 2004).

Segundo Chahota et al. (2001) e Crawshaw, Macdonald e Duncan (2005) a mastite causada por fungos e leveduras ocorre geralmente em surtos localizados, de ocorrência espontânea sem envolvimento de outros microrganismos ou histórico de uso de antibióticos, sendo comuns nas primeiras semanas de lactação; ou após antibioticoterapia, o que favorece o crescimento micótico sem competição da microbiota local regular. Dentro desse grupo, os mais frequentemente isolados em amostras de leite são *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Trichosporon* spp., *Cryptococcus* spp., *Saccharomyces* spp., *Penicillium* spp. (ALVAREZ; FLORES, 1962; CARTER; COLE JR, 1995).

Spanamberg et al. (2008) isolaram um total de 68 agentes micóticos, de vacas diagnosticadas com mastite subclínica na região de Passo Fundo-RS. Os agentes mais frequentes foram: *Candida* (37,9%), *Pichia* (19,1%), *Rhodotorula* (10,3%), *Cryptococcus* (10,3%), *Geotrichum* (5,8%), *Debaryomyces* (5,8%), *Trichosporon* (4,4%).

Costa et al. (2008) isolaram leveduras em 84% das amostras de vacas com mastite subclínica. Entre as espécies houve um predomínio de *Candida* spp. (*Candida albicans* - 28,1%, *Candida parapsilosis* - 19,3%, *Candida catenulata* - 14,0%, *Candida glabrata* - 14,0%, *Candida tropicalis* - 8,8%) e *Trichosporon* spp. (1,8%).

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).

Existe uma divisão conceitual da mastite que está relacionada aos tipos de agentes, geralmente classificados em dois grupos: os causadores de mastite contagiosa e os promotores de mastite ambiental. Esta divisão tem como base os locais onde esses microrganismos podem ser isolados, a sua forma de transmissão e o tipo de infecção que provocam (PHILPOT; NICKERSON, 1991; BRITO; BRITO 1998; FONSECA; SANTOS, 2000).

Os agentes ambientais são oportunistas, habitam normalmente o ambiente das vacas leiteiras (MENDONÇA et al., 1999) e a sua transmissão ocorre entre animais ou entre os quartos do mesmo animal, no intervalo entre as ordenhas ou por manipulação durante a ordenha (HARMON, 1994, RADOSTITS, LESLIE, FELTROW, 1994; BRADLEY, 2002), sendo praticamente impossível erradicar esse tipo de mastite do rebanho (SMITH; HOGAN, 1998). Todas as categorias de animais estão sob risco (PHILPOT; NICKERSON, 2002).

As bactérias ambientais que comumente causam mastite bovina incluem enterobactérias, *Streptococcus uberis* e outros do gênero *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* sp. e *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes*, além de fungos, principalmente leveduras, e algas clorofiladas do gênero *Prototheca* sp. (COSTA, et al, 1995).

Os agentes contagiosos como *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium bovis* se multiplicam na glândula mamária, canal do teto ou sobre a pele do animal onde podem permanecer desde semanas a anos. Por outro lado, apresentam pouco tempo de sobrevivência no ambiente externo (HARMON, 1994, RADOSTITS, LESLIE,

FELTROW, 1994; BRADLEY, 2002), sendo transferidos de um animal para outro principalmente no momento da ordenha (PHILPOT; NICKERSON, 2002). São bem adaptados à sobrevivência no úbere e usualmente estabelecem infecções subclínicas, geralmente de longa duração e apresentando alta CCS (FONSECA; SANTOS, 2000).

Os microrganismos do gênero *Staphylococcus* spp. são os mais prevalentes em casos subclínicos ou clínicos da mastite e a espécie mais citada é *S. aureus* (MOTA et al, 2012).

No Brasil, diversos estudos relataram a predominância dos agentes *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus* spp. (ANDRADE et al., 1998; FILIPPSSEN, 1999; BARBALHO; MOTA, 2001; BUENO et al., 2003; FERREIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010).

*Streptococcus* é o segundo grupo de maior relevância com quatro espécies (*Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. bovis* e *S. uberis*), isoladas na maioria dos rebanhos (HARROP et al., 1975; FERREIRO; SANTOS; SILVA, 1981; DOMINGUES; PADOVANI; DOMINGUES, 1996; RUOFF, 2003; INNINGS et al., 2005; FERREIRA, et al 2007; GUILLOUX; CARDOSO; CORBELLINI, 2008; PINHEIRO et al., 2009).

### ***Staphylococcus* spp.**

Bactéria Gram positiva esférica, que forma estruturas semelhantes a cachos de uva, hemolítica ou não, coagulase positiva ou negativa, anaeróbia facultativa e catalase positiva, e com alto potencial patogênico (HIRSH; ZEE, 2003).

Encontrada na superfície epitelial na maioria dos animais (HARMON, 1994), sua importância na medicina veterinária deve-se às exotoxinas hemolisina, enterotoxina e leucocidina que determinam sua patogenicidade (HIRSH; ZEE, 2003; BANDOCH; MELO, 2011).

O índice de isolamento pode variar entre 9,1 e 85% (NADER FILHO et al., 1985; LANGENEGGER; FIGUEIREDO; REZENDE, 1986; FREITAS, MAGALHÃES, 1990; BELOTI et al., 1997). Animais afetados com *S. aureus* adquirem valores elevados na CCS (LANGONI et al., 1991, OLIVEIRA, 2000, SÁ et al., 2004) que atingem segundo Guilloux, Cardoso e Corbellini (2008) entre 900 e  $2.240 \times 10^3$  células por mL de leite.

Algumas características de virulência contribuem para a persistência do *S. aureus* no tecido mamário (SANTOS et al., 2003), destacando-se a produção de exotoxina, que provoca regiões de necrose e fibrose e certa facilidade para surgimento de cepas resistentes, favorecido pelo uso indiscriminado de antibióticos (BARBERIO; GIETL; DALVIT, 2002).

Normalmente está envolvido em tipos severos de mastite, da forma gangrenosa à subclínica. Clinicamente evolui com quartos hiperêmicos, edemaciados e sinais de toxemia. Em situações crônicas ou mal tratadas, pode induzir uma mastite gangrenosa hiperaguda, devido ao edema e a congestão da mama que favorecem a formação de trombos sanguíneos, o que compromete a perfusão e precipita a morte tecidual (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002). Sua cura ao início da lactação é restrita, principalmente quando há formação de microabscessos (HARMON, 1994). No entanto, sua maior prevalência está associada às infecções subclínicas (HARMON, 1994; FONSECA; SANTOS, 2000).

Mastites ocasionadas por *Staphylococcus* sp. têm sido relatados em muitos sistemas de produção leiteira em todo o mundo (THORBERG et al., 2009). Mais de 50 espécies e subespécies de estafilococos têm sido caracterizadas. O gênero é dividido em estafilococos coagulase positivos (ECP) e estafilococos coagulase negativos (ECN), baseado na sua habilidade em coagular o plasma (PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009). Mais de dez espécies de ECN têm sido isoladas a partir de amostras de leite bovino mastítico e as espécies mais comumente relatadas são *Staphylococcus chromogenes* e *Staphylococcus simulans*,

*Staphylococcus epidermidis* além de *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus haemolyticus*. Outros ECN frequentemente mencionados são *S. warneri*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi* e *S. lugdunensis* (THORBERG et al., 2009).

Embora frequentemente associados à mastite clínica e subclínica, ECN são considerados agentes secundários. No diagnóstico de rotina ECN têm sido tradicionalmente considerados patógenos menores, especialmente em relação ao *Staphylococcus aureus*, estreptococos e coliformes. A principal razão é que ECN estimulam reações inflamatórias brandas na glândula mamária, e promovem moderado aumento na CCS (BRAMLEY et al., 1996; RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002), sendo usualmente subagudas e subclínicas. Apesar de menos intensa a infecção por ECN também está associada ao aumento da CCS, desvalorização da qualidade do leite, e diminuição da produção (TAPONEN et al., 2008).

Em um estudo conduzido por Pardo et al. (1998) foi demonstrada a alta ocorrência de mastite clínica por ECN em vacas primíparas no início da lactação e mastite clínica hiperaguda causando gangrena do tecido glandular pela produção de alfa toxina. Recentemente Oliveira et al. (2011b) relataram um percentual de isolamento de ECN de 25% nos casos de mastite clínica e de 32% nos casos de mastite subclínica.

No Brasil as mastites por ECN são, sobretudo causadas por *S. epidermidis*, *S. chromogenes* e *S. simulans*. A prevalência de *S. epidermidis* varia de 11,3 a 23,19% (NADER FILHO et al., 1985). A presença desses microrganismos é maior em propriedades que reduziram o número de infecções por outros patógenos, sendo mais frequentes em animais de primeira lactação. Nas mastites por ECN ocorre fibrose interalveolar do tecido mamário, perda da função secretória e alteração da quantidade e qualidade do leite (MARQUES, 2006).

ECN tendem a ser mais resistentes do que *S. aureus*, e facilmente desenvolvem multirresistência. O mecanismo de resistência mais comum é a produção de beta-lactamases, o que resulta em resistência a penicilina G e a aminopenicilinas, e alguns destes podem carregar o gene *mecA* de resistência a oxacilina. Pelo uso indiscriminado de antibióticos, cepas multirresistentes são isoladas de bovinos com mastites por ECN, dificultando o seu controle (MACHADO; CORREA; MARIN, 2008).

### ***Streptococcus* spp.**

Foi o primeiro grupo a ser incriminado como causador de mastite crônica de caráter infeccioso e contagioso segundo Keefe (1997). São bactérias Gram positivas que formam pares ou cadeias de cocos, hemolíticas e catalase negativas comuns na microbiota do trato respiratório superior, genital inferior e digestivo. O gênero *Streptococcus* compreende pelo menos 50 espécies, que incluem muitos patógenos para o homem e animais domésticos (QUINN et al., 2005).

*Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*, podem permanecer no ambiente por no máximo de três semanas. Contudo apresentam uma capsula antigênica que favorece a perpetuação no organismo sem a eliminação pelo sistema imune (HIRSH; ZEE, 2003).

A descrição de novas espécies relacionadas à mastite bovina vem acompanhando a proposição de novas espécies para o gênero *Streptococcus* (WILLIAMS; COLLINS, 1990; FERNANDEZ-GARAYZABAL et al., 1998; DEVRIESE et al., 1999a, b).

Na década de 1980, o gênero foi desdobrado em outros três, nomeadamente, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*, dos quais *Enterococcus* e *Streptococcus* são os mais frequentemente isolados em casos de mastite (RUOFF, 2003; INNINGS et al., 2005).

Mudanças na taxonomia e nomenclatura do gênero *Streptococcus* e gêneros relacionados levaram à criação do termo “cocos gram-positivos catalase-negativos” para o



grupo que atualmente engloba 18 gêneros, com muitos microrganismos isolados do leite total de rebanhos e envolvidos em casos de infecções subclínicas e formas clínicas da mastite (FACKLAM, 2002; SANTOS et al., 2007).

O *Streptococcus agalactiae* é o principal patógeno envolvido em plantéis leiteiros em que não há um programa eficiente de controle de mastite e sanidade (HIRSH; ZEE, 2003), causando mastites subclínicas persistentes com taxa de cura espontânea baixa, atuando assim como reservatório da infecção (KEEFE, 1997; WILSON; GONZALEZ; DIAS, 1997).

Nos quartos afetados o leite torna-se alcalino e a CCS pode exceder os 500.000/mL (KEEFE, 1997). Sua transmissão normalmente ocorre pela falta de higiene dos manipuladores, ambiente e equipamentos (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

No período das águas acontece aumento significativo nos relatos de casos que envolvem esses agentes, visto que os meses úmidos oferecem condições que propiciam seu crescimento e proliferação (MARQUES, 2006).

O *S. dysgalactiae*, particularmente, pode ser isolado das tonsilas e causar infecção dos tetos por lambadura, o que facilita a prevalência de mastite no rebanho, mesmo quando as vacas estão secas (FONSECA; SANTOS, 2000).

### ***Corynebacterium spp.***

São bacilos, Gram positivos, hemolíticos, catalase negativos ou não e fermentadores de lactose. Este grupo apresenta como peculiaridade microscópica os grupamentos em forma paliçada ou letras chinesas. São transmitidos no momento da ordenha, por desinfecção deficiente nos tetos ou teteiras, mas podem também ser transmitidos por moscas (LARANJA, 1996; HIRSH; ZEE, 2003).

Animais afetados geralmente apresentam sinais leves ou menos evidentes (SMITH, 1994). Devido a sua elevada prevalência em infecções intramamárias, Martins et al. (2010) consideraram que não é mais apropriado considerá-lo um agente secundário.

### ***Escherichia coli***

Bactérias Gram negativas, em forma de bastonetes, com ação hemolítica variável de acordo com a estirpe. Componente comum da microbiota gastrointestinal, oportunista na glândula mamária, causa mastite clínica aguda ou superaguda nas primeiras semanas do pós-parto. A fonte de contaminação é ambiental o que resulta em aparições não sazonais (SMITH, 1994, HIRSH; ZEE, 2003, RIBEIRO et al., 2006).

Atualmente existe atenção especial voltada para as *E. coli*, pois estas apresentam variância em seus fatores de virulência. São microrganismos constituídos de estruturas lipopolissacarídicas (LPS) na parede celular, denominadas endotoxinas. Produzem diversas citocinas ou exocitocinas como as hemolisinas, fator necrosante citotóxico (CNF), verotoxinas - VT e enterotoxinas. Contêm fatores que favorecem a multiplicação em meios inóspitos, como os sideróforos que adaptam este microrganismo em casos de privação ao ferro disponível, a multirresistência aos antibióticos e as adesinas, pili ou fímbrias para colonização das células alvo (RIBEIRO et al., 2006).

### **2.2.5. Patogenia**

No período anterior ao parto e início da lactação há uma maior propensão às infecções, devido a alterações hormonais e metabólicas associadas à prenhez, parto e início da lactação

que influenciam a resposta inflamatória (RAINARD; RIOLLET, 2006; PYORALA; TAPONEN, 2009).

A contaminação da glândula começa com o microrganismo adentrando ou invadindo de forma ascendente o canal do teto. A via hematogena e percutânea são possíveis, entretanto a via mais comum de acesso é pelo ducto ou canal da teta. Em seguida ocorre a infecção onde o agente prolifera e coloniza o tecido glandular mamário (CARLTON; MCGAVIN, 1998; RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

A presença de patógenos e suas toxinas no úbere induzem à resposta inflamatória caracterizada por alterações dos componentes do leite (SMITH, 1994; RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002) e pela elevação dos níveis de leucócitos (CCS), tornando positiva a correlação entre CCS e a infecção intramamária (KEHRLI; SHUSTER, 1994; SILVA et al., 2005).

Células somáticas são todas as células presentes no leite, que incluem as células migratórias do sangue para o úbere, como leucócitos e células de descamação do epitélio glandular secretor. O aporte destas células se intensifica na quarta semana pré-parto, diminuindo gradativamente até uma semana pós-parto. Na secreção láctea de vacas com infecção intramamária, ocorre aumento no número de células de defesa passando a predominar neutrófilos, seguidos por macrófagos e linfócitos, e o número de células epiteliais permanece inalterado (PHILPOT; NICKERSON, 1991). Essas alterações comprometem a composição do leite tanto em termos de qualidade quanto na quantidade dos componentes (BRAMLEY, 1992).

As alterações nas características do leite procedem do aumento da permeabilidade vascular, induzida principalmente por células polimorfonucleares (PMN), com afluxo de células do sangue para a glândula mamária (BIBALKE, 1984; NICKERSON, 1994).

A CCS é influenciada por vários fatores, mas especialmente pela presença de infecções intramamárias, tornando-se um indicador bastante confiável de sanidade da glândula mamária (OSTRENSKY, 1999; VIANA, 2000).

Além do aumento do número de células, a mastite provoca alterações nos três principais componentes do leite, gordura, proteína e lactose. Enzimas e minerais também são afetados. A extensão do aumento da CCS e as mudanças na composição do leite estão diretamente relacionadas com a superfície do tecido mamário atingido pela reação inflamatória. Portanto há uma relação direta entre a CCS e a concentração dos componentes do leite (SCHÄELLIBAUM, 2000).

Nos processos inflamatórios da glândula mamária aumentam as concentrações de íons sódio e cloretos, e as quantidades de cálcio, fósforo, magnésio e potássio, enquanto que as vitaminas diminuem. Decréscimos na composição do leite foram registrados para a gordura (0,1 a 0,45%), sólidos não gordurosos (0,1 a 0,57%), lactose (0,1 a 0,77%), e sólidos totais (1,07%) (JANZEN, 2010).

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. Sendo assim o leite apresenta menor teor de caseína, a proteína nobre do leite, acompanhado do aumento de proteínas séricas, como albuminas e imunoglobulinas (SCHULTZ, 1997).

Todas estas alterações causam diminuição da tolerância ao calor, alteram as propriedades organolépticas e acarretam diminuição da qualidade dos produtos derivados do leite, 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 predisõem à

ocorrência de sabor rançoso, em função da quebra dos ácidos graxos de cadeia curta (MURPHY et al., 1989; RENEAU; PACKARD, 1991).

## 2.2.6 Diagnóstico

O diagnóstico de mastite clínica é simples em função das alterações que acarreta na glândula mamária e no leite. Entretanto a mastite subclínica, não é diagnosticada pelos métodos rotineiros de exame clínico (inspeção, palpação) e pelas alterações macroscópicas do leite (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

Os métodos mais usados para diagnóstico de mastite subclínica incluem exames microbiológicos, métodos químicos indiretos e a CCS do leite dos quartos mamários individuais, dos animais ou do tanque, trazendo um apanhado de todo o rebanho sem discernimento individual (QUINN et al., 1994; PEREIRA, 2005).

O teste da caneca telada ou de fundo escuro que consiste na eliminação dos primeiros jatos de leite em uma caneca ou coador com fundo escuro permite a detecção do leite clinicamente anormal, e é um dos métodos mais indicados e utilizados para diagnóstico da mastite clínica (MARGATHO; HIPOLITO; KANETO, 1998).

Fonseca e Santos (2000) e Philpot e Nickerson (2002) citaram 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. Adicionalmente 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.

O *California Mastitis Test* (CMT) é usado mundialmente para diagnóstico da mastite subclínica, tendo como vantagens ser uma prova rápida, de fácil execução e de baixo custo que pode ser empregada no momento da ordenha (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

É um método de contagem indireta de células somáticas no leite, a partir de reação química entre amostra de leite e o reagente (Lauril sulfato de sódio 3% e Bromocresol púrpura), em bandeja apropriada. O reagente rompe a membrana das células que liberam o material nucléico (DNA), resultando em graus de coloração e viscosidade, provocado pela aglutinação das proteínas (MADALENA; MATOS; HOLANDA JR., 2001).

A interpretação se baseia na observação visual da reação que se processa entre o reagente e o material genético das células somáticas presentes no leite, formando um gel, cuja textura é proporcional ao número de células somáticas. O resultado é dado em cinco escores que variam de negativo (-), suspeito (traços), fracamente positivo (+), positivo (++) e fortemente positivo (+++) (SCHALM; NOORLANDER, 1957) e apresentam correlações variadas com a CCS (PHILPOT; NICKERSON, 1991).

Tem-se questionado a interpretação do CMT como instrumento de diagnóstico da mastite subclínica, por ser um teste subjetivo (MARTIN; MEEK; WILLEBERG, 1994; CASURA; SCHUKKEN; RÜSCH, 1995). Contudo, diferentes estudos atestam a sensibilidade do CMT em identificar quartos mamários com mastite subclínica quando a interpretação é rigorosa (BRITO et al., 1997, CADEMARTORI, 2001, DELLA LIBERA et al., 2001, BARBOSA et al., 2002, REYES et al., 2005).

A CCS no leite de animais individuais ou de tanque é uma ferramenta valiosa na avaliação do nível de mastite subclínica no rebanho, na estimativa das perdas quantitativas e qualitativas de produção do leite e derivados, como indicativo da qualidade do leite produzido na propriedade e para estabelecer medidas de prevenção e controle da mastite. A CCS tem por finalidade o monitoramento dos casos de mastite subclínica e crônica, atuando como o

principal indicativo da qualidade do leite cru e como referência da saúde da glândula mamária das vacas do rebanho (LANGONI; ICHIHARA; SILVA, 2000).

Segundo Kitchen (1981), o leite obtido de quartos mamários de animais sadios contém de 50 a 200 mil cels/mL. Na dependência da severidade e extensão da infecção e, do tipo de microrganismo envolvido, as CCS podem variar de 200 a  $5.000 \times 10^3$  cels/mL de leite.

A CCS pode ser realizada de diversas formas sendo a contagem eletrônica a mais prática e indicada pela legislação. Os aparelhos funcionam pelo princípio de citometria de fluxo, ou seja, na contagem microscópica de núcleos corados isolados e deslocados de células somáticas (CECALAIT, 1993).

Para avaliar o melhor índice e para estimar a porcentagem de vacas com mastite subclínica em rebanhos leiteiros, foi realizado um estudo na Holanda (LIEVAART; KREMER; BARKEMA, 2007) no qual foram coletados dados de 246 fazendas leiteiras, as quais realizavam a CCS individual de todas as vacas em lactação. Foi calculada a correlação entre os índices CCS do leite do tanque, CCS de cada vaca em lactação, a CCS aritmética, e a porcentagem de vacas com mastite subclínica ( $CCS > 250.000$  cels/mL). O índice que apresentou a melhor correlação com a porcentagem de vacas com mastite subclínica foi a média aritmética de CCS individual das vacas. Uma média aritmética de 400.000 cels/mL indicaria cerca de 30% de vacas com mastite subclínica no rebanho. A correlação entre CCS do tanque e a porcentagem de vacas com mastite subclínica foi moderada ( $R^2 = 0,64$ ), porém uma estimativa útil da mastite subclínica em nível de rebanho. Também outros estudos (SCHUKKEN et al., 2003; BRADLEY; GREEN, 2005; VALDE; OSTERAS; SIMENSE, 2005) indicaram que a média aritmética da CCS de todas as vacas é o parâmetro mais adequado para resumir a situação de mastite subclínica um rebanho.

Quando o leite de todas as vacas num rebanho é misturado no tanque de expansão, a CCS numa amostra composta é um bom indicador da prevalência de mastite no rebanho (LIEVAART; KREMER; BARKEMA, 2007) (Quadro 01).

Rebanhos com um controle de mastite eficaz têm constantemente contagens abaixo de 100.000 cels/mL. Uma CCS maior que 200.000 cels/mL indica a presença de mastite subclínica. Uma CCS do tanque de 400.000 cels/mL indica que cerca de 25% de vacas com mastite subclínica. Contagens maiores que 500.000 cels/mL indicam que pelo menos um terço das glândulas mamárias dos animais em lactação estão infectadas e a perda de leite devido à mastite subclínica é de pelo menos 10% (LIEVAART; KREMER; BARKEMA, 2007).

**Quadro 01:** Relação entre contagem de células somáticas (CCS) em amostras compostas de tanques de refrigeração, perda de produção (%) e prevalência de mastite subclínica no rebanho.

CCS	Quarto infectado (%)	Perda de produção (%)	Prevalência de MSC*
<200.000	6	0 A 5	Próxima à zero
200.000–500.000	16	6 A 9	Alguns casos
500.000–1.000.000	32	10 A 18	Muitos casos
>1.000.000	48	19 A 29	Epidêmica

\*MSC – Mastite subclínica

Fonte: Lievaart; Kremer; Barkema (2007)

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).

A cultura bacteriana geralmente é feita em vacas selecionadas a partir da CCS ou de casos clínicos. A cultura do leite individual é o exame mais sensível e específico para pesquisa da mastite, de forma a identificar as espécies bacterianas envolvidas na infecção. Ao se ter conhecimento do agente etiológico, é possível definir o protocolo de tratamento que mais se ajusta e até mesmo a definição da forma de contágio (FONSECA; SANTOS, 2000; RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

O diagnóstico definitivo da mastite baseia-se no isolamento dos patógenos das amostras de leite (MCDOUGALL et al., 2001). Entretanto ocorre uma contradição em torno da empregabilidade do diagnóstico laboratorial de mastites na rotina do leite, principalmente no que se refere ao alto custo do exame e urgência na escolha da conduta terapêutica (FERNANDES, 2006).

Por necessitar de exames laboratoriais acurados, tempo para o crescimento da cultura e custos elevados, quando executado de forma isolada pode apresentar resultados pouco efetivos (MCDOUGALL et al., 2001; PYÖRALLÄ, 2003).

Os métodos utilizados para a determinação da qualidade microbiológica podem ser qualitativos ou quantitativos. Os qualitativos apresentam praticidade de realização, entretanto são subjetivos, sendo utilizados apenas para o diagnóstico geral e presuntivo; incluem os testes da redutase, fermentação e acidez (FONSECA; SANTOS, 2000).

Dentre os testes quantitativos destaca-se a contagem bacteriana total, 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 indústrias lácteas. De acordo com Suhren e Reichmuth (2000) apesar de utilizada internacionalmente como método de referência, a CPP não expressa a real qualidade bacteriológica do leite, podendo subestimar a quantidade de bactérias presentes, pois apenas bactérias viáveis e que se multiplicam nas condições de cultivo (BRITO et al., 1999; HILLERTON; BERRY, 2003).

De acordo com Makovec e Ruegg, (2002) o isolamento bacteriano apresenta 50% de chances de crescimento e identificação das amostras.

Dentre as dificuldades no isolamento do agente etiológico destacam-se: o microrganismo pode não ser eliminado de forma contínua ou ser eliminado em concentrações insignificantes; os microrganismos podem não ser detectados pelos exames bacteriológicos de rotina; algumas enzimas e proteínas presentes no leite (lisozima e lactoferrina) dificultam a detecção; e a infecção pode ser mantida apenas por endotoxinas bacterianas ou compostos nocivos liberados pelas células inflamatórias que prejudicam a sobrevivência bacteriana e detecção da mesma (MCDOUGALL et al., 2001; RUEGG; REINEMANN, 2002; PYÖRALLÄ, 2003).

### **2.2.7 Controle e Profilaxia**

Várias medidas são propostas para controlar a mastite e em consequência diminuir os impactos econômicos na atividade leiteira. Os programas de controle devem ter como metas principais: reduzir novas infecções, encurtar a duração das infecções existentes, promover a redução dos casos clínicos, controlar ou erradicar as mastites contagiosas, manter poucos incidentes por agentes ambientais, menos de 2% de episódios clínicos ao mês, 85% das vacas livres de mastite subclínica e a CCS abaixo de 200.000 cels/mL de leite (BRITO et al., 1999).

Inicialmente, o programa consiste na conscientização dos produtores sobre as perdas econômicas, identificação das vacas e rebanhos infectados, isolamento ou descarte das vacas com mastite crônica, adoção de medidas específicas de tratamento, formulação de estratégias para evitar a proliferação da doença e, principalmente, adoção de boas práticas de higiene da ordenha e ordenhador (RUPP; BEAUDEAU; BOICHARD, 2000; DINGWELL et al., 2004).

Muller (2002) e Dias (2007) ressaltaram que é fundamental detectar tratar os animais enfermos de acordo com o patógeno envolvido, selecionar vacas naturalmente mais resistentes e propiciar o fornecimento de alimentação adequada. Deve-se ainda atuar sobre as possíveis vias de transmissão, implantando um correto manejo e higiene de ordenha, e manter as vacas em ambiente seco e limpo. Também se faz importante o monitoramento contínuo dos índices de mastite e manutenção de descartes de animais crônicos ou que apresentaram mais de três casos clínicos durante a mesma lactação são medidas importantes no controle da doença no rebanho (PHILPOT; NICKERSON, 1991, FONSECA; SANTOS, 2000).

De forma geral os procedimentos fundamentais dos programas de controle de mastite incluem: pesquisar os agentes infecciosos presentes no gado afetado; tratamento adequado e imediato de todos os casos clínicos; instituir linha de ordenha (primíparas, multíparas negativas, animais que foram afetados, e por fim os animais positivos, respectivamente); realizar a manutenção do equipamento de ordenha de acordo com instruções do fabricante; limpeza individual dos tetos com água clorada; pré e pós-dipping (imersão dos tetos por 30 segundos pré e pós-ordenha de todas as vacas ordenhadas com solução antisséptica não corrosiva); certificar que os tetos estejam higienizados e secá-los com papel toalha descartável antes de serem ordenhados; rejeitar os primeiros jatos de leite, e verificar cor e textura (caneca de fundo preto); realizar frequentemente o CMT; avaliar o leite de animais com alterações e rejeitar o leite com aparência anormal; fechar o registro de vácuo antes de retirar as teteiras, fazer desinfecção das mesmas entre cada animal; alimentar os animais, por no mínimo 30 minutos após a ordenha, para oclusão do esfíncter e formação do tampão de queratina antes de deitarem; aplicação de antibióticos na interrupção da lactação (terapia da vaca seca) (PHILPOT; NICKERSON, 1991, FONSECA; SANTOS, 2000 CERQUEIRA et al., 2009).

### **2.2.8 Tratamento**

O tratamento adequado é o melhor caminho para o controle da mastite na propriedade. Primeiramente, arquiteta-se a estratégia da terapia por meio da avaliação dos animais e quartos afetados, da forma de apresentação da mastite, do período de lactação, da sanidade do rebanho e da identificação do patógeno por meio da cultura e sensibilidade antimicrobiana (MULLER, 2002; DIAS, 2007).

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; HIPOLITO; KANETO, 1998; PHILPOT; NICKERSON, 2002), permitindo escolher o tratamento com a certeza de se utilizar o produto que melhor se aplica no combate aos agentes de mastite na propriedade (FERNANDES, 2006).

Para o tratamento das mastites subclínicas devem ser levados em consideração o custo, o tempo de eliminação dos antibióticos e a perda de leite. Sendo assim, recomenda-se o mínimo de aplicações, de forma a buscar a cura dos animais e o retorno rápido à produção com perda menor de leite pelo descarte (WILSON et al., 1986, CULLOR, 1993). Casos de

mastite clínica devem ser tratados imediatamente, observando o perfil microbiológico e de sensibilidade, dose e via de aplicação (MULLER, 2002; DIAS, 2007).

A forma mais indicada é a intramamária, trata-se do esgotamento total do quarto infectado e infusão de um antibiótico adentrando pelo ducto do teto, não esquecendo que a vaca em tratamento deve ser ordenhada frequentemente e que seu leite deve ser descartado (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002).

Terapia parenteral deve ser empregada somente em casos de envolvimento sistêmico, devido ao comprometimento da difusão do antibiótico na mama (MULLER, 2002; DIAS, 2007).

Tanto o início como o final do período seco são os momentos de maior risco para o desenvolvimento de infecções intramamárias, onde o úbere torna-se mais susceptível (RADOSTITS; BLOOD; GAY, 2002). Assim preconiza-se a medicação das vacas no dia da secagem, por via intramamária com produto de longa ação. Esta medida tem por finalidade a cura de possíveis infecções subclínicas e também a prevenção de infecções durante o período seco (MULLER, 2002; DIAS, 2007).

Resultados promissores têm sido observados com o uso de vacinas que reduzem a incidência e a gravidade das mastites ambientais por coliformes usando bacterinas constituídas de microrganismos mutantes (MULLER, 2002; DIAS, 2007; CERQUEIRA et al., 2009).

Medidas como inutilização ou amputação por cirurgia ou aplicação de irritante químico através do teto, são usadas em casos extremos de quartos afetados por mastite crônica, principalmente quando a glândula está severamente danificada e pode comprometer a vida do animal, ou tornar-se uma fonte permanente de infecção (REBHUN, 2000).

### **2.3. Resíduos de antibióticos no leite**

Qualidade e inocuidade de alimentos são aspectos relevantes para a saúde pública, com destaque aos perigos microbiológicos e químicos de produtos de origem animal. Conforme evidenciado na Tabela 01, a maioria dos países estabelece em suas legislações sanitárias regulamentação para o uso de antimicrobianos na pecuária, definindo os limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal.

Apesar de microrganismos patogênicos serem os agentes mais relacionados a enfermidades veiculadas por alimentos, a presença de resíduos de elementos químicos e agentes antimicrobianos é comum tanto no Brasil como em outros países (NERO et al., 2007).

No contexto da produção de leite, a legislação sanitária estabelece que o leite deva ser livre de qualquer espécie de contaminante e impõe limites máximos de resíduos (LMR) em alimentos de origem animal. Foram definidos por meio do Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCRB) os limites máximos de antimicrobianos como Oxitetraciclina, Tetraciclina, Sulfametoxina, Sulfametazina, Ceftiofur, Clortetraciclina, Penicilina G, Amoxicilina e Ampicilina para cada kg de leite, ou "ppb" (CODEX ALIMENTARIUS, 1993, ANVISA, 2006). Amostras com valores acima dos padrões estabelecidos são consideradas impróprias para o consumo humano (BRANDÃO, 2000).

O uso difundido de antibióticos para tratamento de doenças infecciosas em rebanhos leiteiros, principalmente mastites, doenças reprodutivas e do trato respiratório, tem contribuído para a presença de resíduos de antimicrobianos no leite (SILVA; SENA, 1984). Por outro lado, antibióticos têm sido usados no controle de mortalidade e morbidade animal, e também incorporado à ração, como aditivo para melhorar os ganhos de peso e aumentar a

conversão alimentar (SANTOS, 1984), contribuindo também para a presença de resíduos no leite e produtos de origem animal.

**Tabela 01:** Limites máximos de resíduos (LMR) de antimicrobianos permitidos por quilograma de leite no Brasil, Canadá, União Europeia (UE) e Estados Unidos (EUA).

Princípios ativos	LMR (ng/kg ou ppb)			
	BRASIL	CANADA	UE	EUA
<b>Ceftiofur</b>	100	100	100	50
<b>Eritromicina</b>	40	50	40	50
<b>Estreptomicina</b>	200	125	125	125
<b>Penicilinas</b>	4	6-10	4	5-10
<b>Sulfas</b>	100	10	100	10
<b>Tetraciclina</b>	100	150	100	30

Fonte: Mitchell et al. (1998).

A preocupação com a presença de antibióticos no leite justifica-se pelos riscos à saúde do consumidor (NUNES; D`ANGELINO, 2007) e efeitos sobre o processamento industrial (NASCIMENTO; MAESTRO; CAMPOS, 2001), além do potencial papel na seletividade de populações microbianas resistentes, já que eles não são eliminados por meio dos processos de beneficiamento (SISCHO, 1996; MUSSER et al, 2001).

Os antimicrobianos eliminados no leite, são resistentes aos métodos de conservação como o aquecimento e/ou congelamento, e somente em raros casos pode ocorrer alteração de sua atividade (AURVALLE, 1981).

Segundo Costa (1996) e Albuquerque et al. (1996), a presença desses resíduos no leite pode ocasionar uma série de problemas: seleção de cepas bacterianas resistentes no ambiente, principalmente quando seu uso é indiscriminado; pressão seletiva sobre a flora intestinal, favorecendo o crescimento de microrganismos com resistência natural ou adquirida; reações alérgicas e possível choque anafilático em indivíduos sensíveis.

Quanto aos aspectos de produção, os resíduos de antimicrobianos interferem no crescimento dos cultivos iniciadores durante a elaboração de queijos, iogurtes e outros leites fermentados (BRADY, KATZ, 1988; DEWDNEY et al, 1991; MARTINS et. al., 2008), reduzindo a produção de ácidos e alterando o sabor na produção da manteiga (JONES, 1999). E ainda, pela modificação dos resultados de análises laboratoriais pode induzir a uma falsa ideia da boa qualidade do produto (COSTA, 1996).

No que se refere à mastite como principal causa do uso de antimicrobianos nos rebanhos leiteiros (SAVILLE; WITTUM, SMITH, 2000), foi demonstrado que o risco da presença de resíduo de antimicrobianos no leite foi sete vezes maior em rebanhos com média de CCS acima de 700.000 cels/mL em relação aos rebanhos com média menor ou igual a 250.000 cels/mL (SAVILLE; WITTUM, SMITH; 2000).

Alguns fatores como qualidade do leite ejetado, intervalo entre o tratamento e a ordenha seguinte, formulações medicamentosas utilizadas, quantidade de doses e via de administração podem alterar a eliminação da droga e favorecer a presença de resíduos no leite (MARTH; ELLICKSON, 1959; CANNON; HAWKINS; WIGGINS, 1972; COSTA et al, 1999).



Um dos pontos críticos no controle de resíduo de antibióticos no leite pode ser a não observação do período de carência, ou seja, o intervalo de tempo compreendido entre a última aplicação do medicamento e a ausência de resíduos indesejáveis, que varia de acordo com a quantidade da produção de leite no momento do tratamento, tipo e quantidade de medicamento usado, a dose e a via de aplicação, veículo usado na formulação do antibiótico e solubilidade, e estado de saúde do animal (OLIVEIRA; CARNEIRO, 1998). Também contribuem a ausência de anotações ou anotações inadequadas para identificação de animais em tratamento e uso de drogas de maneira inadequada (RUEGG; TABONE, 2000, SAVILLE; WITTUM, SMITH, 2000).

Os produtos apropriados para tratamento da mastite diferem quanto à formulação do antibiótico. Na lactação são logo liberados porque são sais solúveis (ação rápida). E, para tratamento no período seco são geralmente sais insolúveis (ação longa), para permitir a liberação contínua do antibiótico durante várias semanas. Estudos à base de testes quantitativos determinam o tempo em que o antibiótico está sendo excretado e, conseqüentemente, o período no qual o leite não deve ser enviado para consumo humano (OLIVEIRA; CARNEIRO, 1998).

Por sua importância na alimentação humana, o leite é o alimento mais avaliado quanto à contaminação por antibióticos (ALBUQUERQUE et al., 1996; MARTINS; VAZ, 2000; NASCIMENTO; MAESTRO; CAMPOS, 2001; RAIA JR, 2001; BARROS; JESUS; SILVA, 2001; DENOBILE, 2002; ROSÁRIO, 2002; HOTTA, 2003; MEDEIROS et al., 2004; COUTO; TÓRTORA, 2005; TETZNER et al., 2005; NERO et al., 2007; NUNES; D'ANGELINO, 2007; FONSECA et al., 2009; MACEDO; FREITAS, 2009; MORAIS et al., 2009; SOUSA et al., 2010).

Os efeitos deletérios à saúde incluem ototoxicidade, nefrotoxicidade, desequilíbrio da microbiota intestinal favorecendo o aparecimento de resistência em bactérias enteropatogênicas, discrasias sanguíneas, reações alérgicas, hipersensibilidade e choque anafilático (DAYAN, 1993), além do potencial teratogênico e carcinogênico, e múltipla resistência (TAVARES, 1996; COSTA et al, 1999; COSTA, 2002).

Nos medicamentos para mastite, disponíveis no mercado brasileiro, constam um predomínio de formulações contendo aminoglicosídeos e principalmente os betalactâmicos (SINDAN, 2003, 2004), conseqüentemente sendo os resíduos mais encontrados no leite (SHITANDI; KIHUMBU, 2004). Segundo Fagundes (2003) animais submetidos à terapia na interrupção da lactação, com o período seco recomendado, na lactação subsequente podem estar eliminando resíduos medicamentosos, mesmo respeitando-se o período de carência.

Resíduos de antimicrobianos foram detectados em leite de mistura procedentes de propriedades rurais, em usinas de beneficiamento e pasteurizados prontos para consumo no mercado varejista em diferentes regiões e Estados produtores de leite no Brasil (MACEDO; FREITAS, 2009).

Os antimicrobianos encontrados com maior frequência no leite integral pasteurizado pelo método de temperatura ultraelevada (UHT) durante o ano de 2004 a 2005 foram: Aminoglicosídeos (Estreptomicina, Diidroestreptomicina e Neomicina), Cloranfenicol, Betalactâmicos, Tetraciclina. Resíduos de betalactâmicos foram detectados em menos de 1% das amostras de leite, em 2003 e 2% foram positivas para Tetraciclina. Quanto ao Cloranfenicol, cujo uso em animais não é permitido, e qualquer valor é considerado violação, foram relatadas 5% de amostras de leite UHT suspeitas, entretanto os resultados não foram confirmatórios. Para análise de aminoglicosídeos 16% das amostras foram positivas, porém em teores abaixo do LMR (ANVISA, 2006).

O consumo de leite com resquícios de Cloranfenicol além das alergias pode induzir discrasia sanguínea, anemia aplásica e neurite óptica. Entretanto foi seu efeito idiossincrático, com inibição irreversível da medula óssea, que persuadiu a *Food and Drug Administration* (FDA) a proibir seu uso em animais de abate ou destinados à produção de leite (SETTEPANI, 1984; SUNDLOF, 1989).

Os antibióticos betalactâmicos estão entre os mais usados em todo o mundo seja na medicina humana ou animal (SINDAN, 2003, 2004), e os maiores índices de resistência foram constatados com o uso da penicilina (NADER FILHO et al., 1986; LANGONI et al., 1991; DOMINGUES; PADOVANI; DOMINGUES, 1994; COUTINHO et al., 2006; NADER FILHO et al., 2007).

Estima-se que acima de 10% da população seja alérgica às penicilinas e seus metabólitos, e entre 5 a 10% da população apresenta reações anafiláticas com o consumo de apenas 1 parte por bilhão (ppb) desse fármaco (JONES, 1999). Rosanove (1960) informou sobre um paciente que apresentou vesículas e erupções na pele e mucosa oral após a ingestão de leite contendo 0,05 UI/mL de penicilina.

Os resíduos de antibióticos no leite são normalmente encontrados em concentrações muito baixas (ppb) e este fato aliado à grande diversidade de drogas que podem ser utilizadas, dificulta a sua detecção. No entanto, por sua relevância, há diversos métodos disponíveis para a identificação de resíduos no leite. Os métodos para detecção de resíduos de antimicrobianos em alimentos baseiam-se em três princípios básicos: o efeito direto sobre um microrganismo teste; o reconhecimento da forma tridimensional molecular, utilizado em técnicas imunológicas e o uso das características físico-químicas dos antimicrobianos, que fundamentam técnicas cromatográficas e/ou espectrométricas (PETZ, 1996).

As técnicas microbiológicas apresentam desvantagens como a baixa seletividade na identificação do antimicrobiano; limites restritos de detecção; tempo e incidência de resultados falsos positivos (MARTIN; MORAGA, 1996; NEUBAUER, 1998; MCINTOSH; SHELDON, 2002,).

Por outro lado, os métodos físico-químicos, como os que empregam a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, embora complexos, onerosos e demorados, possuem maior sensibilidade e seletivamente adequados para quantificar níveis muito baixos de resíduos, o que tem garantido seu uso, principalmente para a confirmação de amostras positivas em métodos de triagem (MOATS; HARIK-KHAN, 1995; MITCHELL et al., 1998).

## **2.4. 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 o tratamento da mastite, o problema de resistência dos microrganismos acentuou-se pelo uso indiscriminado e inadequado de antibióticos (COSTA et al., 1996; OLIVEIRA, 2006).

Atualmente é evidente a preocupação com o desenvolvimento de microrganismos multirresistentes, especialmente resistência bacteriana em agentes patológicos de potencial zoonótico (OLIVEIRA; GOMES; VELLOSO, 2000).

O problema crescente da resistência de bactérias patogênicas em humanos já há alguns anos é relacionada ao uso inadequado e indiscriminado de antibióticos (COHEN, 1992; NEU, 1992; WEY, 1996). Como consequência, diferentes drogas do arsenal terapêutico clássico e mesmo de desenvolvimento recente vem se tornando ineficientes.

O fenômeno da resistência bacteriana a diversos antibióticos e agentes quimioterápicos impõe sérias limitações às opções para o tratamento de infecções bacterianas, representando uma ameaça para a saúde pública. Esta resistência aumenta rapidamente por meio de transferência genética, atingindo algumas das principais bactérias Gram positivas, como enterococos, estafilococos e estreptococos (FRANCO; WEBB; TAYLOR, 1990; MITCHELL; YEE, 1995; COSTA et al, 1999; BLACK, 2002).

Segundo Bogaard, London e Stobberingh (2000) citados por Nascimento; Maestro; Campos (2001) a tendência é o agravamento dos quadros de resistência, especialmente nos casos de patógenos comuns aos animais e humanos.

O fenômeno crescente da resistência bacteriana é caracterizado por refratariedade parcial ou total dos microrganismos ao efeito do antibiótico. É uma condição natural e inevitável, pois ao se usar antimicrobianos, sempre aparecerão bactérias que se tornarão resistentes, porém, a utilização correta dos antimicrobianos, pode causar um menor índice de resistência (TORTORA; FUNKE; CASE, 2009). O emprego de baixas dosagens e a não determinação dos níveis de sensibilidade dos agentes etiológicos aos antimicrobianos são os principais fatores catalizadores da resistência bacteriana (ANDRADE, 2001).

A resistência pode estabelecer-se entre microrganismos de uma mesma população ou de diferentes populações como da microbiota animal para humana e vice-versa (NIJSTEN et al. 1993).

A grande capacidade de adaptação está associada à estrutura genômica, que garante a troca de genes entre bactérias, usando para isso elementos não cromossômicos: plasmídeos, transposons e até bacteriófagos (transdução). Estes últimos podem destruir as bactérias hospedeiras, carrear e espalhar os genes bacterianos (FRANCO; WEBB; TAYLOR, 1990, MITCHELL; YEE, 1995, COSTA et al., 1999, BLACK, 2002).

Ocorre resistência quando a bactéria adquire genes que permitem a interferência no mecanismo de ação do antibiótico por mutação espontânea de DNA ou por transformação e transferência de plasmídeos. A causa primária é a mutação espontânea e a recombinação dos genes (reprodução), que criam variabilidade genética sobre a qual atua a seleção natural, dando vantagens aos mais aptos. As drogas atuam como agentes seletivos, favorecendo as bactérias resistentes presentes na população. Os microrganismos resistentes sobrevivem e se multiplicam selecionando os mais aptos (BLACK, 2002).

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).

Há evidências de que o tratamento de animais com antibióticos torne seus produtos e derivados, fonte para resistência aos antibióticos na espécie humana (OLIVEIRA, 2006).

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 com melhor eficácia foram a gentamicina (98,6%) e a eritromicina (98,6%), seguidos pela estreptomomicina (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 há pelo menos dois antibióticos ou quimioterápicos e que nenhum destes princípios ativos, agindo isoladamente, poderia ser ativo contra qualquer uma das cepas experimentadas.

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

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. Santos; Leal e Rossi (2006) avaliando o perfil de sensibilidade de *Staphylococcus* spp. na região de Uberlândia-MG, observaram que 73,68% dos isolados apresentavam resistência à eritromicina e 76,92% dos isolados de enterobactérias foram resistentes à amoxicilina.

Fontana, Giannini e Leite (2010), analisando 174 vacas leiteiras da região de Jataí - GO, relataram predomínio de 31 amostras contendo *S. aureus*, 100% das amostras foram resistentes à oxaciclina, penicilina e ampicilina, e 90,3% das cepas apresentavam o gene da betalactamase.

O perfil de sensibilidade de bactérias isoladas de 163 ovelhas mastíticas indicou 10,46% de sensibilidade a novobiocina, 16,29% à eritromicina, 17,43% à lincomicina e 19,77% à amoxicilina (DRESCHER et al., 2010).

Dias et al. (1985) analisaram 154 amostras de alimentos, entre hortaliças, leite e merenda escolar, destas isolaram 400 tipos de bactérias Gram negativas, em sua maioria enterobactérias. Seis apresentaram sensibilidade a sulfadiazina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, canamicina, ampicilina, ácido nalidíxico. Todas foram sensíveis à gentamicina e 27,6% foram sensíveis à sulfadiazina.

Ao avaliar o perfil de sensibilidade 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 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 aumento significativo da resistência de *Streptococcus agalactiae* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica às tetraciclina (92%), confirmando relatos de Guérin -Faublée et al. (2002, 2003).

O uso de antibióticos na secagem das vacas vem sendo questionado, por propulsionar essa resistência. Costa (1995) e Barberio, Gietl e Dalvit (2002) citaram crescente resistência no transcorrer dos anos no Brasil e no mundo. Entretanto Erskine et al. (2001), Makovec e Ruegg (2003) relatam não haver indícios do desenvolvimento de resistência a antibióticos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

De acordo com as diretrizes da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Protocolo nº 23083000/2012). Um consentimento livre e esclarecido foi assinado pelos proprietários e os procedimentos e coletas foram permitidos pelos mesmos.

#### 3.1. Local e amostragem

O presente trabalho foi desenvolvido em continuidade a trabalhos de extensão e pesquisa realizados em propriedades da região Sul Fluminense.

Em virtude do grande número de propriedades com problemas de qualidade do leite, optou-se pelo estudo em unidades de produção de leite (UPL) fornecedoras a uma única cooperativa com sede no município de Resende, Rio de Janeiro.

As propriedades foram escolhidas com base em uma análise realizada em maio de 2011 em 18 UPL que compunham uma rota de coleta de leite a granel no Município de Resende, RJ. Assim, esse estudo foi realizado de março a junho de 2012, em duas etapas e três coletas em seis das dezoito propriedades visitadas em maio de 2011.

#### 3.2. Critérios de seleção - Adequação aos critérios de qualidade

Inicialmente foram analisadas 18 amostras de leite cru, provenientes de 18 tanques de refrigeração por expansão, de 18 propriedades no final de maio de 2011.

As amostras numeradas segundo a ordem de coleta e localização na rota do caminhão foram coletadas em tanques de expansão individuais nas respectivas propriedades. O leite foi armazenado em frascos contendo o conservante bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol na concentração de 8 mg do ingrediente ativo) e sem conservantes, acondicionados em caixa isotérmica contendo gelo e encaminhadas para análises de composição (teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e extrato seco desengordurado - %/mm), contagens de células somáticas (CCS - células x mil/mL) e pesquisa de resíduo de antibióticos (positivo ou negativo) na Clínica do Leite, Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz – Universidade de São Paulo, Piracicaba – São Paulo.

As amostras foram coletadas em um único dia, contando-se com a colaboração e participação do responsável técnico pela linha de coleta para abordagem aos produtores.

Dessa análise inicial, foram selecionadas seis unidades de produção cujo leite de conjunto tenha apresentou CCS acima de 750 mil cels/mL, e como critério adicional que fossem próximas, de forma a facilitar as visitas seguintes.

#### 3.3. Caracterização das Unidades de Produção

Em março de 2012, foi aplicado um formulário, sob a forma de *check list*, buscando maior conhecimento das condições de produção em cada propriedade.

Informações relativas à propriedade (área, número de animais, tipo de mão de obra, finalidade da produção), produção (vacas em lactação, volume de produção), sanidade do rebanho (vacinas, histórico de enfermidades, controle de ecto e endoparasitos) manejo nutricional, higiênico e sanitário dos animais, bem como frequência de coleta do leite pelo

caminhão; resfriamento do leite na propriedade; formas de identificação, prevenção e tratamento de mastite foram obtidas por meio de entrevista aos proprietários.

Adicionalmente foram abordados aspectos relativos às condições das instalações (curral, estábulo, sala de ordenha), higiene ambiental (frequência da limpeza), água (origem e armazenamento), medidas de limpeza e manejo da ordenha (tipo, número, horário, linha de ordenha, tempo, ordem dos animais, testes para detecção de mastite, pré e pós *dipping*), estado de conservação e higiene dos utensílios, estado dos animais e pessoas envolvidas no processo (Anexo 1).

Cada entrevista foi seguida de visita às instalações para observação *in loco* das condições clínicas e de manejo dos animais, com ênfase nos procedimentos de higienização e manejo da ordenha. Dados divergentes quanto às informações prestadas pelos proprietários e verificadas *in loco* foram registrados, sendo considerados os fatos avaliados.

### **3.4. Mastite: Ocorrência e Etiologia**

Após a observação preliminar das condições higiênicas e sanitárias dos rebanhos, foi realizado entre abril e junho de 2012, em três visitas com intervalos aproximados de 20 dias, um levantamento dos casos de mastite clínica por meio do exame físico da glândula mamária e teste da caneca telada.

Nos mesmos momentos, amostras de leite de quartos mamários de vacas com mastite clínica, foram coletadas, em frascos esterilizados, após lavagem dos tetos com água, secagem com papel toalha e desinfecção da teta e do óstio com algodão embebido em álcool a 70% e descarte dos primeiros jatos (PHILPOT; NICKERSON, 1991).

As amostras assim obtidas foram mantidas em recipientes isotérmicos contendo gelo durante o transporte e encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia da UFRRJ para cultura, isolamento e identificação de agentes microbianos e testes de sensibilidade frente aos princípios ativos contidos nas formulações antimastíticas disponíveis no comércio.

Os índices de mastite subclínica foram estimados em abril, maio e junho, com base na CCS como proposto por Schukken et al. (2003), Bradley e Green (2005), Valde, Osteras e Simense (2005), Lievaart, Kremer e Barkema (2007) e no Brasil por Gigante (2004) e Bueno et al. (2004).

### **3.5. Leite cru refrigerado**

As amostras de leite do conjunto, resultado final do processo total de ordenha em cada propriedade foram coletadas, em abril, maio e junho de 2012, em frascos esterilizados, diretamente da parte superior e central do tanque de expansão, após agitação por cinco minutos, utilizando-se coletor de aço inoxidável e destinadas a diferentes análises.

#### **3.5.1. Composição, CCS, CBT, resíduo de antibióticos e estabilidade**

Alíquotas de 40 mL de leite foram acondicionadas assepticamente em recipientes plásticos específicos, previamente identificados, contendo os conservantes bronopol e azidiol, bem como em dois frascos isentos de conservantes.

Os frascos foram homogeneizados por inversão, identificados com o nome ou número da respectiva propriedade, mantidos sob refrigeração e encaminhados por Sedex, a  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ , em no máximo 48 horas, para análises em Laboratório da Rede Brasileira de Qualidade do Leite

(Clínica do Leite - Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz – Universidade de São Paulo, Piracicaba) por métodos de referência (BRASIL, 2002).

Para a determinação de composição (gordura, proteína total, lactose, sólidos totais e extrato seco desengordurado-ESD), amostras contendo bronopol foram analisadas por espectrofotometria no infravermelho (valores permitidos e recomendados pela International Dairy Federation-IDF 141C) (BIGGS; JOHNSON; SJAUNJA, 1987).

Contagem de células somáticas realizada por citometria de fluxo em contador eletrônico, de acordo com IDF 148-2. Os parâmetros de composição foram expressos em porcentagem (% m/m) e a CCS em unidades x mil/mL.

Amostras adicionadas de azidiol foram analisadas quanto à qualidade microbiológica, (Contagem Bacteriana Total - CBT) por meio da determinação unidades formadoras de colônia por mililitro de leite (UFC/mL), por citometria de fluxo.

Alíquotas das amostras isentas de conservantes foram encaminhadas respectivamente para determinação da presença de resíduos de antibióticos (positiva ou negativa) realizado com o teste microbiológico comercial Delvotest SP-NT (Cap-Lab Indústria e Comercio Ltda), que se baseia pela inibição do crescimento de bactérias como: *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 e alterações no pH (COELHO, 2003; DIETRICH, 2008).

As análises de CCS, CBT, resíduo de antibiótico e composição foram efetuadas na Clínica do Leite (ESALQ-USP), a estabilidade ao etanol 78% no laboratório de Pesquisas Clínicas na UFRRJ, para isolamento e identificação de agentes microbianos nos Laboratórios de Bacteriologia e Micologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária (DMIV) do Instituto de Veterinária (IV) / UFRRJ e a um laboratório especializado em análise microbiológica de leite em Botucatu, São Paulo ("Laboratório de Análises VidaVet").

### **3.6. Isolamento e Identificação de Agentes Microbianos**

Para isolamento bacteriano em alíquotas de leite de vacas com mastite e provenientes dos tanques de refrigeração as amostras foram incubadas à 37°C por 8 horas para a etapa de pré-enriquecimento, e posteriormente semeadas em ágar sangue de carneiro, ágar infusão de cérebro e coração (BHI) e ágar Sabouraud acrescido de Cloranfenicol. Após incubação, se procedeu à avaliação das características morfológicas das colônias isoladas e inócuos individuais foram semeados em meios seletivos e diferenciais, para observação dos aspectos fenotípicos característicos dos gêneros (CHI; ANDRADE; FERREIRA, 2004; QUINN et al, 2005).

Para as amostras suspeitas de enterobactérias, as seguintes provas de identificação foram realizadas: comportamento em ágar tríplice açúcar-ferro, 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 por meio do isolamento em meio seletivo, potencial de oxidação, e a identificação pela hidrólise de esculina e hipurato. Para o gênero *Corynebacterium* spp. foi efetuado o crescimento em meio seletivo acompanhado das provas bioquímicas como teste de CAMP, hidrólise de gelatina e amido, urease, catalase. Após a identificação presuntiva das colônias de *Staphylococcus* spp., estas foram submetidas ao Gram, teste da catalase, hidróxido de potássio 3%, prova da coagulase livre, testes Voges-Proskauer, urease e redução de nitratos (KONEMAN et al., 2008).

Para isolamento de fungos e leveduras alíquotas de cada amostra foram submetidas aos seguintes procedimentos: homogeneização e diluição em tampão salina estéril cloreto de

sódio (NaCl a 0,85% em solução aquosa) até a diluição  $10^{-2}$ . Uma alíquota de 1 mL da parte não diluída e das respectivas diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  foram semeadas em triplicata nos meios Sabouraud dextrose a 4% e meio com dopamina, com incubações a 26°C, 32°C e 37°C. As leituras foram diárias até o 10º dia.

As colônias emergentes passaram a ser identificadas e, algumas, por necessidade, foram separadas para provas posteriores de identificação. A identificação de fungos com características de filamentosos foi baseada em Hoog e Guarro (2000) e deu-se pela junção de elementos macro morfológicos tais como características de relevo, textura e coloração das colônias com a análise micro morfológica das colônias.

Nas análises micro morfológicas, foram preparadas lâminas empregando lactofenol azul de algodão ou clarificante (hidróxido de sódio - NaOH a 20% em solução aquosa), conforme fossem respectivamente de fungos hialinos ou escuros. Levou-se em conta a presença de conídios característicos que permitissem uma identificação imediata e/ou a presença de outras estruturas como conidióforos ou estípedes, vesículas, fiálides, esporângios e esporangióforos, esporangiosporos e outras estruturas de importância. Também foram verificados os tipos de arranjos de conídios ao redor de conidióforos ou de outras estruturas, tipos de ramificações e aspectos da conidiogênese. Para tal, em algumas situações foi necessário o emprego de cultivo em lâmina para que se observassem as estruturas de forma íntegra e fosse possível fazer o acompanhamento do crescimento.

As identificações de fungos unicelulares foram realizadas prioritariamente com base em chaves taxonômicas de Kurtzman e Fell (1998) e Kurtzman; Fell; Boekhout (2011), e complementarmente utilizando o protocolo de identificação de leveduras do Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais (DMIV – IV – UFRRJ).

Após triagem inicial que permitiu separar leveduras de fungos filamentosos, estas foram submetidas a provas bioquímicas e fisiológicas, tais como microcultivo em meio “*corn meal*” para verificação de produção de pseudohifas, clamidoconídeos e blastoconídeos, prova de tubo germinativo, cultivo em CHROMagar® Candida (CHROMagar, França) produção de urease, síntese de amido, crescimento na presença de cicloheximida, principalmente provas de auxanograma ou assimilação de fontes carbonadas e nitrogenadas (aproximadamente 24 fontes), zimograma (fermentação de fontes carbonadas – 7 fontes) e demais provas complementares.

De posse dos dados obtidos, foram empregadas chaves taxonômicas para identificação dos isolados. Assim, para o gênero *Cryptococcus*, a triagem inicial foi realizada pela pigmentação em meio contendo dopamina (pigmentação marrom das colônias para as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* e fraca para *Cryptococcus humicolus* e todas as demais espécies) e a micro morfologia característica denotada por células em sua maioria esféricas, ovaladas ou oblongas providas de cápsula, realizando-se prova de urease, prova de fermentação negativa e provas de assimilação, sendo particularmente importante nas chaves a assimilação positiva de inositol e prova de urease positiva.

### **3.7. Testes 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, 2003), utilizando-se as bases dos produtos comerciais disponíveis para tratamentos clínicos para amostras procedentes de vacas com mastite e diferentes antimicrobianos para amostras procedentes do tanque de expansão.



Os princípios ativos utilizados em testes de sensibilidade foram: amoxicilina, amicacina, amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, cefalexina, cefalotina, cefoperazone, ceftiofur, danofloxacina, doxiciclina, enrofloxacina, espiramicina, estreptomicina, gentamicina, neomicina, oxacilina, penicilina G + novobiocina, sulfametoxazol + trimetoprim e tetraciclina.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Leite cru refrigerado – Caracterização das Propriedades

#### 4.1.1. Composição

A análise inicial realizada com a colaboração do responsável técnico pela coleta de leite nas propriedades revelou valores adequados de gordura (mínimo 3,0g/100g), proteínas (mínimo 2,9g/100g), lactose (mínimo 4,0g/100g) sólidos totais (ST – mínimo 11,7g/100g) e extrato seco desengordurado (ESD - mínimo 8,4) em todas as unidades de produção avaliadas (Tabela 02).

Pelas características de composição não foram evidenciadas alterações relevantes para estes critérios de qualidade os quais atenderam aos requisitos estabelecidos pela IN 51/2002 e IN 62/2011.

**Tabela 02:** Composição centesimal de amostras de leite de tanques de expansão individuais de 18 unidades de produção na zona rural do município de Resende, RJ em maio de 2011.

Amostra	Gordura	Proteína	Lactose	Sólidos Totais	ESD*
1	3,14	3,14	4,47	11,73	8,59
2	3,58	3,26	4,19	12,01	8,43
3	4,12	3,32	4,43	12,82	8,70
4	3,5	3,19	4,56	12,21	8,71
5	3,27	3,17	4,54	11,94	8,67
6	3,92	3,52	4,43	12,82	8,90
7	3,49	3,21	4,43	12,10	8,61
8	4,03	3,20	4,49	12,70	8,67
9	3,81	3,25	4,34	12,40	8,59
10	3,95	3,56	4,45	12,95	9,00
11	4,52	3,66	4,38	13,49	8,97
12	4,19	3,69	4,53	14,07	9,18
13	3,94	3,34	4,47	12,68	8,74
14	3,69	3,49	4,36	12,50	8,81
15	3,69	3,35	4,56	12,59	8,90
16	3,63	3,43	4,43	12,42	8,79
17	3,49	3,32	4,56	12,32	8,83
18	3,45	3,34	4,31	12,04	8,59
<b>Média</b>	<b>3,75</b>	<b>3,36</b>	<b>4,44</b>	<b>12,54</b>	<b>8,76</b>

\* ESD - Extrato Seco Desengordurado

As propriedades selecionadas para estudo em 2012 foram as de número 02, 05, 06, 11, 13 e 14, nas tabelas 02 e 03, correspondentes na nova numeração aos números 01 (02), 02 (13), 03 (11), 04 (05), 05 (06) e 06 (14).

#### 4.1.2. Parâmetros de qualidade

Quanto aos limites de CCS e CBT o leite de apenas uma propriedade (5,5%) (Tabela 03), estaria de acordo com o máximo de 750 mil cels/mL (CCS), estabelecidos pela IN 51 para o período (BRASIL, 2002).

**Tabela 03:** Contagem de Células Somáticas (CCS) e Contagem Bacteriana Total (CBT) em amostras de leite de tanques de expansão individuais de 18 unidades de produção na zona rural do município de Resende, RJ em maio de 2011.

Amostra	CCS (unidades X mil/mL)	CBT (UFC X mil/mL)
1	754	173
2	1350	840
3	1547	430
4	864	135
5	1517	488
6	1571	426
7	1051	181
8	876	143
9	1073	170
10	963	188
11	1639	489
12	1067	184
13	2393	752
14	2598	895
15	914	80
16	1113	125
17	1081	285
18	2689	487
<b>Média</b>	<b>1.392</b>	<b>360</b>

Ao considerar os valores estabelecidos para a última etapa da IN 51/2002 que entraria em vigor em 1º de julho de 2011, onde os limites de 750 mil seriam reduzidos para 400 mil UFC/mL e de 600 mil UFC/mL para 100 mil UFC/mL, respectivamente para CCS e CBT, principalmente de acordo com a CCS, a situação seria pior com 100% de não conformidade.

Dentre as suas principais características, a IN 51 estabeleceu critérios de higiene e saúde da glândula mamária, avaliados por meio da carga microbiana total do leite cru refrigerado e da CCS (limites máximos), mas também determinou o resfriamento obrigatório na fazenda e estabeleceu limites para resíduos de antibióticos no leite. No contexto das

propriedades estudadas, todas dispunham de tanques de refrigeração individuais e adotavam algumas medidas de controle e profilaxia de mastite. Contudo, pode-se afirmar que tais medidas não eram efetivas, tendo em vista os valores elevados de CCS e CBT.

Considerando-se os limites máximos da CCS de 600 mil cels/mL, e ao invés de 750 mil/mL, as quais passaram a vigorar com a IN 62/2011 (BRASIL, 2011) a partir de 1º de janeiro de 2012, o percentual de não conformidade seria igualmente elevado, indicando a necessidade de esforços para controle da mastite e redução da contaminação do leite.

A medida mais drástica seria a suspensão do fornecimento de matéria-prima, aplicável ao produtor com índices inadequados. A dificuldade em se adequar aos padrões estabelecidos, além das penalidades pode levar ao abandono da atividade por parte desses produtores conforme levantado por Winck e Thaler Neto (2009). Neste sentido a IN 62/2011 (BRASIL, 2011) estabelece novos prazos para adequação.

Os dados são consistentes com achados de diferentes autores ao analisarem a adequação do leite produzido em diferentes regiões do Brasil quanto aos critérios estabelecidos pela IN 51/2002. Valores elevados de CCS foram descritos desde a entrada em vigor da IN 51 em 2005 em diferentes regiões do Brasil (PICININ, 2003; NERO et al., 2004; ARCURI et al., 2006; PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006; BRAGA et al., 2006; MARTINS et al., 2006; WINCK; THALER NETO, 2009, BELOTI, et al 2011).

Dados do Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa que analisa mensalmente amostras de aproximadamente 20 mil rebanhos indicou que 95% e 45% das amostras analisadas estão acima de 100 mil/mL e 400 mil/mL para CBT e CCS, respectivamente. Estes dados subsidiaram a justificativa para adiamento dos novos critérios de qualidade e a substituição da IN 51/2002 pela IN 62/2011.

A realidade dos produtores aqui representados, portanto não difere da realidade atual dos sistemas de produção nacional e confirma as observações feitas por Arcuri et al. (2006) ao enfatizarem que o leite produzido em várias regiões do Brasil possui baixa qualidade microbiológica, derivada de práticas inadequadas na obtenção, conservação e transporte.

#### **4.1.3. Resíduos de antibióticos**

Quanto aos limites máximos para resíduos de antibióticos no leite, em apenas uma propriedade foi apontada a presença de antibiótico na amostra analisada, o que sugere o descarte adequado do leite de vacas tratadas com antibióticos intramamários em respeito ao período de carência dos produtos formulados para esta finalidade.

Na produção de laticínios, os resíduos de antimicrobianos agem negativamente na elaboração de queijos, iogurtes e outros derivados lácteos fermentados (VARNAM; SUTHERLAND, 1994; GIGANTE, 2004). Assim, é indispensável para avaliação da qualidade do leite a averiguação de resíduos de antimicrobianos e os limites máximos de resíduos (LMR) segundo as referências impostas pela regulamentação.

Folly e Machado (2001) salientaram que a utilização de métodos rápidos para detecção de resíduos de antibióticos em alimentos de origem animal e a manutenção contínua do controle de qualidade são ferramentas fundamentais à saúde pública. Quanto ao leite, a pesquisa de resíduos deve ser mensal (BRASIL, 2002) e a amostra positiva implica na condenação de todo o efetivo do respectivo produtor ou caminhão tanque, se for o caso.

No Brasil, resíduos de antimicrobianos foram detectados em leite de mistura procedentes de propriedades rurais (MEDEIROS et al., 2004; TETZNER et al., 2005, NUNES; D'ANGELINO, 2007), usinas de beneficiamento (MARTINS; VAZ, 2000, MACEDO; FREITAS, 2009) e comercializados no mercado varejista (FOLLY; MACHADO,

2001, HOTTA, 2003, MACEDO; FREITAS, 2009, MORAIS et al, 2009) em diferentes regiões e estados produtores de leite (NERO et al., 2004; NERO et al., 2007).

De 210 amostras de leite cru, coletadas em quatro regiões produtoras de leite no Brasil (NERO et al., 2007), 24 amostras (11,4%) apresentaram resultados positivos de resíduos de antibióticos, apresentando maior frequência na região de Londrina – Paraná, com 20,6% das amostras contaminadas. Nas demais regiões, foram detectadas amostras positivas em Botucatu – SP, Viçosa - MG e Pelotas – RS.

No norte do Rio de Janeiro dentre 300 amostras de leite examinadas, 13 foram positivas, ou seja, 4,33% (FOLLY; MACHADO, 2001).

Na cidade do Rio de Janeiro foi avaliada a presença de resíduos no leite pasteurizado comercializado. Das 57 amostras de leite dos tipos B e C analisadas 25 (44%) indicaram presença de tetraciclina, duas (3,5%) de betalactâmicos, quatro (7%) de estreptomicina/diidroestreptomicina e seis (10,5%) de tetraciclina e betalactâmicos (MORAIS et al, 2009). Estes dados são recentes e já no período de vigência da IN 51, portanto os achados são mais relevantes do ponto de vista da qualidade do leite no Estado.

Também nos sistemas orgânicos de produção foi evidenciado o problema dos resíduos de antibióticos. No interior do Estado de São Paulo dentre 148 vacas com e sem mastite, provenientes de quatro propriedades orgânicas, a presença de resíduos de antimicrobianos foi observada no leite de quatro animais o equivalente a 2,7% (RIBEIRO et al, 2009).

A detecção de resíduos em uma amostra no presente estudo está, portanto de acordo com dados de levantamentos nacionais em que foram evidenciadas, inclusive porcentagens mais elevadas de amostras com resíduos.

## **4.2. Aspectos da Produção**

Por meio de inquérito aplicado aos produtores, obtiveram-se as seguintes informações sobre os sistemas de produção nas seis UPL selecionadas para a segunda etapa do estudo.

Em todas as propriedades os rebanhos eram constituídos por animais da raça holandesa ou mestiços, com 35 a 85 vacas em lactação, mantidas em sistema semi-intensivo, com produção diária entre 450 e 1650 litros de leite, em duas ordenhas diárias (04:00 a 05:30 e 14:00 a 15:30h); ordenhadeiras mecânicas em sistema fechado (4/6), balde ao pé (1/6) ou ordenha manual (1/6); com (3/6) ou sem (3/6) a presença do bezerro, e o leite armazenado em tanques de refrigeração individuais com capitação diária (4/6) ou em dias alternados (2/6).

Com manejo nutricional e sanitário, relativamente semelhantes, as condições gerais dos animais em lactação foram avaliadas como boa, sendo relacionadas em três propriedades casos recentes de aborto e retenção de placenta, e em outra, um grande número de bezerras de diferentes idades acometidos por doença respiratória e diarreia.

Os proprietários com no mínimo ensino médio completo, sendo dois técnicos em agropecuária residiam nas propriedades e participavam do processo de produção, sendo três propriedades com mão de obra exclusivamente familiar e três com participação de mão de obra contratada. Nestas propriedades, duas ou três pessoas estavam envolvidas no processo de ordenha.

Ainda que com proprietários relativamente instruídos, as maiores limitações ao processo de produção foram o manejo e as condições de higiene da ordenha. Fato que se comprova pelo desconhecimento em todas as propriedades dos índices de mastite clínica e subclínica nos rebanhos, com exceção a uma propriedade em que o proprietário e a mãe eram responsáveis pela ordenha, realizada em condições satisfatórias em que imediatamente foram indicadas as vacas com mastite clínica na primeira avaliação.

Em nenhuma propriedade se realizava testes para detecção de mastite (caneca telada e/ou o CMT) sistematicamente, e a ordem na ordenha era estabelecida por produção (2/3), em lotes com critérios não definidos (3/6) ou por ordem de parição (1/6), independente da ocorrência de mastite (6/6). Três produtores informaram realizar anotações dos casos de mastite, mas efetivamente as anotações só foram verificadas em uma propriedade.

A higiene ambiental e da ordenha foram distintas. Em uma propriedade a higiene do ambiente e da ordenha foi considerada ruim (sequer havia água no curral e nenhuma medida de higiene antes e após ordenha era realizada) e em uma a higiene geral foi considerada adequada (os tetos eram lavados com água clorada e secos com papel toalha antes da ordenha e imersos em solução iodada após a ordenha). Em quatro a higiene era regular. Nestas propriedades, a limpeza dos tetos antes da ordenha não era sistemática e a realização do pós *dipping* era ocasional ou em apenas alguns animais.

Ordenha incompleta com leite residual foi relatada em duas propriedades, mas efetivamente identificada nas quatro que utilizavam ordenha mecânica canalizada. Exceto na propriedade com ordenha tipo balde ao pé, nas demais era comum o uso de “hormônio” (ocitocina) para a “descida do leite”, pelo menos em algumas vacas.

Adicionalmente em apenas uma UPL as condições dos animais e pessoas envolvidas na ordenha foi considerada satisfatória. Em nenhuma havia tarefas ou atividades pré-estabelecidas durante a ordenha. Com duas ou mais pessoas envolvidas na ordenha, a mesma pessoa era responsável pela contenção e ordenha, e as mãos eram lavadas entre uma vaca e outra, somente em uma propriedade, a que o dono e mãe eram responsáveis pela ordenha.

Os tratamentos em casos identificados de mastite clínica (pelas alterações das características do leite ou sinais evidentes de inflamação da glândula mamária) consistiam na aplicação de formulações intramamárias referidas como “a mais eficiente”, por dois ou três dias consecutivos, e eventualmente produtos injetáveis ou tratamento estendido (cinco dias) em casos refratários ao tratamento intramamário anterior. A escolha do produto não atendia a nenhum critério técnico em todas as UPL estudadas, e eventualmente mais de um produto com a mesma base era utilizado para tratamento do mesmo animal.

Todas as UPL dispunham de sala de espera de dimensão adequada ao número de animais do rebanho, curral ou sala de ordenha de alvenaria (2/6) ou madeira (4/6), com piso de cimento (6/6), pé direito baixo (4/6) ou médio (2/6), com ventilação boa (6/6) e pouco ou nenhum com sol direto (6/6). Em todas as propriedades os animais recebiam alimentos concentrados (farelo, polpa cítrica e cevada) durante a ordenha, e as vacas permaneciam em espera após serem ordenhadas, mas somente em uma era fornecida ração após a ordenha.

Como as medicações utilizadas para tratamento de enfermidades diversas entre abril e junho foram informadas: Excenel® (sal sódico de ceftiofur, antibiótico de amplo espectro), Quinolon® (quinolona, antibiótico de amplo espectro, derivado do ácido nalidíxico), Tilozina (solução injetável de tilosina 20%, antibiótico de amplo espectro), Terramicina®/LA (solução injetável de oxitetraciclina dihidratada, antibiótico de amplo espectro), Tetraciclina (cloridrato de tetraciclina, antibiótico de amplo espectro), Pentabiótico / Pencivet (penicilina, antibiótico de amplo espectro), Tribrissem® (associação quimioterápica de trimetoprim e sulfadiazina), Sulfatrim® (associação quimioterápica de trimetoprim e sulfametoxazol), Estreptomax® (sulfato de estreptomicina, antibiótico de amplo espectro), Ganazeg® (diacetato de diminazene, quimioterápico sintético, babesicida), Imizol® (dipropionato de imidocarb, quimioterápico, antiparasitário – anaplasmicida e babesicida).

Para tratamento de mastite foram utilizados: Mastizone Plus Lactação® (sulfato de gentamicina 150 mg, cloridrato de bromexina 50 mg), Vaseclox MA® (cloxacilina sódica 200 mg + amoxicilina trihidratada 75 mg + prednisolona 10 mg), Cobactan VL® (sulfato de

cefquinoma 75 mg), Gentatec Mastite® 250 mg (sulfato de gentamicina 250mg), Gentocin Mastite® (sulfato de gentamicina 250 mg), Vetmast Plus VL® (cefalexina monohidratada 100 mg + sulfato de neomicina 100 mg + nitrato de miconazol 200 mg + prednisolona 10 mg), Rilexine 200® (cefalexina 100 mg + neomicina 100 mg + prednisolona 10 mg).

No conjunto; as medidas de higiene e estratégias adotadas para controle e profilaxia da mastite foram insatisfatórias, e em geral justificadas pelos proprietários aludindo ao grande volume de trabalho e ritmo acelerado da ordenha, inviabilizando os cuidados adequados.

### 4.3. Mastite

#### 4.3.1. Ocorrência

Do total de vacas em lactação, aproximadamente 390, nos seis rebanhos estudados, representando um rebanho total de 545 animais, a CCS do leite do conjunto indicou prevalência variável de mastite entre os rebanhos. Conforme evidenciado por Lievaart; Kremer; Barkema (2007) que avaliaram a relação entre CCS do leite do rebanho e ocorrência de mastite subclínica em vacas individuais, os valores obtidos indicaram a presença de mastite subclínica em todos os rebanhos, sempre com mais de 30% dos quartos mamários acometidos (mais de 400 mil cels/mL). Em duas propriedades a CCS indicava que mais de 48% (500 mil a 1 milhão de cels/mL), das vacas estariam com mastite subclínica, caracterizando a mastite como epidêmica nestes rebanhos.

Considerando a média de vacas em lactação no período (390), foram altas a incidência e a prevalência de mastite clínica entre os rebanhos (Tabela 04). A porcentagem de vacas acometidas variou de 2,9% a 36%, respectivamente nas UPL 04 e 06. Destaca-se que na propriedade 02, a porcentagem de animais acometidos foi baixa, porém o acompanhamento não foi efetivo. Nesta propriedade, antimastíticos eram usados sempre que alguma alteração era evidenciada no leite ou na glândula mamária, não necessariamente resultando em cura dos animais, mas certamente reduzindo o grau da infecção de forma que as mastites clínicas foram pouco evidenciadas.

**Tabela 04:** Índices de mastite clínica em seis rebanhos no município de Resende, RJ em abril, maio e junho 2012 em relação ao número (média) de vacas em lactação e caracterização da infecção.

Caracterização	Propriedades						Total	Média
	01	02	03	04	05	06		
1ª avaliação	4	5	7	2	2	9	29	4,8
Nova	0	6	6	0	3	18	33	5,5
Crônica	2	2	3	1	1	11	19	3,2
Total de casos	4	11	13	2	5	27	62	10,3
Vacas lactação	35	85	85	70	40	75	390	65,0
<b>Incidência (%)</b>	<b>0</b>	<b>7,1</b>	<b>7,1</b>	<b>0</b>	<b>7,5</b>	<b>24</b>		<b>2,4</b>
<b>Prevalência (%)</b>	<b>11,4</b>	<b>12,9</b>	<b>15,3</b>	<b>2,9</b>	<b>12,5</b>	<b>36</b>		<b>15,9</b>

Embora não seja possível determinar com exatidão o número de casos ocorridos nos intervalos das avaliações, visto que os casos e respectivos tratamentos não eram devidamente

documentados pelos proprietários, sendo considerados apenas os casos diagnosticados por ocasião das visitas, as novas infecções (33 casos) foram relevantes nestes rebanhos.

Segundo Fonseca e Santos (2000) o nível internacionalmente aceito de mastite clínica é em torno de 1%, valor este bem inferior ao encontrado no presente trabalho (média 15,9%) sendo que o rebanho que apresentou menor número de casos, 2,9% de animais acometidos ainda sim, estava acima do estipulado. Destaca-se que este estudo foi conduzido em UPL com altas CCS pressupondo-se alta ocorrência de mastite, confirmada pelo número de casos identificados.

O índice de mastite clínica, 62 vacas acometidas em um ou mais quartos mamários (15,2%), equivalente a 11,4% do total de vacas dos rebanhos foi bastante elevado, corroborando a correlação positiva entre a CCS e prevalência de mastite.

Os índices foram bastante superiores aos evidenciados por diferentes autores como Oliveira et al. (2009) que detectaram 1,63% das vacas com mastite clínica em dois rebanhos leiteiros especializados na bacia leiteira de Tabuleiros Costeiros, de Sergipe; Ribeiro et al. (2003) e Ribeiro et al. (2006) que detectaram respectivamente, 1,5% e 1,22% de quartos mamários afetados em rebanhos leiteiros na região sul do Estado do Rio Grande do Sul e Oliveira et al. (2011b) que registraram 1,3% de mastite clínica na bacia leiteira do município de Rondon do Pará. Foi também superior aos 7% de mastite clínica em Bambuí - MG, em animais mestiços (Holandês-Gir) obtidos por Pinheiro et al. (2009) e 5,8% de mastite clínica no estado de Mato Grosso relatados por Martins et al. (2010).

Como neste estudo em que as condições insatisfatórias de higiene e ineficácia dos métodos de diagnóstico, controle e tratamento da mastite justificam o grande número de animais acometidos, diferentes pesquisas demonstraram que a alta prevalência da mastite está associada às más condições de higiene durante a ordenha (COSTA et al., 1985; LAFFRANCHI et al., 2001; FERREIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009).

Os casos identificados indicam alta prevalência (62/390) e incidência (33 novos casos) da doença durante o período de avaliação, particularmente em cinco propriedades. Por outro lado, nas propriedades 01 e 04, em que foram diagnosticados, respectivamente quatro e dois casos de mastite no início da avaliação, nenhum novo caso foi registrado.

Na propriedade 01, os animais foram tratados e duas que não se recuperaram foram secas. Na propriedade 04 uma vaca permaneceu com a forma crônica, sendo eliminada do rebanho e uma iniciou o período seco com a forma clínica. Na propriedade 05, com duas vacas diagnosticadas em abril, três novos casos foram diagnosticados e tratados (maio), e uma manteve-se com mastite até a última avaliação. A propriedade 06 destacou-se pelo grande número de animais doentes na primeira avaliação (9) e 18 novos casos, sendo sete prováveis reinfecções. Ao final da avaliação, nesta propriedade, 11 animais eram portadores crônicos.

De 390 vacas avaliadas quanto aos casos clínicos de mastite, 29 (7,4%) iniciaram o período de observação já doentes, 33 (8,5%) tornaram-se doentes neste período, 19 (4,9%) mantiveram a forma crônica (não consideradas as vacas que entraram no período seco com mastite, portanto afastadas dos rebanhos) e a maioria se recuperou após tratamento.

Em todas as UPL casos clínicos não tratados ou tratados de forma não eficaz mantiveram-se como casos crônicos, perpetuando os eventuais agentes no rebanho, sendo que muitas vacas em avaliações seguintes mantiveram-se doentes, porém com agentes diferentes sendo isolados.

A dinâmica da infecção mamária nestas propriedades ressalta a relevância do acompanhamento técnico e orientação / qualificação dos produtores, bem como evidenciam a dificuldade da prevenção de novas infecções e tratamento adequado dos casos clínicos, especialmente os crônicos.



### 4.3.2. Etiologia

De 62 casos de mastite clínica foram coletadas 83 amostras correspondentes aos quartos mamários acometidos nos diferentes momentos. Destas foram isolados 134 agentes microbiano sem 74 amostras positivas ao isolamento (89,15%), sendo 27 fungos e leveduras e 107 bactérias (Tabela 05). Os isolamentos confirmaram a importância dos agentes bacterianos na etiologia e epidemiologia do processo infeccioso da glândula mamária como destacado por Anderson, Hul e Pugh (2004) dentre outros.

**Tabela 05:** Agentes bacterianos (números absolutos e porcentagem) isolados de 62 casos de mastite clínica, em seis rebanhos no Município de Resende, RJ, em abril e maio de 2012.

Agentes isolados	Propriedades						Total	%
	01	02	03	04	05	06		
<i>Corynebacterium bovis</i>	2	1	0	0	0	1	4	3,7
<i>Enterobacter</i> spp.	1	1	0	0	0	0	2	1,9
<i>Enterococcus</i> spp.	0	0	0	0	0	3	3	2,8
<i>Escherichia coli</i>	4	0	6	0	0	6	16	15
<i>Klebsiella</i> spp.	0	2	3	0	0	7	12	11,2
<i>Micrococcus</i> spp.	0	0	1	1	1	3	6	5,6
<i>Pseudomonas</i> spp.	0	1	2	0	2	5	10	9,3
<i>Serratia marcescens</i>	0	0	0	0	0	1	1	0,9
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	4	4	1	0	6	16	15
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	1	2	0	0	4	9	8,4
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0	0	0	0	1	1	2	1,9
<i>Staphylococcus hyicus</i>	0	1	0	0	0	3	4	3,7
<i>Staphylococcus warneri</i>	0	0	0	0	1	0	1	0,9
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2	0	1	1	0	12	16	15
<i>Streptococcus bovis</i>	0	0	1	0	0	1	2	1,9
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	0	2	0	0	0	1	3	2,8
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>20</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>54</b>	<b>107</b>	<b>x</b>

De nove amostras (9/83) não se obteve crescimento e isolamento de agentes microbianos (10,84%), fato que pode estar relacionado segundo Brito (2009) a diferentes causas incluindo o uso recente de antibióticos, eliminação espontânea da infecção, baixa concentração dos patógenos no leite, localização intracelular de determinados patógenos e presença de substâncias inibitórias no leite.

Olde Reikerink et al. (2008) destacaram que entre 15% a 40% das amostras de leite de casos de mastite clínica podem dar resultados negativos na cultura mesmo quando a coleta e os métodos de isolamento são aplicados de maneira correta. Também foi reportado que o isolamento bacteriano pode não ser identificado em mais de 50% das amostras (MAKOVEC; RUEGG, 2002). Recentemente Langoni et al. (2011) relataram cultura negativa em 17,14% amostras de leite de vacas com mastite clínica analisadas. O número de casos em que não se

obteve o isolamento de agentes bacterianos neste estudo foi portanto, menor que o relatado na literatura.

Dos agentes bacterianos envolvidos (Tabela 05) os mais isolados foram *Staphylococcus aureus* (15%), *Streptococcus agalactiae* (15%) e *Escherichia coli* (15%), com 16 isolados cada um. Entre UPL o número de agentes isolados variou de 03 a 54 nas propriedades 04 e 06, respectivamente.

Das 83 amostras submetidas ao isolamento, *S. aureus* foi isolado de 16 (15%). Este valor é divergente de relatos recentes. Zanette, Scapin e Rossi. (2010) observaram 70,9% de *S. aureus*. Ferreira et al. (2007) identificaram o gênero *Staphylococcus* spp. em 74,6% dos casos de mastite. Dos 63 animais avaliados por Saeki et al. (2011), 38 (60,32%) apresentaram crescimento de *S. aureus*. Embora *S. aureus* tenha sido um dos agentes mais frequentes neste estudo, os índices obtidos são inferiores aos relatados na literatura atual.

Microrganismos dos gêneros *Staphylococcus* spp. representaram 29,9% dos isolamentos, coerente portanto com resultados reportados na literatura, onde os índices variam entre 9,1 e 85% (MUELLER et al, 1978; NADER FILHO et al., 1985; LANGENEGGER; FIGUEIREDO; REZENDE, 1986; FREITAS; MAGALHÃES, 1990; BELOTI et al., 1997; MARTINS et al, 2010; OLIVEIRA et al, 2010; BANDOCH; MELO, 2011, SAEKI et al., 2011; MOTA et al., 2012).

Estudos epidemiológicos sobre a etiologia da mastite bovina revelam que os microrganismos de origem contagiosa são os mais prevalentes e, entre esses, o gênero *Staphylococcus* destaca-se por possuir maior frequência em casos clínicos e subclínicos da doença, sendo o *S. aureus* a espécie de maior relevância (ZSCHÖCK et al., 2000).

Os resultados observados para *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. reforçam a importância desses agentes na etiologia da mastite e corroboram o verificado por diferentes autores que se referem ao *Staphylococcus* spp. como o grupo de maior importância e ao *Streptococcus* spp. como o segundo grupo de maior relevância com quatro espécies (*Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. bovis* e *S. uberis*), isoladas na maioria dos rebanhos (HARROP et al, 1975; FERREIRO, et al., 1981; DOMINGUES; PADOVANI; DOMINGUES, 1996; RUOFF, 2003; INNINGS et al., 2005; FERREIRA, 2007; GUILLOUX; CARDOSO; CORBELLINI, 2008; PINHEIRO et al., 2009; AMORIM et al., 2010; MARTINS et al., 2010; SAEKI et al., 2011; MOTA et al., 2012).

Mota et al. (2012) ressaltaram a alta prevalência do gênero *Staphylococcus* spp. em casos subclínicos ou clínicos da mastite e *S. aureus* como a espécie mais comumente envolvida, bem como a elevada prevalência em infecções intramamárias por *Corynebacterium* spp., que neste estudo foi isolado em apenas duas amostras. Portanto a baixa prevalência de *Corynebacterium* spp. difere do observado em estudos conduzidos em diferentes regiões do Brasil (ANDRADE et al., 1998; FILIPPSEN, 1999; BARBALHO; MOTA, 2001; BUENO et al., 2003; FERREIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009, OLIVEIRA et al., 2010; MARTINS et al., 2010; MOTA et al., 2012).

*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae* que representaram 32,7% dos isolados no presente estudo, foram relacionados por Mendonça et al. (1999) como os patógenos contagiosos mais importantes da mastite bovina. Dentre os patógenos ambientais estes autores destacaram o papel da *Escherichia coli* e do *Streptococcus uberis*, esta última espécie não identificada no presente estudo.

Dos agentes ambientais mais comumente relacionados a casos de mastite em bovinos foram isolados: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hyicus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus bovis*, *Staphylococcus warneri*.

Também foram relevantes os isolamentos de *Klebsiella* spp. (11,2%) e *Pseudomonas* spp. (9,3%). Outros agentes bacterianos isolados foram: *Corynebacterium bovis*, *Enterobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Micrococcus* spp. e *Serratia marcerans*.

Patógenos ambientais como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus bovis* foram também relevantes no presente estudo, destacando-se a *E. coli* (15%) como agente etiológico de mastite nos rebanhos estudados.

Recentemente Oliveira et al. (2010) relataram como principais agentes etiológicos associados a 106 casos de mastite no estado da Bahia, o *S. aureus* (42,85%), *Corynebacterium* spp. (42,85%), *Staphylococcus-coagulase* negativos (36,19%), *Pseudomonas* spp. (16,19%), *Escherichia coli* (15,23%), *Bacillus* spp. (15,23%) e *Streptococcus* spp. (13,33). Resultados semelhantes aos obtidos em trabalhos desenvolvidos nos estados do Pará (OLIVEIRA et al. 2011b), Goiás (ANDRADE et al., 1998), Paraná (FILIPPSEN, 1999), Pernambuco (BARBALHO; MOTA, 2001) e São Paulo (LANGONI et al., 1991; BUENO et al., 2003; LANGONI et al., 2011). Os índices reportados por estes autores são mais expressivos que os achados no presente estudo no que se refere aos isolamentos de *Corynebacterium* spp., *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp.

Langoni et al. (2011) reportaram em um total de 1090 tetos de animais de dez propriedades no estado de São Paulo, o isolamento de *Corynebacterium bovis* em 29,5% das amostras de leite provenientes de vacas com mastite subclínica e nenhum isolamento em casos clínicos, além de *Streptococcus dysgalactiae* (11,9%) e *Staphylococcus aureus* (10,48%), e cultura negativa em 36 (17,14%) amostras. Embora com os mesmos agentes isolados no presente estudo, as porcentagens foram divergentes, especialmente quanto ao *C. bovis* e *S. aureus*.

*Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* e *S. warneri* são espécies do grupo de estafilococos coagulase negativos (ECN) frequentemente envolvidos em casos subclínicos de mastite em rebanhos bovinos em todo o mundo (THORBERG et al., 2009). No presente estudo *Staphylococcus chromogenes* não foi identificado, porém foram confirmados 16 isolamentos de ECN.

No Brasil, Lucheis (2011) descreveu a identificação de 97 cepas de ECN causadoras de mastite subclínica, isoladas de dez rebanhos bovinos do Estado de São Paulo e a resistência destes agentes a diferentes antimicrobianos comumente utilizados em medicina veterinária.

Embora por muito tempo considerados patógenos secundários da mastite, atualmente os agentes do grupo ECN são considerados agentes patogênicos emergentes na mastite bovina (PYORALA; TAPONEN, 2009). Taponen et al. (2006) evidenciaram que as infecções por ECN podem levar a altos níveis de CCS no tanque de expansão e aumento de casos de mastite clínica bem como a diminuição da produção de leite. Vale destacar que no presente estudo ECN foram isoladas do leite de 16 vacas com mastite clínica (14,95%), em rebanhos com altas CCS, o que reforça a importância e os prejuízos relacionados por Taponen et al. (2006) e a relevância dos ECN na etiologia da mastite como proposto por Pyorala e Taponen (2009).

Pelos agentes isolados conclui-se que a mastite nos rebanhos estudados foi tanto contagiosa quanto ambiental, evidenciando deficiências diversas no processo da ordenha e manipulação dos animais.

Fungos e leveduras também foram isolados e provavelmente envolvidos na etiologia da mastite nos rebanhos estudados (Quadro 02), sendo isolados de 27 das 83 amostras submetidas ao cultivo (32,5%), os agentes fúngicos isolados foram: *Aspergillus* spp., *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Cladosporium* spp., *Cryptococcus* spp., *Curvularia* spp.,

*Cylindrocarpon* spp., *Geotrichum* spp., *Neurospora* spp., *Rhodotorula* spp., *Scopulariopsis brevicaulis*, *Scopulariopsis* spp. e *Trichosporon* spp.

Dos agentes fúngicos os principais gêneros isolados em amostras de leite de animais com mastite são *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Trichosporon* spp., *Cryptococcus* spp., *Saccharomyces* spp., *Penicillium* spp., *Pichia* spp., *Rhodotorula* spp., *Geotrichum* spp. (ALVAREZ; FLORES, 1962; CARTER; COLE JR, 1995; SPANAMBERG, et al, 2008).

Neste trabalho houve predomínio nos isolamentos dos gêneros *Trichosporon* spp. (29,6%), *Aspergillus* spp. (14,8%) e *Candida* spp. (11,1%)

Diferentemente do que foi reportado por Watts (1998), Brabes et al. (1999) e Sá et al. (2004), o isolamento de fungos e/ou leveduras relacionados na literatura como agentes etiológicos de mastite foi relativamente alto, 17 agentes relacionados com a mastite em 27 isolamentos, representando 63% dos agentes fúngicos isolados. Os principais gêneros envolvidos na mastite micótica segundo Krukowski et al. (2006) são *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp., além de *Geotrichum* spp. e *Trichosporon* spp. os principais agentes isolados no presente estudo (Quadro 02).

**Quadro 02:** Agentes fúngicos isolados de 83 amostras de leite de vacas com mastite clínica, em seis rebanhos no Município de Resende, RJ, em abril, maio e junho de 2012.

Agentes isolados	PROPRIEDADES						Total	%
	1	2	3	4	5	6		
<i>Aspergillus</i> spp.	-	1	-	-	2	1	4	14,8
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	1	1	3,7
<i>Candida tropicalis</i>	1	-	-	-	-	1	2	7,4
<i>Cladosporium</i> spp.	-	-	-	-	-	2	2	7,4
<i>Cryptococcus</i> spp.	-	-	1	-	-	1	2	7,4
<i>Curvularia</i> spp.	-	-	-	-	-	1	1	3,7
<i>Cylindrocarpon</i> spp.	-	-	-	-	-	1	1	3,7
<i>Geotrichum</i> spp.	-	-	-	-	-	2	2	7,4
<i>Neurospora</i> spp.	-	-	-	-	-	1	1	3,7
<i>Rhodotorula</i> spp.	-	-	-	-	-	1	1	3,7
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	-	-	-	-	-	1	1	3,7
<i>Scopulariopsis</i> spp.	-	-	-	-	-	1	1	3,7
<i>Trichosporon</i> spp.	1	1	1	2	1	2	8	29,6
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>16</b>	<b>27</b>	

Apesar de os fungos filamentosos estarem amplamente distribuídos na natureza, eles são apenas esporadicamente isolados de casos de mastite, enquanto que as leveduras são os fungos que mais frequentemente estão relacionadas às infecções da glândula mamária em animais produtores de leite (CHENGAPPA et al., 1984; KELLER et al., 2000). No contexto, foram apenas três isolamentos de *Candida* spp., divergindo portanto da literatura consultada.

A mastite micótica pouco comum em relação às de causa bacteriana, ocorre segundo Chahota et al. (2001) e Crawshaw, Macdonald e Duncan (2005) sob a forma de surtos

localizados e/ou após tratamento com antimicrobianos, esta última condição verificada nos dois casos em que foram isolados *Cryptococcus* spp. e um *Trichosporon* spp. nas propriedades 03 e 06. Contudo, o gênero *Trichosporon*, quando isolado do leite e de produtos lácteos, pode indicar falta de higiene nas instalações e dos equipamentos durante a obtenção e o processamento dos mesmos (WESTALL; FILTENBORG, 1998).

#### 4.3.3. Perfil de sensibilidade de agentes bacterianos associados à mastite clínica

Antimicrobianos com maior eficácia nos testes *in vitro* (Tabelas 06A e 06B) para os agentes isolados do leite de vacas com mastite foram enrofloxacina e doxiciclina com 100% de eficácia, seguidos de cefalotina (99,1%), cefalexina (97,2%) e cefoperazone (93,5%). Os piores resultados foram demonstrados para ampicilina (57%), amoxicilina (49,5%) e associação de novobiocina e penicilina G procaína (44,9%).

*E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas* spp., agentes bacterianos Gram negativos foram resistentes ao maior número de antibióticos e associações testadas.

O perfil de sensibilidade, resistência e sensibilidade intermediária de bactérias isoladas de 74 amostras de leite de vacas com mastite (Tabela 07) indicam que os maiores índices de resistência foram registrados entre bactérias Gram negativas, a maioria oportunista como agente etiológico de mastite bovina, enquanto que as bactérias que apresentaram-se mais sensíveis foram Gram positivas.

**Tabela 06A:** Sensibilidade *in vitro* das bactérias isoladas de 62 casos de mastite clínica em seis rebanhos no município de Resende, RJ, entre abril e junho de 2012.

Agentes isolados	CPZ	OXA	AMO	PMN	DUL	CL	GEN	TE
<i>Corynebacterium bovis</i>	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Enterobacter</i> spp.	100	0	100	50	100	100	100	100
<i>Enterococcus</i> spp.	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Escherichia coli</i>	100	12,5	12,5	12,5	100	6,3	31,3	31,3
<i>Klebsiella</i> spp.	90,9	9,1	9,1	9,1	100	90,9	9,1	9,1
<i>Micrococcus</i> spp.	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Pseudomonas</i> spp.	33,3	0	0	0	100	100	11,1	11,0
<i>Serratia marcescens</i>	100	0	0	0	100	0	0	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	100	83,3	5,6	11,1	100	100	100	100
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100	100	100	33,3	100	100	100	100
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	100	0	0	0	100	100	100	100
<i>Staphylococcus hyicus</i>	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Staphylococcus warneri</i>	100	100	0	100	100	100	100	100
<i>Streptococcus agalactiae</i>	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Streptococcus bovis</i>	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	100	100	100	100	100	100	100	100

Cefoperazone (CPZ), Oxacilina (OXA), Amoxicilina (AMO), Penicilina G + Novobiocina (PMN), Doxiciclina (DUL), Cefalexina (CL), Gentamicina (GEN), Tetraciclina (TE).

**Tabela 06B:** Sensibilidade *in vitro* das bactérias isoladas de 62 casos de mastite clínica em seis rebanhos no município de Resende, RJ, entre abril e junho de 2012.

Agentes isolados	AM	ENO	CTF	NEO	SUT	ESP	EST	AMC
<i>Corynebacterium bovis</i>	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Enterobacter spp.</i>	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Enterococcus spp.</i>	100	100	100	0	0	100	100	100
<i>Escherichia coli</i>	18,8	100	93,8	100	100	87,5	93,8	93,8
<i>Klebsiella spp.</i>	54,5	100	100	45,5	100	100	45,5	100
<i>Micrococcus spp.</i>	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Pseudomonas spp.</i>	0	100	100	0	33,3	0	11,1	33,3
<i>Serratia marcescens</i>	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	5,6	100	100	100	100	22,2	100	94,4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Staphylococcus hyicus</i>	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Staphylococcus warneri</i>	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Streptococcus agalactiae</i>	100	100	100	87,5	93,8	100	100	100
<i>Streptococcus bovis</i>	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	66,7	100	100	66,7	0	100	100	100

Ampicilina (AM), Enrofloxacina (ENO), Cefalotina (CTF), Neomicina (NEO), Sulfametoxazol + Trimetoprim (SUT), Espiramicina (ESP), Estreptomicina (EST), Amicacina (AMC).

Todas as amostras de *Corynebacterium bovis*, *Micrococcus spp.*, *Staphylococcus hyicus* e *Streptococcus bovis*, todas elas Gram positivas, apresentaram-se sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Exceção para *S. aureus* os agentes dos gêneros *Streptococcus spp.* e *Staphylococcus spp.* foram sensíveis a maioria dos princípios ativos testados.

Amostras de *S. aureus* apresentaram-se resistentes a diversos antibióticos, porém 100% das amostras foram sensíveis ao cefoperazone, cefalexina, gentamicina, tetraciclina, enrofloxacina, ceftiofur, neomicina, danofloxacina, estreptomicina e sulfatrim. amoxicilina + ácido clavulânico e oxacilina apresentaram boa eficácia *in vitro* com 94,4% e 83,3% das amostras sensíveis respectivamente. Por outro lado, espiramicina (22,2%), novobiocina + penicilina G procaína (11,1%), amoxicilina (5,6%) e ampicilina (5,6%) foram pouco efetivos, com a maioria das amostras resistentes.

A terapia antimicrobiana é uma das principais ferramentas para o controle da mastite em rebanhos bovinos, e o tratamento é realizado com maior eficácia e segurança, se baseado no resultado da cultura microbiológica, complementada com o teste de sensibilidade (FERNANDES, 2006). No entanto, sua realização nem sempre é possível em condições de campo, o que obriga ao tratamento de casos clínicos agudos ou crônicos, sem conhecimento prévio da sensibilidade a agentes antimicrobianos.

Segundo Freitas et al. (2005) muitos proprietários usam antibióticos que não apresentam eficácia, além de muitas vezes aumentarem a dosagem dos produtos na tentativa de melhorar sua eficiência contribuindo assim para a presença de resíduos no leite e aumento

da resistência a antimicrobianos. Soma-se a este fato o grande número de drogas comerciais com princípios ativos semelhantes, embora com nomes comerciais diferentes.

**Tabela 07:** Perfil de sensibilidade de 107 agentes bacterianos (números absolutos e porcentagens) isolados de 83 amostras de leite de 62 casos de mastite clínica em seis rebanhos no município de Resende, RJ entre abril e junho de 2012.

Princípios ativos	Sensível		Resistente		Intermediário	
	Amostras	%	Amostras	%	Amostras	%
Amicacina	99	92,5	8	7,5	0	0
Amoxicilina	53	49,5	53	49,5	1	0,9
Ampicilina	61	57	45	42,1	1	0,9
Cefalexina	104	97,2	3	2,8	0	0
Cefalotina	106	99,1	1	0,9	0	0
Cefoperazone	100	93,5	5	4,7	2	1,9
Doxiciclina	107	100	0	0	0	0
Enrofloxacina	107	100	0	0	0	0
Espiramicina	82	76,6	25	23,4	0	0
Estreptomicina	92	86	8	7,5	0	0
Gentamicina	77	72	29	27,1	1	0,9
Neomicina	85	79,4	21	19,6	1	0,9
Oxacilina	66	61,7	41	38,3	0	0
Penicilina G + Novobiocina	48	44,9	57	53,3	2	1,9
Sulfametoxazol + Trimetoprim	94	87,9	13	12,1	0	0
Tetraciclina	79	73,8	27	25,2	1	0,9

Em conformidade com o que foi apontado por Freitas et al. (2005), no presente estudo foram comuns os relatos de troca de medicamentos, mediante resultados insatisfatórios, para outros produtos contendo princípios ativos semelhantes, a exemplo dos antimastíticos Mastizone®, Gentatec®, Mastifin® e Gentocin® usados nas propriedades durante o período de avaliação, e outros não citados (Gentamast®, Mastifin®, Topmast®, Genta F®, Mastilac® e Gentamast®) cujo princípio ativo comum é a Gentamicina.

Langoni, Ichihara e Silva (2000) apontaram a gentamicina como um antibiótico eficaz para o tratamento das mastites bovinas de origem bacteriana. No presente estudo verificou-se que 29 agentes bacterianos isolados (27,1%) de 24 quartos mamários de vacas com mastite clínica foram resistentes a este antibiótico, e esta resistência está de acordo com histórico de uso frequente de produtos contendo a gentamicina para tratar os animais com mastite nestas propriedades.

Estudos conduzidos em diferentes momentos e condições comprovam a eficácia da gentamicina contra agentes isolados da mastite bovina, mas também apontam para o desenvolvimento de resistência a este antibiótico. A sensibilidade de agentes bacterianos à gentamicina neste estudo foi menor que a obtida por alguns autores. Langoni et al. (1991), Domingues et al. (1994) e Coutinho et al. (2006) obtiveram valores semelhantes (72,1%, 80%

e 78,9%, respectivamente) enquanto Costa et al. (1996), Costa et al. (2000) e Freitas et al. (2005), encontraram resultados inferiores, respectivamente 52,5%, 54% e 49%.

Ainda que 27% das amostras tenham sido resistentes a Gentamicina nos testes *in vitro*, os resultados obtidos corroboram com a afirmação de Langoni et al. (2000), sobre a eficácia da gentamicina no tratamento das mastites bovinas de origem bacteriana.

O aumento de prevalência de *S. aureus* multirresistentes causadores de mastite bovina é atualmente um problema grave, principalmente devido à redução da efetividade dos antimicrobianos, aumento da morbidade, e dos custos para combater a doença. Além disso, o uso indiscriminado de antibióticos pode levar ao acúmulo de antibióticos nos alimentos, com efeitos sobre a saúde humana (POL; RUEGG, 2007).

A seleção de espécies de bactérias resistentes previamente existentes em uma população é fenômeno que ocorre com os grupos estafilococos, enterococos, pneumococos e estreptococos em relação ao uso de penicilinas, cefalosporinas e vancomicina (TAVARES, 2000; SOUZA; REIS; PIMENTA, 2005). No presente estudo a maioria desses agentes apresentaram-se sensíveis à maioria dos antibióticos testados, com a exceção para *S. aureus*, *S. agalactiae* e *S. dysgalactiae* conforme evidenciado nas Tabelas 06A e 06B.

ECN neste estudo apresentaram-se sensíveis a maioria dos antimicrobianos testados. Maiores resistências foram verificadas em amostras de *Staphylococcus haemolyticus*, os quais foram resistentes à amoxicilina, oxacilina, penicilina G e novobiocina.

Em estudo conduzido por Lucheis (2011), de 97 amostras de ECN, 47,4% foram resistentes à ampicilina, 46,4% à penicilina g, 27,8% à tetraciclina, 12,4% à enrofloxacin, 10,3%, à neomicina, 11,3% à gentamicina e sulfadiazina, 9,3% à oxacilina e 5,2% resistentes à cefalexina divergindo, portanto, do presente estudo em que ECN foram sensíveis à maioria dos agentes antimicrobianos testados.

A Tetraciclina é bastante utilizada nos tratamentos das mastites e apresentou boa eficiência para estafilococos isolados de casos de mastite em São Paulo (CRUZ et al. 1998) e em Minas Gerais (BRITO et al. 2001). Em semelhança a estes estudos, todas as amostras de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. isoladas foram sensíveis a Tetraciclina. Contudo, agentes ambientais e oportunistas como *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas* spp. apresentaram entre 70 e 90% de amostras resistentes a esse antibiótico. Este resultado é relevante visto que Tetraciclina era usada frequentemente nas propriedades em estudo e a resistência antimicrobiana neste caso é mediada principalmente por plasmídeos (SPINOSA 1996), os quais podem carrear resistência para outras bactérias (PRESCOTT, 2002).

Os estafilococos isolados de leite de vacas com mastite quase sempre apresentam altos índices de resistência aos antibióticos do grupo de betalactâmicos (ANDRADE et al., 2000; COSTA et al., 2000; BYARUGABA, 2004; SOUZA REIS; PIMENTA, 2005).

Os resultados obtidos corroboram esta informação com altos índices de resistência para todos os agentes isolados. As amostras dos casos de mastite apresentaram-se resistentes para penicilina G, amoxicilina, e ampicilina, 53,3%, 49,5% e 42,1%, respectivamente.

O perfil de sensibilidade das bactérias isoladas no leite de vacas com mastite clínica ressalta a importância da avaliação da sensibilidade antimicrobiana *in vitro* antes da indicação do tratamento, especialmente em condições de higiene ambiental e da ordenha inadequadas. Antibióticos como gentamicina e tetraciclina que em diferentes estudos apresentaram alta eficácia *in vitro* contra agentes da mastite podem apresentar-se ineficaz, principalmente onde seu uso é frequente e inadequado.

Estes dados também demonstram que na indisponibilidade de testes laboratoriais para propor um tratamento adequado e melhores medidas de controle, os proprietários usam com



frequência os antibióticos de última geração da linha veterinária, dos quais se poderia lançar mão somente em casos em que se esgotaram as demais possibilidades em antibióticos.

#### 4.4. Leite cru refrigerado

##### 4.4.1. Composição

Quanto à composição do leite de conjunto das UPL em estudo (Tabela 08), entre abril e maio de 2012, novamente os valores foram adequados para todos os parâmetros previstos na legislação (BRASIL, 2011).

**Tabela 08:** Composição centesimal de amostras de leite de tanques de expansão individuais de seis unidades de produção no município de Resende, RJ em abril, maio e junho de 2012.

UPL	Gordura		Proteína		Lactose		Sólidos Totais		Extrato Seco Desengordurado	
	Abril	Maio	Abril	Maio	Abril	Maio	Abril	Maio	Abril	Maio
<b>01</b>	3,76	4,42	3,26	3,28	4,4	4,55	12,4	12,6	8,64	8,18
<b>02</b>	3,34	4,23	3,31	3,34	4,43	4,41	12,1	12,41	8,76	8,18
<b>03</b>	3,59	3,76	3,2	3,23	4,46	4,5	12,25	12,04	8,66	8,28
<b>04</b>	3,58	4,36	3,26	3,29	4,37	4,44	12,2	12,45	8,62	8,09
<b>05</b>	4,61	4,47	3,31	3,34	4,64	4,62	13,6	12,87	8,99	8,4
<b>06</b>	4,19	3,94	3,22	3,16	4,48	4,68	12,92	12,24	8,73	8,3
<b>Média</b>	<b>3,8</b>	<b>4,2</b>	<b>3,3</b>	<b>3,3</b>	<b>4,5</b>	<b>4,5</b>	<b>12,6</b>	<b>12,4</b>	<b>8,7</b>	<b>8,2</b>

Segundo Behmer (1999), teores de gordura acima de 3% são adequados e preferíveis para a indústria, pois quanto mais alto este nível, maior o aproveitamento da matéria prima.

Os teores de lactose foram igualmente adequados para o leite bovino (WALSTRA; JENNESS, 1984), semelhantes aos obtidos por Dürr, Carvalho e Santos (2004) em rebanhos no Rio Grande do Sul, e em média ligeiramente inferiores aos valores percentuais (4,6%) obtidos por esses autores nos mesmos meses em que foi realizado o presente estudo.

No contexto da composição do leite em relação à CCS, Machado (2012) relaciona redução nos teores de gordura (3,5 para 3,2%) e lactose (4,9 para 4,5%), com valores 90% abaixo do teor normal em relação ao leite com CCS baixa, e variações nos teores de minerais em que sódio e cloro aumentam enquanto potássio e cálcio diminuem.

Neste estudo, mesmo com CCS elevadas, os componentes principais do leite foram normais nas seis propriedades avaliadas, embora ligeiramente reduzidos em proteína, gordura e lactose e compatíveis com variações descritas em leite com alta CCS por Machado; Pereira; Sarriés (2000), Schäellibaum (2000) e Machado (2012) que evidenciaram alterações quantitativas (perda na produção) e diferenças qualitativas nos principais componentes do leite (gordura, proteína, lactose e minerais) em decorrência da mastite e alta CCS no leite.

##### 4.4.2. Parâmetros de qualidade

As análises realizadas entre abril e junho de 2012 demonstraram um avanço dos produtores no sentido da adequação aos critérios de qualidade estabelecidos pela IN 62/2011

em substituição à 51/2002. Na CCS verificou-se uma redução progressiva nos meses analisados, especialmente relevantes ao serem comparadas com as contagens iniciais.

A CCS do leite de uma vaca indica de maneira quantitativa o grau de infecção da glândula mamária. No leite do tanque de resfriamento a CCS indica a incidência média de mastite no rebanho (EMANUELSON; FUNKE, 1991).

Como destacado por Schukken et al. (1992) o entendimento da dinâmica da CCS de tanques é um importante passo para a melhoria da qualidade do leite. Neste estudo, a CCS foi efetivamente menor em abril e maio de 2012 (Tabela 09), quando confrontada com os valores iniciais (maio de 2011), mas ainda acima de 750 mil cels/mL em três propriedades. Duas propriedades atenderiam uma em maio e outra em junho de 2012, ao novo critério de no máximo 400 mil cels/mL de leite (BRASIL, 2011).

**Tabela 09:** Contagem de Células Somáticas (CCS) e Contagem Bacteriana Total (CBT) em amostras de leite de tanques de expansão individuais de seis unidades de produção no município de Resende, RJ em abril e maio de 2012.

UPL	Contagem de Células Somáticas (células x mil/mL de leite)			Contagem Bacteriana Total (UFC x mil/mL de leite)		
	Abril	Maio	Junho	Abril	Maio	Junho
<b>01</b>	1060	1008	731	587	387	-
<b>02</b>	1873	1319	1273	394	222	-
<b>03</b>	757	700	388	225	160	-
<b>04</b>	1000	667	519	226	22	-
<b>05</b>	917	360	446	185	8	-
<b>06</b>	1241	1384	1014	456	116	-
<b>Média</b>	<b>1141</b>	<b>906</b>	<b>728</b>	<b>346</b>	<b>153</b>	-

Em relação ao CBT, Arcuri et al. (2006) avaliaram o leite de 24 rebanhos, identificando que 83% atenderiam ao requisito de  $<1,0 \times 10^6$  UFC/mL à época do estudo, 19 (79%) atenderiam ao padrão de  $<7,5 \times 10^5$  UFC/mL do período de 2008/2011 e 11 (46%) rebanhos atenderiam a exigência de  $<1,0 \times 10^5$  UFC/mL a partir de 2011, índices estes melhores que os obtidos no presente estudo.

Considerando os critérios utilizados por Arcuri et al. (2006), em atendimento aos padrões em vigor à época, quatro (4/6) apresentaram padrão semelhante. Contudo, para os novos parâmetros em vigor a partir de janeiro de 2012, três (50%) das amostras estariam em desacordo com os critérios de qualidade em vigor (BRASIL, 2011).

Pelos valores de CCS do tanque pode-se verificar um progresso no controle da mastite nas propriedades em estudo, onde todas apresentaram valores decrescentes ao longo dos meses de abril, maio e junho de 2012.

Os dados da CCS fornecem uma indicação de inflamação da glândula mamária e devem ser avaliados com precaução, pois se sabe que há flutuações normais durante o curso da infecção, sendo necessários exames periódicos para uma avaliação confiável (HARMON, 1994). Conforme demonstrado por Miller et al. (1983), Hogan et al. (1988) e Schutz, Hansen e Steuernagel (1990) a CCS pode ser influenciada por fatores individuais, ambientais ou climáticos, mas especialmente pela presença de infecções intramamárias.

Quanto à avaliação microbiológica houve uma relevante redução da CBT no leite produzido nessas propriedades. Sendo a CBT um indicador das condições de higiene em que o leite é produzido e armazenado, em duas propriedades os valores muito baixos (8 e 22 mil UFC/mL), foram divergentes das condições de produção avaliadas *in loco*. As amostras foram coletadas e encaminhadas atendendo às normas estabelecidas pelo laboratório, pertencente à Rede Brasileira de Qualidade do Leite (RBQL) e analisadas por método de referência, porém os resultados não condizem com a realidade da produção e condições de higiene nessas propriedades.

Segundo Hogan et al. (1988) a temperatura e a umidade ambiente afetaram o crescimento microbiano e, podem influenciar a contaminação do leite. Como as análises foram realizadas inicialmente em período de alta temperatura e umidade e a seguir em meses de temperatura mais amena e com menor umidade, esses fatores podem estar relacionados à redução da carga microbiana, especialmente porque a redução foi comum a todas as propriedades. Em junho as análises não foram realizadas porque ao serem enviadas para análise via SEDEX, chegaram ao laboratório em temperatura inadequada (20°C).

Notou-se com o decorrer da pesquisa que houve uma interferência indireta sobre os resultados da qualidade do leite, já que nenhuma nova medida de controle e prevenção da mastite foi instituída nestas propriedades é possível que a rotina de avaliação imposta pelo trabalho como avaliar e coletar amostras de animais com enfermidade crônica, a não incorporação do leite destes animais ao tanque ou mesmo a mera presença da equipe técnica responsável pela coleta de dados, tenha influenciado as medidas de higiene e assim contribuído para a redução da CCS e carga microbiana do leite.

Nesta etapa (abril e junho de 2012) foi também avaliada a presença de resíduos de antibióticos no leite, sendo todas as amostras negativas indicando atenção aos critérios de utilização de antibióticos em vacas com mastite e descarte do leite de todos os quartos mamários das vacas tratadas, e atendendo ao período de carência estabelecido para cada produto em uso nas propriedades.

Em amostragem pequena, a probabilidade de obter amostras positivas é menor, contudo a ausência de resíduos nas amostras analisadas é um fator adequado e o resultado satisfatório, ao contrário de outros autores que detectaram resíduos de antimicrobianos em leite de mistura procedentes de propriedades rurais no Estado do Rio de Janeiro (FOLLY; MACHADO, 2001) e pasteurizado comercializado na cidade do Rio de Janeiro (MORAIS et al, 2009), respectivamente antes e após a entrada em vigor da IN 51/2002.

A estabilidade ao teste do alizarol 78% do leite de conjunto dessas propriedades, embora sem histórico de positividade por parte da cooperativa, revelou três amostras com coagulação forte e coloração rósea, caracterizadas como instáveis não ácidas (propriedades 3, 5 e 6). A prova do álcool ou alizarol pode ser aplicada como um método rápido para estimar a estabilidade térmica do leite, e indiretamente avaliar sua qualidade, uma vez que a baixa qualidade higiênica durante sua produção pode levar a redução do pH pela fermentação da lactose em ácido lático, por microrganismos fermentadores, resultando, em instabilidade da proteína e coloração amarela relacionada à acidez da amostra (PEREIRA et al., 2001).

A estabilidade do leite é importante para o processamento de derivados que sofrem tratamentos térmicos severos ou com vida de prateleira longa (SANTOS, 2004). Atualmente, a redução da estabilidade térmica do leite é um problema frequente e pode estar relacionada a um desbalanço nutricional (cálcio/fósforo e outros minerais); ação de microrganismos sobre a caseína; mastite; presença de colostro; e vacas no final de lactação (PONCE, 1996).

No presente estudo a coloração ao teste do alizarol indicava pH normal (rósea), mesmo em condições de higiene ruim, sugerindo desequilíbrio salino, concordando com

diferentes estudos em que a instabilidade ao etanol tem sido encontrada mesmo em leite que não apresenta acidez elevada e que não seja originário de vacas com mastite (BALBINOTTI et al., 2002; BOTTEON et al., 2006; ZANELA et al., 2006, LOPES, 2008, MARQUES et al., 2007, ABREU, 2008, OLIVEIRA et al., 2011 a). Para esta condição tem sido sugerida a denominação “leite instável não ácido” (LINA) ou síndrome do leite anormal (SILA) cuja caracterização em condições de campo é muito difícil.

Em termos gerais, denomina-se SILA, o conjunto de alterações nas propriedades físico-químicas do leite, que causam transtornos nos processos de elaboração de derivados lácteos, em seus rendimentos e/ou a qualidade final, os quais estão associados a transtornos fisiológicos, metabólicos e/ou nutricionais com implicações nos mecanismos de síntese e secreção da glândula mamária (PONCE; HERNANDEZ, 2001).

A alta CCS e elevada carga microbiana do leite neste estudo não estão provavelmente implicadas com a instabilidade do leite (coagulação no teste do alizarol), visto que duas das amostras positivas apresentaram as menores contagens de células somáticas e carga microbiana (CBT), confirmando achados de outros autores no que se refere à positividade a prova do álcool não associada com acidez, qualidade microbiológica e mastite.

#### 4.4.3. Agentes microbianos isolados

Do leite do tanque de expansão foram isolados (Quadro 03) os seguintes agentes fúngicos: *Candida pseudotropicalis*, *Candida tropicallis*, *Candida parapsilosis*, *Galactomyces* spp., *Trichosporon* spp., *Fusarium* spp., *Scopulariopsis breviacaulis*, *Cladosporium* spp., *Curvalaria* spp., *Geotrichum* spp., *Mucor* spp., *Penicillium* spp.

**Quadro 03:** Isolamento de fungos e leveduras em amostras de leite de tanque de expansão individuais em seis unidades de produção na zona rural do município de Resende, RJ em abril, maio e junho de 2012.

Agentes isolados	PROPRIEDADES						Total	%
	1	2	3	4	5	6		
<i>Candida parapsilosis</i>	-	1	-	-	-	-	1	3,5
<i>Candida pseudotropicalis</i>	1	-	-	-	1	-	2	6,9
<i>Candida tropicallis</i>	1	-	1	-	-	-	2	6,9
<i>Cladosporium</i> spp.	-	1	-	-	1	-	2	6,9
<i>Curvalaria</i> spp.	-	-	-	-	-	1	1	3,5
<i>Fusarium</i> spp.	-	1	1	1	1	-	4	13,8
<i>Galactomyces</i> spp.	1	-	-	2	-	-	3	10,4
<i>Geotrichum</i> spp.	-	1	1	1	-	1	4	13,8
<i>Mucor</i> spp.	-	-	1	-	-	-	1	3,5
<i>Penicillium</i> spp.	-	-	-	-	1	-	1	3,5
<i>Scopulariopsis breviacaulis</i>	-	1	-	-	-	-	1	3,5
<i>Trichosporon</i> spp.	1	-	1	2	1	2	7	24,1
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>29</b>	

Destes foram isolados do tanque de expansão em maior número os gêneros *Trichosporon* spp. (24,1%), *Candida* spp. (17,2%), *Fusarium* spp. (13,8%) e *Geotrichum* spp. (13,8%). Dos casos de mastite os mais presentes foram *Trichosporon* spp. (29,6%), *Aspergillus* (14,8%) e *Candida* spp. (11,1%). Havendo entre ambas as análises um predomínio do gênero *Trichosporon* spp. e *Candida* spp.

Como neste estudo Jodral et al. (1993) isolaram em amostras de leite pasteurizado os fungos *Geotrichum* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp.

*Fusarium* spp. (13,8%) e *Galactomyces* spp. (10,4%) também foram isolados com frequência, porém não são agentes relacionados à mastite bovina.

Em geral, as leveduras são consideradas saprófitas e têm sido isoladas de tanques de armazenamento de leite oriundo de animais sadios (RUZ-PEREZ et al., 2004). No entanto, em alguns casos, elas também estão presentes em amostras de leite provenientes de animais com mastite (SANTOS; MARIN, 2005).

Melville et al. (2006) isolaram dentre outros, *Candida* spp., *Geotrichum* spp., *Trichosporon* spp., *Penicillium* spp., e *Aspergillus* spp. em diferentes percentagens, a partir de amostras de leite de tanques de refrigeração e latões de propriedades de exploração leiteira. Os mesmos agentes foram também isolados de tanques de expansão e amostras individuais de vacas com mastite, no presente estudo, porém em associação a outros agentes.

O isolamento de leveduras e fungos em amostras de leite do tanque neste estudo é relevante visto que como destacado por Spanamberg et al. (2009), a contaminação do leite por leveduras pode afetar o produto final por meio de alterações organolépticas que ocorrem pela produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas, além de outros derivados metabólicos produzidos pelas leveduras e pelos fungos leveduriformes.

Também foram isolados os seguintes agentes bacterianos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. e *Corynebacterium bovis* (Quadro 04).

**Quadro 04:** Isolamento de bactérias em amostras de leite de tanque de expansão individuais em seis unidades no município de Resende, RJ em abril, maio e junho de 2012.

Agentes isolados	PROPRIEDADES						Total	%
	1	2	3	4	5	6		
<i>Corynebacterium bovis</i>	1						1	3,7
<i>Enterobacter</i> spp.						1	1	3,7
<i>Escherichia coli</i>	1	1	3		1	1	7	26
<i>Klebsiella</i> spp.	1	1	2	1			5	18,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				1		2	3	11,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	2		1		1	1	5	18,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	1					2	7,4
<i>Streptococcus agalactiae</i>		1					1	3,7
<i>Streptococcus uberis</i>			1			1	2	7,4
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>27</b>	

Houve predomínio das espécies *Escherichia coli* (26%), *Klebsiella* spp. (18,5%) e *Staphylococcus aureus* (18,5%), nas amostras de tanque, enquanto que nas amostras de vacas mastíticas o predomínio pairou sobre *Staphylococcus aureus* (15%), *Escherichia coli* (15%) e *Klebsiella* spp.(15%).

A literatura é divergente quanto aos resultados obtidos neste estudo, indicando maior predominância do *S. aureus* dentre os agentes bacterianos isolados da mastite. *E. coli* e *S. agalactiae* também são frequentemente incriminados, embora em posicionamento inferior aos demais agentes em número de isolamentos (LANGONI et al., 1991; LARANJA; MACHADO, 1994; RIBEIRO et al., 2009).

Os agentes bacterianos isolados dos tanques de refrigeração são condizentes com os agentes relacionados aos casos de mastite clínica nas propriedades em estudo. Isolamento de *S. aureus* na maioria dos tanques pode estar relacionado aos casos de mastite nas respectivas propriedades, mas também sugere a manipulação inadequada do produto e condições higiênico-sanitárias insatisfatórias.

Os gêneros *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. apresentaram bastante evidência em ambos os isolados das amostras oriundas dos casos de mastite (29,9% e 19,6%, respectivamente), quanto dos tanques (26% e 11,1%, respectivamente).

A frequência de isolamentos de *S. aureus* em amostras de leite cru refrigerado é consistente com achados de outros autores ao analisarem leite e subprodutos lácteos. O isolamento de *S. aureus* e outros agentes infecciosos em amostras de leite cru refrigerado ou pronto para consumo foi relatado por Brito et al. (1998), Brito et al. (1999a,b), Beloti et al. (1999), Brito et al. (2002), Lamaita et al. (2005), Arcuri et al. (2006), Faccioli (2010), Fagundes et al. (2010).

A contaminação do leite com *S. aureus* pode ocorrer por meio da incorporação de microrganismos presentes no úbere ou o contato do leite com utensílios e equipamentos contaminados durante as operações de ordenha, coleta ou armazenamento (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004). No que se refere aos equipamentos, deve-se ressaltar a importância do homem como reservatório e veiculador do microrganismo em alimentos (JAY, 2005) visto que, segundo Huy (1994), entre 20 e 50% das pessoas normais apresentam esses microrganismos no vestíbulo nasal e orofaringe.

Kluytmans, Belkum e Verbrugh (1997) destacaram importância do homem como agente transmissor e reservatório de *S. aureus*, sendo a pele, particularmente devido ao alto teor de sal e suor, a fonte de eliminação transitória do agente, contaminando qualquer superfície ou objeto que tenha contato com o portador.

Altamente contagioso, o *Staphylococcus aureus* é capaz de causar infecções de longa duração, com baixa taxa de cura e grande perda na produção de leite (BENEDETTE et al., 2008). Porém, o prejuízo econômico não é o único problema. *S. aureus* que habita usualmente feridas de tetos, mãos de ordenhadores e a glândula mamária (TRAVERSO et al., 2003) quando incorporado ao leite é capaz de causar infecções e intoxicações no homem e nos animais. É também destacado o desencadeamento de reações alérgicas e os efeitos do uso de antibióticos no controle da infecção (CASSOL et al., 2010).

Brito et al. (1998) concluíram que o exame microbiológico do leite total do rebanho, usando meios de cultura seletivos, é um método sensível e específico para verificar a presença da infecção por *S. aureus* e *S. agalactiae* no rebanho.

Amostras de leite do tanque de 33 rebanhos foram cultivadas para detectar patógenos da mastite (BRITO et al., 1998). Agentes contagiosos foram isolados em 29 rebanhos. *S. aureus* foi isolado das amostras de 26 rebanhos, sendo nove em associação com *Streptococcus agalactiae* e em três foi isolado somente *S. agalactiae*. Todas as amostras do tanque

apresentaram contaminação com coliformes e leveduras, enquanto não se isolaram esses microrganismos dos quartos individuais.

Brito et al. (1999), em 48 rebanhos, isolaram *S. aureus* e *S. agalactiae*, de 47 e 29 rebanhos, respectivamente. Brito et al. (2002) analisaram o leite dos fornecedores de um laticínio da Zona da Mata de Minas encontraram *S. aureus* em 83,3% e *S. agalactiae* em 16,7% dos rebanhos. Embora corroborando os achados de outros autores quanto ao isolamento de *S. aureus*, no presente estudo *S. agalactiae* envolvido na etiologia da mastite clínica em quatro dos seis rebanhos estudados.

Lamaita et al. (2005) analisaram 80 amostras de leite cru estocado a 4°C por 48 horas em tanques de propriedades rurais do estado de Minas Gerais e *Staphylococcus* sp. foi detectado em 100% das amostras. Espécies mais isoladas foram *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. epidermidis* que representaram 34,6%, 22,7% e 12,2% das estirpes isoladas, respectivamente.

Faccioli (2010) com o objetivo de avaliar o perfil dos produtores considerando a atual legislação e a qualidade do leite produzido com ênfase na presença de *Staphylococcus* enterotoxigênicos, utilizando a PCR na detecção de *S. aureus*, demonstraram que a PCR foi altamente sensível, detectando *S. aureus* em 99% das amostras.

Fagundes et al. (2010) avaliaram a ocorrência de *Staphylococcus aureus* em 37 amostras de leite do tanque produzido nas regiões de Ribeirão Preto e São Carlos, Estado de São Paulo. Estirpes de *S. aureus* foram detectadas em 4 (10,8%) amostras, portanto em número inferior ao presente estudo.

Arcuri et al. (2006) avaliaram a qualidade microbiológica do leite refrigerado em 24 rebanhos, e a associação entre a contaminação microbiana e os procedimentos de higienização dos equipamentos de ordenha e armazenamento do leite. Concluíram sobre a importância dos manipuladores e condições de higiene ambiental e dos animais sobre a qualidade do leite.

Embora não representem mais do que 10% da microbiota do leite cru recém-ordenhado (SORHAUG; STEPANIAK, 1997) bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. São frequentemente isoladas em amostras de leite e de produtos lácteos refrigerados (COUSIN, 1982, COUSIN; MARTH, 1977, ENEROTH; AHRNÉ; MOLIN, 2000a, b, ENEROTH et al., 1998, WIEDMANN et al., 2000).

Adams, Barach e Speck (1975) constataram que de 70% a 90% dos psicotróficos isolados de leite cru estocado a 4 °C, por uma semana, eram *Pseudomonas* spp. O isolamento de três amostras de *Pseudomonas* spp. no presente estudo deve-se provavelmente ao menor tempo de estocagem, máximo de 48 horas nas condições estabelecidas pela IN51/2002 e IN 62/2011.

A importância do controle da contaminação dessa bactéria na cadeia produtiva do leite é relacionada ao seu potencial enzimático, com efeitos danosos sobre as características físico-químicas e organolépticas do leite, varia em função da estirpe (PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006).

#### **4.4.4. Sensibilidade *in vitro***

A eficácia *in vitro* dos agentes bacterianos isolados do leite cru refrigerado em tanques de expansão individuais frente aos antibióticos (Tabelas 10A e 10B) indica que os isolados foram resistentes à maioria dos antibióticos testados.

Observou-se moderada divergência entre a sensibilidade de amostras isoladas de vacas com mastite clínica e do leite do tanque, mesmo para patógenos envolvidos na etiologia da mastite. Entretanto no geral, amostras isoladas do tanque apresentaram maiores resistências a diferentes antimicrobianos que os agentes isoladas de amostras de vacas com mastite

Amostras de *Corynebacterium bovis* e *Streptococcus agalactiae* isoladas do tanque e da mastite foram 100% sensíveis a todos os antibióticos testados.

**Tabela 10A:** Sensibilidade *in vitro* a antimicrobianos, dos agentes isolados em amostras de leite de tanque de expansão individuais em seis unidades de produção (UPL) no município de Resende, RJ em abril, maio e junho de 2012.

Agentes isolados	AM	ENO	DAN	NEO	SUT	ESP	EST	CUR
<i>Corynebacterium bovis</i>	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Enterobacter</i> spp.	0	100	100	100	100	100	100	100
<i>Escherichia coli</i>	28,6	100	100	100	100	100	100	100
<i>Klebsiella</i> spp.	0	80	100	0	33,3	33,3	0	60
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	100	100	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	20	40	100	100	100	100	100	20
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	100	x	x	x	x	x	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Streptococcus uberis</i>	100	100	100	0	0	100	100	100

Ampicilina (AM), Enrofloxacina (ENO), Danofloxacina (DAN), Neomicina (NEO), Sulfametoxazol + Trimetoprim (SUT), Espiramicina (ESP), Estreptomicina (EST), Ceftiofur (CUR).  
Antibióticos não foram testados (X).

**Tabela 10B:** Sensibilidade *in vitro* a antimicrobianos, dos agentes isolados em amostras de leite de tanque de expansão individuais em seis unidades de produção (UPL) no município de Resende, RJ em abril, maio e junho de 2012.

Agentes isolados	CPZ	OXA	AMO	AMA	PMN	CL	GEN	TE
<i>Corynebacterium bovis</i>	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Enterobacter</i> spp.	100	0	0	100	0	100	100	100
<i>Escherichia coli</i>	57,1	28,6	57,1	57,1	50	57,1	100	71,4
<i>Klebsiella</i> spp.	60	0	0	60	0	20	80	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	33,3	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	20	20	20	20	100	20	60	20
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	0	x	0	0	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>Streptococcus uberis</i>	100	100	100	100	100	0	100	100

Cefoperazone (CPZ), Oxacilina (OXA), Amoxicilina (AMO), Amoxicilina + Ác. Clavulânico (AMA), Penicilina G + Novobiocina (PMN), Cefalexina (CL), Gentamicina (GEN), Tetraciclina (TE).  
Antibióticos não foram testados (X).

Em amostras procedentes dos tanques (Tabela 11) danofloxacina (100%), enrofloxacina (85,2%), gentamicina (74,1%) e espiramicina (73,3%), foram os antibióticos com maiores índices de sensibilidade.

A partir do leite de casos com mastite os antibióticos com maior eficácia foram doxiciclina (100%), enrofloxacina (100%), cefalotina (99,1%) e cefalexina (97,2%). Na



comparação destacam-se penicilina G + novobiocina (53,3%), amoxicilina (49,5%), ampicilina (42,1%) e oxacilina (38,3%) com as maiores resistências.

**Tabela 11:** Perfil de sensibilidade e resistência dos agentes bacterianos (números absolutos e porcentagens) isolados em amostras de leite de tanque de expansão individuais em seis unidades de produção (UPL) no município de Resende, RJ em abril, maio e junho de 2012.

Princípios ativos	Sensível		Resistente		Intermediário	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Amoxicilina	9	33,3	18	66,7	0	0
Amoxicilina + Ác. Clavulânico	13	48,1	14	51,9	0	0
Ampicilina	7	25,9	20	74,1	0	0
Cefalexina	9	33,3	17	63	1	3,7
Cefoperazone	13	48,1	14	51,9	0	0
Ceftiofur	16	59,3	10	37	1	3,7
Danofloxacina	15	100	0	0	0	0
Enrofloxacina	23	85,2	0	0	4	14,8
Espiramicina	11	73,3	4	26,7	0	0
Estreptomomicina	10	66,7	5	33,3	0	0
Gentamicina	20	74,1	5	18,5	2	7,4
Neomicina	8	53,3	7	46,7	0	0
Oxacilina	7	25,9	20	74,1	0	0
Penicilina G + Novobiocina	7	46,7	8	53,3	0	0
Sulfametoxazol + Trimetoprim	9	60	6	40	0	0
Tetraciclina	11	40,7	16	59,3	0	0

Alguns antibióticos apresentaram valores semelhantes entre isolados do tanque e dos casos de mastite clínica. Para associação de Penicilina em novobiocina, espiramicina e gentamicina e enrofloxacina em ambos não houve resistência plena, apenas no tanque, mostrando uma ligeira resistência intermediária.

É importante ressaltar que a cefalexina, tetraciclina e cefoperazone obteve um resultado inferior quanto à análise do tanque, ou seja, índice de resistência elevada, em contrapartida obteve excelente resultado nos isolados dos casos de mastite clínica. Importante investigar a origem da resistência apresentada pelas amostras isoladas do tanque, sendo este o resultado final do processo de produção, em que estão envolvidos os animais, o ambiente e os ordenhadores ou pessoas que manipulam o leite e utensílios em diferentes etapas da produção.

A gentamicina compõe a base do maior número de produtos comerciais no tratamento da mastite e a enrofloxacina amplamente utilizada no tratamento de diversas enfermidades em animais e humanos apresentaram bom resultado quanto à eficiência *in vitro* contra agentes bacterianos isolados do leite de vacas com mastite (72% e 100%) comparativamente aos agentes isolados do tanque (74,1% e 85,2%), respectivamente. Dos agentes isolados da mastite, os que apresentaram maiores resistências à gentamicina foram os ambientais (*E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas* spp.). Enquanto que dos isolamentos do tanque, foram

resistentes tanto agentes contagiosos (*S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis*), quanto ambientais (*Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella* spp.).

Dos agentes do gênero *Streptococcus*, o *S. agalactiae* apresentou o melhor resultado frente à exposição aos antibióticos, sendo 100% sensível aos princípios ativos avaliados. O *S. uberis* apresentou resistência a cefalexina, sulfametoxazol + trimetoprim e neomicina.

Os dados são consistentes com achados de outros autores (discutidos abaixo) ao avaliarem o perfil de sensibilidade de amostras de leite de vacas com mastite e de tanques de expansão individuais em diferentes regiões brasileiras.

Fontana (2002) obteve 100% das amostras de *Staphylococcus* spp. resistentes à penicilina, ampicilina e oxacilina. Também Mendes, Mimica (2007) relataram elevada resistência a oxacilina. Zafalon et al. (2008) ao estudarem a sensibilidade de agentes isolados a partir dos óstios papilares dos tetos, das teteiras e de amostras do leite de vacas com mastite identificaram que de todas as fontes, foi possível encontrar *S. aureus* com resistência à oxacilina e com características de multirresistência aos demais antimicrobianos.

Machado; Correa; Marin (2008) avaliaram 109 cepas de ECN isolados de leite de vacas com mastite clínica e subclínica, em nove estados brasileiros em relação à susceptibilidade *in vitro* a diversos agentes antimicrobianos. As maiores resistências foram observadas contra penicilina (93,5%), sulfonamida (88,9%), novobiocina (88,6%) e ampicilina (85,3%) como no presente estudo, em que, no entanto, não se considerou especificamente amostras de ECN.

De 291 *Staphylococcus* spp. recuperados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica Medeiros et al. (2009) relacionaram a ampicilina como o medicamento menos eficaz com 56,5% de resistência, enquanto que penicilina + novobiocina (53,6%), amoxicilina (37,2%) e enrofloxacina (28,1%) foram os mais efetivos. Como também demonstrado em Goiânia por Moreira, Silva e Mesquita (1997), as cepas de *Streptococcus* spp. isoladas de vacas com mastite clínica apresentavam maior sensibilidade frente à enrofloxacina (96%).

A doxiciclina foi observada em isolados de ovelhas com mastite em terceira posição (61,44%) entre as maiores taxas de sensibilidade (DRESCHER et al., 2010), e neste estudo observou-se uma sensibilidade de 100% em todas as espécies isoladas de mastite bovina.

Aires (2010) relatou boa eficácia *in vitro* para cefalexina/canamicina (76%) e gentamicina (69%) superiores aos índices observados para amostras isoladas do tanque de expansão neste estudo. Freitas et al. (2005) avaliaram o perfil de sensibilidade antimicrobiana de 59 cepas de ECP isoladas de leite de vacas com mastite do Estado de Pernambuco obtendo para a associação de sulfa + trimetoprim as melhores sensibilidades (95%).

Especificamente em relação ao *S. aureus*, observa-se que a maioria dos isolados do tanque (Tabela 10A e 10B) apresentou resistência a ampicilina, enrofloxacina, cefoperazone, oxacilina, amoxicilina, cefalexina, gentamicina e tetraciclina, com perfil distinto dos isolados de amostras provenientes de vacas com mastite nas mesmas propriedades. Antibióticos que apresentaram boa eficácia *in vitro* contra o *S. aureus* isolados das amostras do tanque foram: penicilina G + novobiocina, enrofloxacina, neomicina, sulfametoxazol + trimetoprim e estreptomicina.

Contra *S. aureus* isolados dos casos de mastite (Tabela 06A e 06B) os antibióticos que apresentaram melhor ação inibitória *in vitro* foram enrofloxacina, cefalotina, neomicina, sulfametoxazol + trimetoprim, estreptomicina, doxiciclina, cefalexina, gentamicina, tetraciclina e cefoperazone, divergindo quanto à sensibilidade desses agentes isolados do tanque em que 100% das amostras foram sensíveis à espiramicina e penicilina G + novobiocina.

Em uma propriedade o *S. aureus* foi isolado do leite do tanque em maio e junho e as estirpes apresentaram perfil de sensibilidade distinta (opostos), diferindo inclusive do padrão de sensibilidade das amostras isoladas nas demais propriedades, que foram equivalentes quanto ao padrão de sensibilidade *in vitro*.

O perfil de sensibilidade distinto entre isolados de *S. aureus* foi descrito por Ferreira et al. (2006) que identificaram entre 19 (24,7%) estirpes padrões fenotípicos e genotípicos distintos demonstrando que, em um determinado rebanho e período, pode existir considerável heterogeneidade genética em populações naturais de *S. aureus*, de modo a dificultar o controle e o tratamento da mastite. Tais achados chamam a atenção para o risco de falhas no tratamento desta enfermidade, caso sejam extrapoladas para todos os animais do rebanho as informações oferecidas pelos testes de sensibilidade a antimicrobianos obtidas a partir de algumas poucas estirpes de *S. aureus*.

Em contradição ao observado por Moreira et al. (2008) que caracterizaram a resistência de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina envolvendo a neomicina, gentamicina, tetraciclina e estreptomicina, amostras de *E.coli* isoladas neste estudo foram resistentes à tetraciclina, porém apresentaram sensibilidade à gentamicina, neomicina e estreptomicina, além de sulfametoxazol + trimetoprim, espiramicina, enrofloxacina, danofloxacina, e ceftiofur.

Araújo (1998) isolou no estado de São Paulo, cepas de *S. aureus* em que 99% eram sensíveis a cefalotina resultado este semelhante ao encontrando neste trabalho.

Zanette, Scapin e Rossi (2010) isolaram de 55 amostras de leite de vacas com suspeita de mastite, 39 (70,9%) cepas de *S. aureus*. Os percentuais gerais de sensibilidade, resistência e sensibilidade intermediária foram 78,72%, 13,59% e 7,69%, respectivamente. Os antibióticos menos eficazes foram penicilina e tetraciclina, com 46,15% 30,77% de resistência, respectivamente.

Na Tabela 12 estão resumidos os índices de sensibilidade dos agentes bacterianos isolados neste estudo e a relação com os produtos contra mastite disponíveis no mercado.

Dos medicamentos disponíveis comercialmente para o tratamento de mastite, alguns foram usados nestas propriedades (citados no “*check list*”) e com exceção da enrofloxacina (Enrocilin) todos apresentaram isolados resistentes aos princípios ativos contidos nas formulações. Dentre estes se destacam Mastizone Plus Lactação® (gentamicina), Gentatec Mastite® 250 mg (gentamicina), Gentocin Mastite® (gentamicina), Vetmast Plus VL® (cefalexina e neomicina) e Rilexine 200® (cefalexina e neomicina) e Vaseclox MA® (amoxicilina), especialmente quanto aos agentes dos tanques, com maior resistência que amostras isoladas de vacas com mastite.

Outras medicações usadas para tratamento de enfermidades respiratórias, digestivas e reprodutivas nessas propriedades (Item 4.2. Aspectos da Produção), como Excenel® (ceftiofur), Terramicina LA (oxitetraciclina), Tetraciclina (tetraciclina), Pentabiótico (penicilina), Tribriquem® (trimetoprim e sulfadiazina), Sulfatrim® (trimetoprim e sulfametoxazol) e Estreptomax® (estreptomicina) possuem em suas formulações princípios ativos contidos em produtos comerciais usados contra mastite e também foram isoladas amostras resistentes aos respectivos antimicrobianos, tanto do leite de vacas com mastite quanto de amostras do tanque de expansão, e nestes casos a resistência foi maior em amostras isoladas do tanque.

O uso desses produtos para tratamento de enfermidades diversas parece relevante, visto que foram isoladas amostras resistentes a estes antibióticos, mesmo sem serem usados no tratamento de vacas com mastite. O exemplo mais significativo refere-se à associação de penicilina G e novobiocina, cujos produtos comerciais contra mastite não foram usados nas

propriedades em estudo, no entanto obteve-se 53,3% de amostras resistentes quando isoladas do leite dos tanques e de vacas com mastite.

**Tabela 12:** Sensibilidade de agentes bacterianos isolados em amostras de leite de tanque de expansão e de 62 casos de mastite em seis propriedades, no município de Resende, RJ em abril, maio e junho de 2012, e princípios ativos contidos nos antimastíticos disponíveis no comércio e usados nas propriedades em estudo.

Princípios ativos	Antimastíticos comerciais *	Sensibilidade	
		Tanque	Mastite
Amoxicilina	Afimastite, Enrocilin, Vaseclox MA	33,3	49,5
Ampicilina	Prevast, Intramast, Cloxambiotic	25,9	57
Cefalexina	Ubersec, Rilexine, Vetmast Plus VL	33,3	97,2
Cefoperazone	Cefavet, Mamithal, Biomast, Masticlin, Mastizone, Pathozone, Cefavet, Mastitec	48,1	93,5
Enrofloxacin	Enrocilin	85,2	100
Espiramicina	Ememast VS, Ememast plus, Flumast	73,3	76,6
Estreptomicina	Gentocin, Vetrocilin, Agromastit	66,7	86
Gentamicina	Mastifin, Topmast, Genta F, Gentatec, Gentocin, Mastilac, Mastizone, Gentamast, Mastizone plus	74,1	72
Neomicina	Ememast VS, Ememast plus, Newmast, Mastiplus VL, Mastijet forte, Promastic, Flumast, Rilexine, Vetmast Plus VL	53,3	79,4
Penicilina G + Novobiocina	Tetra-delta, Albadry plus, Vetrocilin, Nafpenzal S	46,7	44,9
Sulfametoxazol + Trimetoprim	Mastical Nistatina, Mastical, Ungüento	60	87,9
Tetraciclina	Ungüento, Mastijet forte, Vetrocilin	40,7	73,8

\*Algumas formulações comerciais mistas utilizadas no tratamento da mastite

## 5 CONCLUSÕES

Foi observado redução dos valores de CCS e CBT, bem como a conformidade dos parâmetros de composição e ausência de resíduos de antimicrobianos nas amostras de leite das unidades de produção estudadas, algumas delas se enquadrando aos critérios de qualidade estabelecidos pela legislação.

A alta CCS inicial pode indicar o desconhecimento e descuido dos casos de mastite clínica pelos proprietários, valores que foram alterados com o transcorrer do estudo.

Os agentes bacterianos isolados dos tanques de refrigeração são condizentes com os agentes relacionados aos casos de mastite clínica.

A mastite nos rebanhos estudados foi tanto de origem contagiosa quanto ambiental, no entanto foram mais isolados agentes ambientais.

Dos agentes envolvidos foi relevante o isolamento de gêneros fúngicos como *Trichosporon* spp. e *Candida* spp. e de espécies bacterianas como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp.

Houve uma moderada divergência entre a sensibilidade de amostras isoladas de leite de vacas com mastite clínica e do leite do tanque, mesmo para patógenos envolvidos na etiologia da mastite com elevado número de agentes resistentes aos diferentes antibióticos de uso na veterinária.

O perfil de sensibilidade das bactérias isoladas no leite de vacas com mastite clínica ressalta a importância da avaliação da sensibilidade antimicrobiana *in vitro* antes da indicação do tratamento. A maioria das bases medicamentosas usadas nos testes são também utilizadas no tratamento humano. E a resistência dos agentes isolados aos mesmos confirma a preocupação quanto a melhorias na produção por questões de saúde pública.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, A.S. **Leite instável não ácido e propriedades físico-químicas do leite de vacas Jersey**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Mestrado. 2008. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/14912/000672566.pdf?sequence=1>> Acesso em: 10/07/2012
- ADAMS, D.M.; BARACH, J.T.; SPECK, M.L. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. **Journal of Dairy Science**, v.58, p.828-835, 1975.
- AIRES, T. A. C. P. **Mastites em bovinos : caracterização etiológica, padrões de sensibilidade e implementação de programas de qualidade do leite em explorações do Entre-Douro e Minho**. Dissertação de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2010
- 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. **Higiene Alimentar**, v.10, n.41, p.29-32, 1996.
- ALMEIDA, M.A.C.; SILVA, F.F. Prevalência de mastite subclínica em bovinos por *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. na microrregião de Garanhuns. **Ciência Veterinária Tropical**, v.1, n.1, p.18-24, 1998.
- ALVAREZ, H; FLORES, C. Micologia em leche de vacas sanas y com mastitis. **Revista de la Sociedad de Medicina Veterinaria de Chile**, v.12, p.11-17, 1962.
- AMORIM, R.N.L; SOUZA, A.O.G; LIMA, P.M; BEZERRA, F.N.B; ALVES, N.D; FEIJÓ F.M.C. Mastite clínica em bovino causada por *Prototheca zopfii* no estado do Ceará. **Acta Veterinária Brasília**, v.4, n.4, p.307-311, 2010.
- ANDERSON, D.E.; HUL, L.B.H; PUGH, D.G. Enfermidades da glândula mamária, p.379-399. In: PUGH, D.G. (Ed.). **Clínica de Ovinos e Caprinos**. São Paulo: Roca, 2004.
- ANDRADE, D.; LEOPOLDO, V.C.; HAAS, V.J. Ocorrência de bactérias multirresistentes em um Centro de Terapia Intensiva de hospital brasileiro de emergências. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.18, n.1, p.31-37, 2006.
- ANDRADE, M.A. Mastite bovina subclínica: prevalência, etiologia e testes de sensibilidade a drogas antimicrobianas. **A Hora Veterinária**, v.20, n.119, p. 19-26, 2001.
- ANDRADE, M.A.; DIAS FILHO, F.C.; MESQUITA, A.J.; ROCHA, P.T. Sensibilidade “in vitro” de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. **Ciência Animal Brasileira**, v.1, n.1, p.53-57, 2000
- ANDRADE, M.A.; MESQUITA, A.J.; FILHO, F.C.D.; JAYME, V.S. Prevalência e etiologia de mastite bovina subclínica em propriedade do estado de Goiás que utilizam ordenhadeiras na obtenção do leite. **Anais da Escola de Agronomia e Veterinária**, v.28, n.1, p.29-42, 1998.

ANVISA – Agência nacional de vigilância sanitária, Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal - PAMVet - Relatório 2004/2005 - Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo, 2006, 46p.

ARAÚJO, W.P. A fagotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, isoladas de leite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.35, n.4, p.161-165, 1998.

ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PINTO, S.M.; ÂNGELO, F.F.; SOUZA, G.N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p.440-446, 2006.

AURVALLE, A.E. Presença de antibiótico no leite. **Hora Veterinária**, v.1, p.20-27, 1981.

BALBINOTTI, M.B.; MARQUES L.T.; FISCHER V.; RIBEIRO M.E.R.; STUMPF W.J.; RECKZIEGEL F.J.; CARBONARI C.; VARELA M. Incidência do leite instável não ácido (LINA) na região sul do RS. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE, 2nd., 2002, Ribeirão Preto. Anais... São Paulo: Instituto Fernando Costa, 2002. Seção 5-06, 1 CD-ROM.

BANDOCH, P; MELO, L.S; Prevalência de mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: Uma revisão bibliográfica, **Health Science**, v.17, n.1, p. 47-51, 2011.

BARBALHO, T.C.F.; MOTA, R.A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no Estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.2, n.2, p.31-36, 2001.

BARBERIO, A.; GIETL, H.; DALVIT, P. “*In vitro*” sensibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e coliformes isolados de mastite bovina na região de Veneto, Itália, no período de 1996-1999. **Revista Napgama**, v.5, n.1, p.10, 2002.

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. **Journal of Biosciences**, v.18, n.1, p.93-102, 2002.

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**, n.2, p.69-73, 2001.

BARTLETT, P.C.; MILLER, G.Y.; HEIDER, L.E.; WILSON, D.J.; VAN WIJK, J. Temporal patterns of lost milk production following clinical mastitis in a large Michigan Holstein herd. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.1561-1572, 1991.

BEHMER, M.L.A. **Tecnologia do leite**, São Paulo: Editora Noel, 13º ed. 1999.

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

BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; SOUZA, J.A.; NERO, L.A.; SANTANA, E.H.W.; BALARIN, O.; CURIAKI, Y. Avaliação da qualidade do leite cru comercializado em Cornélio Procópio, Paraná. Controle de consumo e da comercialização. **Semina: Ciências Agrárias**, v.20, n.1, p.12-15, 1999.

BELOTI, V.; RIBEIRO JR, J.C; TAMANINI, R; YAMADA, A.K; CAVALETTI, L; SHECAIRA, C.L; NOVAES, D.G; SILVA, F.F; GIOMBELLI, C.J; MANTOVANI, F.D; SILVA, M.R. Qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado produzido no município de Sapopema/PR. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.4, n.16, 2011. Disponível em: < <http://www.revista.inf.br/veterinaria16/artigos/art02.pdf>> acesso em 10/07/2012

BEM, A; FABRINI, J.E. A comercialização informal de leite como componente de resistência camponesa em Marechal Cândido Rondon – PR. **Revista Nera**, v.8, n.6, p.14-26, 2005.

BENEDETTE, M.F.; SILVA, D.; ROCHA, F.P.C; SANTOS, D.A.N.; COSTA, E.A.A.; AVANZA, M.F.B. Mastite bovina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.7, n.11, p.1-5, 2008.

BIBALKE, D. The effect of high somatic cell count on the quality of dairy products. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.4, p.67-68, 1984.

BIGGS, D.A; JOHNSON, G; SJAUNJA, L.O. Analysis of fat, protein, lactose and total solids by infra-red absorption. In: Monograph on rapid indirect methods for measurement of the major components of milk. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n. 2008, p.21-29, 1987

BLACK, J.G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4 ed., 2002, 829p.

BOGAARD, A.E.J.M van den; LONDON, N.; STOBBERINGH, E. Antimicrobial resistance in pig faecal samples from the Netherlands (five abattoirs) and Sweden. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.45, p.663-671, 2000.

BOTTEON, R.C.C.M.; BOTTEON, P.T.L.; SILVA, R.A.; SILVA, T.F.; ZEGARRA, J.J.Q. OLIVEIRA, V.M. Estabilidade à prova do álcool e importância da mastite sobre a incidência de leite instável não ácido no Estado do Rio de Janeiro. **A Hora Veterinária**, v.25, n.149, 2006.

BRABES, K.C.S.; ANDRADE, N.J.; MENDONÇA, R.C.S.; LIMA, J.C.; LOPES, F.A. Identificação e classificação de enterotoxinas produzidas por *Staphylococcus* spp. isolados de ar de ambiente, manipuladores e de superfícies em uma indústria de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.58, n.333, p.33-38, 2003.

BRABES, K.C.S.; CARVALHO, E.P.; DIONÍSIO, F.L.; PEREIRA, M.L.; GARINO JR, F.; COSTA, E.O. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas do gênero *Staphylococcus* na etiologia dos casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos Estados de São Paulo e Minas Gerais. **Revista Nappama**, v.2, n.3, p.4-11, 1999.



BRADLEY, A. Bovine mastitis: an evolving disease. **The Veterinary Journal**, v.164, n.2, p.116-128. 2002.

BRADLEY, A.; GREEN, M. Use and interpretation of somatic cell count data in dairy cows. **In Practice**, v.27, p.310-315. 2005.

BRADY, M.S.; KATZ, S.E. Antibiotic/antimicrobial residues in milk. **Journal of Food Protection**, v.51, p.8-11, 1988.

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

BRAMLEY A.J. Mastitis, In: Andrews A.H.R.W., Blowey H.; Eddy R.G. **Bovine Medicine, Diseases and Husbandry of Cattle**. Oxford: Blackwell, p. 289-300, 1992.

BRAMLEY, A.J; CULLOR, J.S; ERSKINE, R.J; FOX, L.K; HARMON, R.J; HOGAN, J.S; NICKERSON, S.C; OLIVER, S.P; SMITH, K.L; SORDILLO, L.M. **Current concepts of bovine mastitis**. 4 ed. Madison: National Mastitis Council, 1996. 64p.

BRANDÃO, S.C.C. **O Futuro da Qualidade do Leite Brasileiro**. Indústria de Laticínios. p.68-71, 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, n.6, p.595-606, 1994.

BRASIL. Instrução normativa n. 62, de 29 de dezembro de 2011 Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite tipo A, do Leite Cru Refrigerado e do Leite Pasteurizado, Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Secretária de Inspeção de Produto Animal. Publicado no Diário Oficial da União de 30/12/2011, Seção 1, 2011.

BRASIL. Instrução normativa n.51, de 18 de setembro de 2002. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo , do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Secretária de Inspeção de Produto Animal. Publicado no Diário Oficial da União de 20/09/2002, Seção 1,p.13, 2002.

BRASIL. Portaria nº 56, de 107 de dezembro de 1999. Submete a consulta pública os regulamentos técnicos de padrão de identidade e qualidade de leite... Diário Oficial da União, Brasília, p.34, 08 dez. 1999. Seção 2.

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**, v.17, n.2, p.49-53, 1997.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P. Conceitos básicos da qualidade do leite. 1997. Disponível em: <<http://www.leitebrasil.org.br>>. Acesso em: 10/07/2012

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

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.18, p.39-44, 1998.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PORTUGAL, J.A.B. Identificação de contaminantes bacterianos no leite cru de tanques de refrigeração. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.57, n.327, p.83-88, 2002.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; SOUZA, H.M.; VARGAS, O.L. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.18, n.1, p.39-44, 1998.

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 *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.531-537. 2001.

BUENO, V.F.F.; MESQUITA, A.J.; OLIVEIRA, J.P.; NICOLAU, E.S.; OLIVEIRA, A.N.; NEVES, R.B.S.; MANSUR, J.R.G. Influência da temperatura de armazenamento e do sistema de utilização do tanque de expansão sobre a qualidade microbiológica do leite cru. **Higiene Alimentar**, v.18, n.124, p.62-67, 2004.

BUENO, V.F.F.; NICOLAU, E.S.; MESQUITA, A.J.; RIBEIRO, A.R.; SILVA, J.A.B.; COSTA, E.O.; COELHO, K.O.; NEVES, R.B.S. Mastite bovina clínica e subclínica, na região de Pirassununga, SP: Frequência e redução na produção. **Ciência Animal Brasileira**, v.3, n.2, p.47-52, 2002.

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

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

CANNON, R.Y.; HAWKINS, G. E.; WIGGINS, A. M. Duration of secretion of bacteriostatic drugs in milk. I. penicillin, following oral and parenteral administration. **Journal Dairy Science**, v.45, n.6, p.769-773, 1972.

CARLTON, W.W.; MCGAVIN, M.D. **Patologia especial de Thomson**, 2 Ed., Porto Alegre RS: Artmed, 1998, p.566-571.

CARNEIRO, A.V.; STOCK, L.A.; OLIVEIRA, V.M.; ZOCCAL, R.; CARVALHO, G.R.; MARTINS, P.C.; YAMAGUCHI, L.C.T. Mastite clínica: prevalência e custo de tratamento em rebanho leiteiro. Disponível em: <[http://www.cileite.com.br/sites/default/files/mastite\\_clinica\\_prevalencia\\_e\\_custo\\_de\\_tratamento\\_em\\_rebanho\\_leiteiro.pdf](http://www.cileite.com.br/sites/default/files/mastite_clinica_prevalencia_e_custo_de_tratamento_em_rebanho_leiteiro.pdf)> Acesso em: 10/07/2012.

CARTER, G.R; COLE JR, J.R. **Diagnostic procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology**. 6 ed., California: Academic Press inc. 1995. p. 457-467.

CASSOL, D.M.S.; SANDOVAL, G.A.F.; PERICOLE, J.J.; GIL, P.C.N.; MARSON, F.A. Introdução Agentes da Mastite Diagnóstico e Tratamento. **A Hora Veterinária**, v. 29, n. 175, p.27-31, 2010.

CASURA, C.; SCHUKKEN, Y. H.; RÜSCH, P. Quality assessment of California mastitis test as a diagnostic tool in quarter somatic cell count estimation. In: Mastitis Seminar. 1995, Tel Aviv. Anais... Proc. IDF Int., p. 3.57-3.58, 1995.

CECALAIT. (Centre D'études et de Contrôle des Analyses em Industrie Laitière) La lettre de Cecalait. Paris, 1993. p.33

CERQUEIRA, M.M.O.P; RENISON, T.V.; CUNHA, A.F; LAGE, A,D; FONSECA, L.M; RODRIGUES, R; OLIVEIRA, M; PENNA, C.F.A.M; SOUZA, M.R. Mastite em novilhas: importância e controle. VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, Anais..., Belo Horizonte, MG, 2009. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/7671/5444>> Acesso em 10/07/2012

CHAHOTA, R; KATOCH, R; MAJAN, A; VERMA, S. Clinical bovine mastitis caused by *Geotrichum candidum*. **Veterinary Archive**, v.71, p.197-201. 2001.

CHENGAPPA MM, MADDUX RL, GREER SC, PINCUS DH, GEIST LL. Isolation and Identification of yeasts and yeastlike organisms from clinical veterinary sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v.19, p.427-428, 1984.

CHI, K., ANDRADE, U., FERREIRA, A. Sanitary program in dairy cattle. Archives of Veterinary Science [Online], n.6, v.1, 2004

CODEX ALIMENTARIUS – FAO/WHO Food Standards. Codex Guidelines for the Establishment of a Regulatory Programme for Control of Veterinary Drug Residues in Foods. CAC/GL 16, 1993. Disponível em:

<[http://www.codexalimentarius.net/download/standards/47/CXG\\_016e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/47/CXG_016e.pdf)> Acesso em: 10/07/2012.

COELHO, V.R.P. Avaliação de resíduos de antimicrobiano no leite de quartos mamários não tratados de vacas com mastite tratadas por via intramamária. Dissertação (mestrado em Qualidade Produtiva Animal) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2003, 102p.

COHEN, M.L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post anti-microbial era. **Science**, v.257, n.5073, p.1050-1055, 1992.

COSTA, A.C. Mastite subclínica: Patógenos isolados e respectiva sensibilidade antimicrobiana, variação da contagem de células somáticas e fatores de risco Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária Dissertação de mestrado em Ciência Animal, 2010

COSTA, E.O. RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; SILVA, J.A.B; GARINO, J.R.F; BENITES, N.R; HORIUTI, A.M. Mastite subclínica: prejuízos causados e os custos de prevenção em propriedades leiteiras. **Revista Napgama**. v.2, p.16-20, 1999.

COSTA, E.O.; RAI, M.R.; WATANABE, E.T.; GARINO, F.; COELHO, V. Influência do tratamento intramamário de casos de mastite de bovinos em lactação em relação à presença de resíduos de antibióticos no leite de quartos sadios. **Revista Napgama**, v.3, n.4, 14-17, 2000.

COSTA, E.O. Abortamentos Infecciosos de Bovinos In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., Belo Horizonte, Anais. p.71-9. 1995.

COSTA, E.O. Resíduos de antibióticos no leite: um risco à saúde do consumidor. **Higiene Alimentar**, v.10, n.44,p.15-17, 1996.

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

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

COSTA, E.O.; RAI, R.B.; GARINO JR, F.; WATANABE, E.T.; RIBEIRO, A.R.; GROFF, M.R. Presença de resíduos de antibióticos no leite de pequena mistura de propriedades leiteiras. **Revista Napgama**, v. 2, n.1, p.10-13, 1999.

COSTA, G.M; SILVA, N; ROSA, C.A; FIGUEIREDO, H.C.P; PEREIRA, U.P. Mastite por leveduras em bovinos leiteiros do Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil, **Ciência Rural**, v.38, n.7, p.1938-1942, 2008.

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

COUSIN, M.A.; MARTH, E. H. Lactic acid production by *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris* in milk precultured with psychrotrophic bacteria. **Journal of Food Protection**, v. 40, p. 406-410, 1977.

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. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 7, n. 2, p. 139-151, 2006.

COUTO, C.R.A.; TÓRTORA, J.C.O. Leite, um alimento nem sempre perfeito: resíduos de antibióticos **Jornal Brasileiro de Medicina**, v.89, n.2, p.45-50, 2005.

CRAWSHAW, W.M; MACDONALD, N.R; DUNCAN, G. Outbreak of *Candida rugosa* mastitis in a dairy herd after intramammary antibiotic treatment. **Veterinary Records**, v.156, p.812-813, 2005.

CRUZ, A.D; BATISTA, G.C.M; MODOLO, J.R; GOTT, S.A.F; LOPES C.A.M. Atividade in vitro do danofloxacina e de sete drogas antimicrobianas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.50, n.4, p.369-373. 1998.

CULLOR, J.S. The control, treatment, and prevention of the various types of bovine mastitis. **Veterinary Medicine Food Animal Practice**, v.88, p.571-579, 1993.

CUNHA, B.A. Sepsis and septic shock. **Critical Care Clinics**, v.24, p.1-17, 2008.

DAYAN, A.D. Allergy to antimicrobial residues in food-assessment of the risk to man. **Veterinary Microbiology**, v.35, n.3-4, p.213-226, 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; NASCIMENTO, E.S. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica**, v.40, p.209-218, 2004.

DEVRIESE, L.A; HOMMEZ, J; LAEVENS, H; POT, B; VANDAMME, P; HAESBROUCK, F. Identification of aesculin-hydrolysing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. **Veterinary Microbiology**, v.70, p.87-94, 1999a.

DEVRIESE, L.A; VANDAMME P; COLLINS, M.D; ALVAREZ, N; POT, B; HOMMEZ, J; BUTAYE, P; HAESBROUCK, F. *Streptococcus pluranimalium* sp. nov., from cattle and other animals. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p.1221-1226, 1999b.

DEWDNEY, J.M; MAES, L; RAYNAUD, J.P; SCHEID, J.P. Risk assessment of antibiotic residues of beta-lactams and macrolides in food products with regard to their immunoallergic potential. **Food and Chemical Toxicology**, v.29, n.7, p.477-483, 1991.

DIAS, J.C.A.R.; HOFER, E. Bactérias Gram negativas resistentes a antimicrobianos em alimentos, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.80, n.4, p.411-421, 1985.

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

DIETRICH, J.M. Controle do resíduo de antibióticos no leite. Leite e Derivados, n.106, p.156-162, 2008.

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

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, 1996.

DONNELLY, C.W. Concerns of microbial pathogens in association with dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 6, p. 1656-1661, 1990.

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

DRESCHER, G.; MATTIELLO, S.M.; PEIXOTO, R.M; VARGAS, A.C; MACIEL, M.N; COSTA, M.M. Caracterização bioquímica e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de agentes bacterianos isolados de mastite subclínica ovina na região oeste de Santa Catarina, **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.1, p.188-193, 2010.

DÜRR, J.W. CARVALHO, M.P; SANTOS, M.V. **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo: Universitária, p.141-145. 2004.

EL-BASSIONY, T.; EL-PRINCE, E.; ABDEL-HALEEM, A.A.; SADEK, O. A. Public health hazard associated with consumption of milk from cattle infected with Subclinical Mastitis in Assiut Governorate. **Assiut Veterinary Medical Journal**, v.55, n.122 pp. 140-155, 2009.

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, n.8, p.2479-2483. 1991.

ENEROTH, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Contamination routes of Gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurized milk, evaluated by random Ly amplified polymorphic DNA (RAPD). **International Dairy Journal**, v. 10, p. 325-331, 2000b.

ENEROTH, A.; CHRISTIANSSON, A.; BRENDEHAUG, J.; MOLIN, G. Critical contamination sites in the production line of pasteurized milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 829-834, 1998.

ENEROTH, A; AHRNÉ, S; MOLIN, G. Contamination of milk with Gram-negative spoilage bacteria during filling of retail containers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 57, p. 99-106, 2000a.

ERSKINE, R.J., WALDER, R; BOLIN, C; BARTLETT, P.C; WHITE, D.G. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. **Journal Dairy Science**, v.85, p.1111-1118. 2001.

FACCIOLI, P.Y. Ocorrência de resíduos de antimicrobianos utilizados no tratamento de interrupção de lactação no início da lactação subsequente em animais com período seco recomendado. Dissertação (Doutorado faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia), Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010

FACKLAM, R.R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, p. 613-630, 2002.

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

FAGUNDES, H. Ocorrência de resíduos de antimicrobianos utilizados no tratamento de interrupção de lactação no início da lactação subsequente em animais com período seco recomendado. Dissertação (mestrado faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos), Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2003.

FAGUNDES, H.; BARCHESI, L.; NADER FILHO, A. FERREIRA, L.M.; OLIVEIRA, C.A.F. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.376-380, 2010.

FERNANDES, D. Diagnóstico laboratorial em mastites bovinas: Sua real importância e aplicação prática. Atualização Técnica 33, **Divisão Agropecuária Pfizer**, 2006.

FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.F; FERNANDEZ, E; LAS HERAS, A; PASCUAL, C; COLLINS, M.D; DONINGUEZ, L. *Streptococcus parasanguinis*: new pathogen associated with symptomatic mastitis in sheep. **Emerging Infectious Diseases**, v.4, p.645-647, 1998.

FERREIRA, J.L.; LINS, J.L.H.A.; CAVALCANTE, T.V.; MACEDO, N.A.; BORJAS, A. Prevalência e etiologia da mastite bovina no município de Teresina, Piauí, **Ciência Animal Brasileira**, v.8 n.2 p.261-266, 2007.

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, **Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1228-1234, 2006.

FERREIRO, L., SANTOS, E.C., SILVA, N. Ocorrência e etiologia da mastite bovina na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais. **Arquivo da Escola Veterinária**, v.33, p. 31-37, 1981.

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

FISCHER, V.; MARQUES, L.T.; ZANELA M.B.; RIBEIRO, M.E.R.; ABREU, A.S.; MACHADO, S.C.; FRUSCALSO, V.; BARBOSA, R.S.; STUMPF, M.T. Chemical composition of unstable non-acid milk. In: International Workshop on the Biology of Lactation Farm Animals. **Revista de Ciências Veterinárias**, v.4, n.4, s.1, p.52, 2006

FOLLY, M.M.; MACHADO, S.C.A. Determinação de resíduos de antibióticos, utilizando-se métodos de inibição microbiana, enzimático e imunoenaios no leite pasteurizado comercializado na região norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Rural**, v.31, n.1, 2001.

FONSECA, L.F.L. Estudo da prevalência da mastite bovina e sua relação com práticas de manejo, higiene e terapia em fazendas produtoras de leite tipo B no Estado de São Paulo. 148f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Curso de Pós-graduação em Ciência Animal e Pastagens, ESALQ, Universidade de São Paulo. 1992.

FONSECA, L.F.L; SANTOS, M.V. Granelização e qualidade do leite. Curso on-line sobre qualidade do leite, Módulo 12. **Instituto Fernando Costa**, Milkpoint, 2002

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

FONSECA, L.F.L; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000, 176p.

FONSECA, G.P.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F.; SILVA, R.; MOURA, M.R.L.; CARVALHO, L.M.J. Antibiotic residues in Brazilian UHT Milk: a screening study. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 451-453, abr./jun. 2009.

FONTANA, V.L.D.S. Etiologia da mastite bovina subclínica da região de Jataí/GO. Padrão genética e de suscetibilidade às drogas antimicrobianas com ênfase ao gênero *Staphylococcus*. Universidade Estadual Paulista Júlia de Mesquita Filho, Araraquara. 2002. 61p.

FONTANA, V.L.D.S.; GIANNINI, M.J.S.M.; LEITE, C.Q.F. Etiologia da mastite subclínica, sensibilidade dos agentes às drogas antimicrobianas e detecção do agente beta lactamase em *Staphylococcus aureus*. **Veterinária e Zootecnia**, v. 17, n.4, 552-559, 2010.

FRANCO, D.A.; WEBB, J; TAYLOR, C.E. Antibiotic and sulphonamide residues in meat: implications for human health. **Journal of Food Protection**, v.53, n.2, p.178-185, 1990.

FRANK, J.F.; CHRISTEN, G.L.; BULLERMAN, L.B. Tests for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R.T. Standard methods for the examination of dairy products. **American Public Health Association**, p. 271-286. 1992.

FREITAS, M.A.Q.; MAGALHÃES, H. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite. **Revista de Microbiologia**, v.21, p.315-319, 1990.

FREITAS, S.M.; MARTINS, S.S.; NOMI, A.K.; CAMPOS, A.F. Evolução do mercado brasileiro de amendoim. In: SANTOS, R.C. (Ed.). O agronegócio do amendoim no Brasil. Campina Grande: Embrapa Algodão; **Embrapa Informação Tecnológica**, p.15-44, 2005.



GELLI, D.S.; JAKABI, M.; SOUZA, A. Inibidores microbianos em leite pasteurizado do comércio da cidade de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.44, n.1, p.19-24, 1984.

GIBBONS-BURGENER, S.N.; KANEENE, J.B; LLOYD, J.W; ERSKINE, R.J. Evaluation of certification in the milk and dairy beef quality assurance program and associated factors on the risk of having violative antibiotic residues in milk from dairy farms in Michigan. **American Journal of Veterinary Research**, v.60, n.10, p.1312-1316, 1999.

GIGANTE, M.L. Importância da qualidade do leite no processamento de produtos lácteos. In: DÜRR, J.W. **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo: UPF, p. 76-88. 2004.

GLEESON, D.E.; O'CALLAGHAN, E.J.; RATH, M. The effects of genotype, milking time and treated vacuum pattern on the severity of teat-end hyperkeratosis. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, v. 42, n. 2, p. 195-203. 2003.

GONZÁLEZ, F.H.D.; DÜRR, J.W.; FONTANELI, R.S. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: UFRGS, 2001. 77 p.

GONZÁLEZ, F.H.D; CAMPOS, R. Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil. Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003. Disponível em: <<http://www6.ufrgs.br/bioquimica/extensao/SPCV2003.pdf>> Acesso em: 10/07/2012

GUÉRIN-FAUBLÉE, V.; CARRET, G.; HOUFFSCHMITT, P. *In vitro* activities of 10 antimicrobial agents against bacteria isolated from cows with clinical mastitis. **Veterinary Record**, v.152, p.466-471, 2003.

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

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.

HAMMAN, J. Effect of machine milking on teat end condition- a literature review. In: Machine milking and mastitis, **Bulletin of the International Dairy Federation**, v. 215, p. 33-49.1987.

HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v.77, n.7, p.2103-2112, 1994.

HARROP, M.H. V.; PEREIRA, L.J.G.; BRITO, J.R.F; MELLO, A.M.B. Incidência de mastite bovina na bacia leiteira do agreste meridional de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.10, p.65-67, 1975.

HAYES, M.C.; BOOR, K. Raw milk and fluid milk products. In: MARTH, E.H.; STEELE, J.L. **Applied Dairy Microbiology**. 2 ed., New York, cap. 3, p. 77-91. 2001.

HAYES, P. R. **Microbiologia e higiene de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1993, 369p.

HILLERTON, J.E; BERRY, E.A. The management e treatment of environmental streptococcal mastitis. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v. 19, p. 157-169, 2003.

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

HOGAN, J.S.; HOBLET, K.H.; SMITH, K.L.; TODHUNTER, D.A.; SCHOENBERGER, P.S.; HUESTON, W.D.; PRITCHARD, D.E.; BOWMAN, G.L.; HEIDER, L.E.; BROCKETT, B.L.; CONRAD, H.R. Bacterial and somatic cell counts in bulk tank milk from nine well managed herds. **Journal of Food Protection**, v. 51, n. 12, p. 930-934, 1988.

HOGAN, J.S.; SMITH, K.L. A practical look at environmental. NATIONAL MASTITIS COUNCIL, p. 342, 1997.

HOOG G.S; GUARRO, J. **Atlas of clinical fungi**. Contraolbureau oor Schimmelcultures, Netherlands/Universitat Rovira Virgili, Spain. 2000.

HORTET, P.; SEEGER, H. Loss in milk yield and related composition changes resulting from clinical mastitis in dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 37, p. 1-20, 1998.

HOTTA, J.M. Monitoramento de resíduos de antimicrobianos em diferentes pontos da cadeia produtiva do leite, comparando diferentes métodos de detecção. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003. 90p.

HUY, Y.H. **Foodborne disease handbook-diseases caused by bacteria**. New York: Marcel Dekker; 1994.

INNINGS, A; KRABBE, M; ULLBERG M.; HERRMANN, B. Identification of 43 *Streptococcus* species by pyrosequencing analysis of the rnpB gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.5983-5991, 2005.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Payment systems. **Bulletin of International Dairy Federation**, Brussels, n. 348, 2000.

JANZEN, J.J. Economic Losses Resulting from Mastitis. A Review. *Journal of Dairy Science* Volume 53, Issue 9, September 1970, Pages 1151–1160, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030270863615>> Acesso em 10/07/2012.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. Porto Alegre: Editora Artmed. 6 ed., 2005, 711p.

JODRAL, M.; LINAN, E.; ACOSTA, I.; GALLEGO, C.; ROJAS, F.; BENTABOL, A. Mycoflora and toxigenic *Aspergillus flavus* in Spanish milks. **International Journal of Food Microbiology**, v.18, p.171-174, 1993.

JONES, G.M. **On-farm test for drug residue in milk**, Petersburg: Virginia State University, 1999, 6p.

KANEENE, J.B.; HURD, H.S. The national Animal Health Monitoring System in Michigan. III Cost estimates of selected dairy cattle diseases. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 11, p.127-140, 1990.

KEEFE, G.P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. **The Canadian Veterinary Journal**, v.38, n.7, p. 429-437, 1997.

KEHRLI, M.; SHUSTER, D.E. Factors Affecting Milk Somatic Cells and Their Role in Health of the Bovine Mammary Gland. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 619-627. 1994.

KELLER, B; SCHEIBL, P; BLECKMANN, E; HOEDEMAKER, M. Differentiation of yeasts in mastitis milk. **Mycoses**, v.1, p.17-19, 2000.

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.

KLOSSOWSKA, A.; MALINOWSKI, E. Pathogens in raw milk which affect humans. **Medycyna Weterynaryjna**, v.57, n.1, p.28-31, 2001.

KLUYTMANS, J; BELKUM, A; VERBRUGH, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology underlying mechanisms, and associated risks. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10, p.505-20. 1997

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KRUKOWSKI, H; LISOWSKI, A; RÓZAŃSKI, P; SKÓRKA, A. Yeasts and algae isolated from cows with mastitis in the south-eastern part of Poland. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v.9, p.181-184, 2006.

KURTZMAN, C.P; FELL, J.W. **The Yeasts - A Taxonomic Study**, 4ed. Amsterdam: Elsevier, 1998, 1055p.

KURTZMAN, C.P; FELL, J.W; BOEKHOUT, T. **The Yeasts - A Taxonomic Study**, 5ed. Amsterdam: Elsevier, 2011, 1500p.

LAFFRANCHI, A.; MULLER, E.E.; FREITAS, J.C.; PRETO-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.

LAMAITA, H.C.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; CARMO, L.S.; SANTOS, D.A.; PENNA, C.F.A.M.; SOUZA, M.R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5, p.702-709, 2005.

LANGENEGGER, J.; FIGUEIREDO, M.P.; REZENDE, E.F. Eficácia terapêutica do cefacetil frente aos microrganismos dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* isolados de mastites subclínicas. **Hora Veterinária**, v.30 p.24-27, 1986.

LANGENEGGER, J.; VIANNI, M.C.E.; BAHIA, M.G. Efeito do agente etiológico da mastite subclínica sobre a produção de leite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 1, p.47-52. 1981.

.LANGONI, H; CABRAL, K.G; DOMINGUES, P.F; PULGA, M.E; MARINHO, M; PARDO, R.B. Utilização da enrofloxacin (Baytril®) no tratamento da mastite bovina estafilocócica, **Ciência Rural**, v.30, n.1, p.167-170. 2000b.

LANGONI, H; SILVA, A.V; CABRAL, K.G; DOMINGUES, P.F. Aspectos etiológicos na mastite bovina: Flora bacteriana aeróbica. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.20, p.204-209. 1998.

LANGONI, H; ICHIHARA, S.M.; SILVA, A.V. Isolamento de *Brucella* spp. do leite de vacas positivas para brucelose nos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.37, n.6, p.1-5, 2000.

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

LARANJA, L.F., Programa de controle de mastite. Periódico técnico – informativo elaborado pelo Departamento técnico da RHODIA – MÉRIEUX, Ano II, n.4, 1996

LARANJA, L.F; MACHADO, P.F. Ocorrência de mastite bovina em fazendas produtoras de leite B no estado de São Paulo, **Scientia Agricola**, v. 51, n. 2, p. 569-577, 1994.

LIEVAART, J.J; KREMER, W.D; BARKEMA, H.W. Short communication: Comparison of bulk milk, yield-corrected, and average somatic cell counts as parameters to summarize the subclinical mastitis situation in a dairy herd. **Journal of Dairy Science**. v.90, n.9, p.4145-8. 2007

LINS J.L.F.H.A.; MARREIROS V.P.N. Mastite bovina na bacia leiteira de Teresina, PI. I. Avaliação do sistema de produção. II. Prevalência de mastite. III. Contribuição à análise epidemiológica. Congresso Internacional de Medicina Veterinária em Língua Portuguesa, Salvador, BA, p.227-228, 1992.

LOPES, L.C. Composição e características físico-químicas do leite instável não ácido (LINA) na região de Casa Branca, estado de São Paulo. Dissertação (Mestrado em Zootecnia e Engenharia de Alimentos) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008. 63p.

LOPES, M.A.; DEMEU, F.A.; COSTA, G.M.; ROCHA, C.M.B.M.; ABREU, L.R.; SANTOS, G.; FRANCO NETO, A. Influência da contagem de células somáticas sobre o impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros, **Arquivo do Instituto de Biologia**, v.78, n.4, p.493-499, 2011

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

MACEDO, L.C.S.; FREITAS, J.A. Ocorrência de resíduos de antimicrobianos em leite. **Revista de Ciências Agrárias**, n. 52, p. 147-157, 2009.

MACHADO, C.A., DEMETRIO, P.F., BORGES, C.G. Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas de alta produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.12, p.1451-1457. 2003

MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; SARRÍES, G.A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 6, p.1883-1886, 2000.

MACHADO, P.F. Contagem de células somáticas no leite de rebanhos brasileiros e seus efeitos sobre a qualidade do leite. Disponível em <[http://www.megaagro.com.br/lecheria/art\\_ccs\\_mastite.asp](http://www.megaagro.com.br/lecheria/art_ccs_mastite.asp)> Acesso em 10/07/2012

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

MADALENA F.E.; MATOS L. L.; HOLANDA JR. E.V. **Produção de Leite e Sociedade: Uma Análise Crítica da Cadeia do Leite no Brasil**, Belo Horizonte: FEPMVZ, p.61-74, 2001

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

MAKOVEC, J.A.; RUEGG, P.L. Characteristics of milk sample submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. **Journal Dairy Science**, v. 86, p.3466-3472, 2002.

MARGATHO, L.F.F.; HIPOLITO, M.; KANETO, C.N. Métodos de prevenção, controle e tratamento da mastite bovina. **Boletim Técnico do Instituto de Biologia**, n.9, p.5-35, 1998.

MARQUES L.T.; ZANELA, M.B.; RIBEIRO, M.E.R.; STUMPF JR, W.; FISCHER, V. Ocorrência do leite instável ao álcool 76% e não ácido (LINA) e efeito sobre os aspectos físico-químicos do leite, **Revista Brasileira de Agrociências**, v.13, n.1, p.91-97, 2007

MARQUES, D.C. **Criação de Bovinos**. 7º ed. Belo Horizonte: CVP Consultoria Veterinária e publicações, p. 435-450. 2006.

MARTH, E.H; ELLICKSON, B.E. Antibiotic residues in milk products - A review. **Journal of Milk and Food Technology**, v.22, n.7, p. 241-9, 1959.

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

MARTIN, B.S.; MORAGA, R. Evaluación de la técnica microbiológica con *Bacillus subtilis* BGA para la identificación de residuos de antimicrobianos en leche bovina. **Avances en Ciencias Veterinarias**, v.11, p.43-48, 1996 Disponível em:<<http://www.revistas.uchile.cl/index.php/ACV/article/view/4768>> Acesso em: 10/07/2012

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

MARTINS, M.A.; VAZ, A.K. Comparação entre o Delvotest-P e o teste de coagulação pelo fermento láctico para a detecção de substâncias inibidoras no leite. **A Hora Veterinária**, v.19, n.113, p.53-55, 2000.

MARTINS, M.E.P.; NICOLAU, E.S.; MESQUITA, A.J.; NEVES, R.B.; ARRUDA, M. Qualidade do Leite Cru Produzido e Armazenado em Tanques de Expansão no Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1152-1158, 2008.

MARTINS, P.R.G.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; GOMES, J.F.; STUMPF JR, W.; ZANELA, M.B. Produção e qualidade do leite na bacia de Pelotas-RS em diferentes meses do ano. **Ciência Rural**, v.36, p.209-214, 2006.

MC DERMOTT, M.P.; ERB, H.N.; NATZKE, R.P.; BARNES, F.P; BRAY, D. Cost benefit analysis of lactation therapy with somatic cell counts as indications for treatment. **Journal Dairy Science**, v.66, p.1198-1203, 1983.

McDOUGALL, S.; MURDOUGH, P.; PANKEY, W.; DELANEY, 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.

MCINTOSH, C.; SHELDON, M. The new Delvotest SP: what are the implications for dry cow therapy? **Cattle Practice**, v. 10, p. 119-123, 2002.

MEDEIROS E.S., SANTOS M.V., PINHEIRO JR J.W., FARIA E.B., WANDERLEY G.G., TELES J.A.A.; MOTA R.A. Avaliação *in vitro* da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina; **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.1. 2009

MEDEIROS, E.S.; MOTA, R.A.; SANTOS, M.V.; FREITAS, M.F.L.; PINHEIRO JR, J.W.; TELES, J.A.A. Sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* spp. isoladas do leite de vacas com mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n.7, p. 569-574. 2009.

MEDEIROS, N.G.A.; CARVALHO, M.G.X.; SANTOS, M.G.O. LEITE, E. O; PEREIRA, J.M.; PONTES, M.P.S. Detecção de antibióticos em leite in natura consumido no município de Patos, Paraíba. **Revista Higiene Alimentar**, v.18, n.124, p.85-88, 2004.

MELVILLE, P.A.; RUZ-PERES, M.; YOKOIA, E.; BENITES, N.R. Ocorrência de fungos em leite cru proveniente de tanques de refrigeração e latões de propriedades leiteiras, bem como de leite comercializado diretamente ao consumidor. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.3, p.295-301, 2006.

MENDES, C.M.F; MIMICA, M.J. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.43, n.6, p.399-406. 2007

MENDONÇA, C.L.; FIORAVANT, M.C.S.; SILVA, J.A.B.A; SOUZA, M.I.L. Etiologia da mastite bovina. **Veterinária Notícias**, v.5, n.1, p.107-118. 1999.

MILLER, R.H.; EMANUELSSON, U.; PERSSON, E; BROLUND, L; PHILIPSSON, J; FUNKE, H. Relationships of milk somatic cell counts to daily milk yield and composition. **Acta Agriculturae Scandinavica**, v. 33, p. 209-215, 1983.

MITCHELL, J.M., GRIFFITHS, M.W.; MCEWEN, S.A.; MCNAB, W.B.; YEE, A. Antimicrobial drug residues in milk and meat; causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. **Journal of food protection**, v. 61, n. 6, p. 742-745, 1998.

MITCHELL, M.J.; YEE, A.J. Antibiotic use in animals and transfer of drug resistance to humans: should we stop treating animals with these drugs? **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.15, n.8, p.484-487, 1995

MOATS, W.A.; HARIK-KHAN, R. Rapid HPLC determination of tetracycline antibiotics in milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 931-934, 1995.

MORAIS, C.M.Q.J.; DURAES, T.S.; NOBREGA, A.W; JACOB, S.M.C. Presença de resíduos de antibióticos em leite bovino pasteurizado. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 30, n. 1, 2009.

MOREIRA, P.C.; SILVA, L.A.F.; MESQUITA, A.J. Resistência de *Staphylococcus coagulase positiva* e *Streptococcus* sp. Isolados do leite de vacas com mastite clínica na bacia leiteira de Goiânia. **Anais da Escola de Agronomia e Veterinária**. v. 27, n. 2, p. 61-68, 1997.

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

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

MUELLER, E.E.; NETO, O.H.; SOUZA JR. J.M.; MARQUES, F. A.C.; MACUCO, A.L.; GIACOMETTI, W.D.E. Estudo da prevalência da mastite bovina. **Semina**, v. 1, n. 1, p. 47-48, 1978.

MULLER, E.E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. In: Anais do II Sul- Leite: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil. Maringá: UEM/CCA/DZO – NUPEL, 2002. p.206-217, 2002. Disponível em: <<http://www.nupel.uem.br/qualidadeleitem.pdf>. > Acesso em 10/07/2012.

MUNRO, G.L.; GRIEVE, P.A.; KITCHEN, B.J. Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.39, n.1, p.7-16, 1984.

MURPHY, S.C.; CRANKER, K.; SENYK, G.F.; BARBANO, D.M; SAEMAN, A.I; GALTON, D.M. Influence of bovine mastitis on lipolysis and proteolysis in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 620–626, 1989.

MUSSER, J; ANDERSON, M; RUSHING, K.L. Potential for milk containing penicillin G or amoxicillin to cause residues in calves. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.1, p.126-133, 2001.

NADER FILHO, A; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P; ÁVILA, F.A; MONTANHOLI, R.A. Efeito de várias medidas higiênico-sanitárias durante a ordenha na contagem microbiana do leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.37, p.13-15, 1982.

NADER FILHO, A; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P; ROSSI JR, 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**, v.38, n.4, p. 581-588, 1986.

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

NADER FILHO, A; SHOCKENITURRINO, R.P.; ROSSI JR, O.D; CEMBRANELLI, E.M. Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Ribeirão Preto, São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 5, p. 53-56, 1985.

NASCIMENTO, G.G.F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M.S.P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Revista Nutrição**, v.14, n.2, 2001.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved Standard M2-A8. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003. 31p.

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

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**, v.27, n.2, 2007.



NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; PONTES NETTO, D.; PINTO, J.P.A.N.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G. M. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* and chemical residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 211-215, 2004.

NEU, H.C. The crisis in antibiotic resistance. **Science**, v.257, p.1064-1074, 1992.

NEUBAUER, G.D. Antibiotic residues: perception vs. reality. **Bovine Practice**, v.32, n.1, p.45-47, 1998.

NICKERSON, S.C. Bovine mammary gland: structure and function; relationship to milk production and immunity to mastitis. **Agri-Practice**, v. 15, n. 1, p. 11-18, 1994.

NICOLAU, E.S; NADER FILHO, A; AMARAL, L.A. Influência da mastite subclínica estafilocócica sobre as características físico químicas e celulares do leite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 16, n. 1, p.35-38, 1996.

NIJSTEN, R.; LONDON, N.; BOGAARD, A.; STOBBERINGH, V.D. Antibiotic resistance of enterobacteriaceae isolated from the faecal flora of fattening pigs. **The Veterinary quarterly**, v.15, n.4, p.152-157, 1993.

NOAL, R.C.M. Ações de melhoria contínua para incrementar a qualidade e produtividade na cadeia do leite. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Qualidade e Produtividade) Universidade de Santa Maria. Santa Maria, 2006. 97p.

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

OKERMAN, L; DEVRIESE, L.A; MAERTENS, L; OKERMAN, F; GODARO. C. Cutaneous Staphylococcosis in rabbits. **Veterinary Record**, v.114, p.313-315, 1984.

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

OLIVEIRA, A.A.; BARROS DE MELO, C.; AZEVEDO, H.C. Diagnóstico e determinação microbiológica da mastite em rebanhos bovinos leiteiros nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 226-230, 2009.

OLIVEIRA, A.A.; CARNEIRO, A.L. Ciência do Leite. 1998. Disponível em: <<http://www.cienciadoleite.com.br>>. Acesso em 10/07/2012.

OLIVEIRA, C.A.F., LOPES, L.C.; FRANCO, R.C.; CORASSIN, C.H. Composição e características físico-químicas do leite instável não ácido recebido em laticínio do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 2, p.508-515, 2011a.

OLIVEIRA, C.M.C.; SOUSA, M.G.S.; SILVA, N.S.; MENDONÇA, C.L; SILVEIRA, J.A.S; OAIGEN, R.P; ANDRADE, S.J.T; BARBOSA, J.D. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.2, p.104-110, 2011b.

OLIVEIRA, D.C.; TOMASZ, A.; DE LENCASTRE, H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. **The Lancet Infectious Diseases**, v.2, p.180-9, 2002.

OLIVEIRA, L.C.; GOMES, M.F.; VELLOSO, C.R.V. Modernização da Legislação Sanitária Federal sobre Leite e Derivados. In: CASTRO, M.C.D.; PORTUGAL., J.A.B. Perspectivas a Avanços em Laticínios. Juiz de Fora. EPAMIG. Centro Tecnológico da Zona da Mata, ILCT, 2000. 278 p.

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

OLIVEIRA, S.J. **Microbiologia veterinária: guia bacteriológico prático**. 2 ed. Canoas: ULBRA, 2000. 236p.

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

OLIVEIRA, V.M. Avaliação técnico-econômica do controle da mamite bovina. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1989. 65p.

OLIVER, S.P.; JAYARAO, B.M.; ALMEIDA, R.A. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. **Foodborne Pathogens Disease**, n.2, p.115–129, 2005.

OSTRENSKY, A. Efeitos de ambiente sobre a contagem de células somáticas no leite de vacas da raça holandesa no Paraná. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. 1999. 114p.

PAIVA, C.A.V; CERQUEIRA, M.M.O.P; SOUZA, M.R.S; LANA, A.M.Q. Evolução anual da qualidade do leite cru refrigerado processado em uma indústria de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.2, p.471-478, 2012.

PARDO, P. E.; METTIFOGO, E.; MÜLLER, E.E.; NASCIMENTO, E.R.; BUZINHANI, M.; YAMAGUTI, M.; FREITAS, J.C. E Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas no período pós-parto. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.18, n.3/4, p. 115-118, 1998.

PEREIRA, D.B.C.; SILVA, P.M.F.; COSTA JR, L.C.G.; OLIVEIRA, L.L. **Físico química do leite e derivados – Métodos Analíticos**. 2 ed., Belo Horizonte: EPAMIG, 2001, 234p.

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) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

PETZ, M. Residue analysis for antibiotics, **Meat Focus International**, v.5, n 10, p. 352-353, 1996.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. **Vencendo a luta contra a mastite**. 1 ed. Campinas: Westfalia, 2002. 192p.

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

PICININ, L.C. A Qualidade do leite e da água de algumas propriedades leiteiras de Minas Gerais: Dissertação (Mestrado) - Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003. 89p.

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

PINTO, C.L.O.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C.D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrófilas proteolíticas1. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.645-651, 2006.

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

PONCE, P. Garantia de la calidad de la leche: enfoques actuales y perspectivas em América Latina. Taller Internacional sobre calidad de la leche. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Anais...p.11-31, 1996.

PONCE, P.C; HERNANDEZ, R. Propriedades físico-químicas do leite e sua associação com transtornos metabólicos e alterações na glândula mamária In: GONZALES, F.H.D.; DURR, J.W.; FONATANELLI, R.S. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: Gráfica da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS, 2001.

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 fluminense do Rio de Janeiro. 35º Congresso Brasileiro de Veterinária – Conbravet, Gramado, RS, 2008 Disponível em: <<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R1261-2.pdf>> Acesso em 10/07/2012.

PRESCOTT, J.F. Antimicrobial drug resistance and its epidemiology, p.27-49. In: PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, J.D; WALKER, R.D. **Antimicrobial therapy in veterinary medicine**. Ames: Iowa State University Press, 2002.

PRESCOTT, S.C.; BREED, R.S. The determination of the number of the body cells in milk by a direct method. **Journal of Infection Disease**, v.7, p.632-640, 1910.

PRESTES, D.S.; FILAPPI, A.; CECIM, M.S. Suscetibilidade à mastite: Fatores que a influenciam - uma revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v.9, n.1, p.48-59, 2002

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

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

QUINN, P.J; CARTER, M.E; MARKEY, B.K; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe Publ. 1994. 330p.

QUINN, P.J; MARKEY, B.K; CARTER, M.E; DONNELLY, W.J; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

RADOSTITS, O.M.; LESLIE, K. E.; FELTROW, J. **Herd health. Food animal production medicine**. 2 ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1994, 631p.

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

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

RAINARD, P; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. **Veterinary Research**, v.37, n.3, p.369-400, 2006.

REBHUN, W.C. **Doenças do gado leiteiro**, São Paulo: Rocca, 2000.

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

REYES, J.F.F; URDANETA, A.G.; 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**, v.15, n.2, p.109-118, 2005.

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

RIBEIRO, M.G.; GERALDO, J.S.; LANGONI, H.; LARA, G.H.B.; SIQUEIRA, A.K.; SALERNO, T; FERNANDES, M.C. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos

de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.1, p.52-58, janeiro 2009.

RIBEIRO, M.E.R; PETRINI, L.A; AITA, M.; 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. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.9, n.3, p.287-290, 2003.

ROSANOVE, R. Contamination of milk penicillin. **Journal of Minnesota Medicine**, v.43, p.306-309, 1960.

ROSÁRIO, T.R. Avaliação da presença de resíduos de antibióticos no leite comercializado no município de Pirassununga, SP. Dissertação Mestrado – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga. 2002. 89 p.

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

RUEGG, P.L.; TABONE, T.J. The relationship between antibiotic residue violations and somatic cell count in Wisconsin dairy herds. **Journal Dairy Science**, v.83, n.2, p.2805-2809, 2000.

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

RUOFF, K.L. Aerococcus, Abiotrophia, and other infrequently isolated aerobic catalase-negative, Gram-positive cocci. In: MURRAY P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 8 ed. Washington: American Society for Microbiology, p.434-444. 2003.

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.

RUZ-PEREZ, M.; YOKOYA, E; PASSARELLI, D; CANTARINO, S.C; BENITES, N.R; MELVILLE, P.A. Pesquisa de fungos no leite de tanques de refrigeração de propriedades de exploração leiteira. **Arquivo Instituto Biológico**, v.71, p.663-665, 2004.

SÁ, M.E.P; CUNHA, M.L.R.S; ELIAS, A.O; VICTORIA, 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**, v. 41, p. 320-326, 2004.

SAEKI, E.K; PEIXOTO, E.C.T.M; MATSUMOTO, L.S; MARCUSSO, P.F; MONTEIRO, R.M. Mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: Sensibilidade. às drogas antimicrobianas e ao extrato **Acta Veterinária Brasília**, v.5, n.3, p.284-290, 2011.

SAMARA, S.I; PRATA, L.F.; DUTRA, I.S. Diagnóstico da situação sanitária do gado leiteiro em Pitangueiras, SP: III – Mastite. **ARS Veterinária**, v. 12, n. 2, p.141-147, 1996.

SANTOS, C.D.M; LEAL, G.S; ROSSI, D.A. Frequência e suscetibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. isolados de leite de vacas com mastites recorrentes de rebanhos da região de Uberlândia–MG. **Revista Veterinária Notícias**, v.12, n.2, p.83-88, 2006.

SANTOS, E.C. Presença de inibidores do leite fresco e suas consequências. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.40, n.240, p.3-7, 1984.

SANTOS, E.M.P.; BRITO, M.A.V.P.; LANGE, C.; BRITO, J.R.F.; CERQUEIRA, M.M.O.P. *Streptococcus* e gêneros relacionados como agentes etiológicos de mastite bovina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, n.1, p.17-27, 2007.

SANTOS, F.G.B.; MOTA, R.A.; SILVEIRA FILHO, V.M.; SOUZA, H.M.; OLIVEIRA, M.B.M.; JOHNER, J.M.Q.; LEAL, N.A.; ALMEIDA, A.M.P.; LEAL-BALBINO, T.C. Tipagem molecular de *S.aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. **Napgama**, v.6, n.1, p.19-23, 2003.

SANTOS, M.V. **Aspectos não microbiológicos afetando a qualidade do leite.** O compromisso com a qualidade do leite no Brasil, Passo Fundo, p. 269-283, 2004.

SANTOS, M.V. Efeitos da mastite sobre a qualidade do leite e dos derivados lácteos. In: Congresso Panamericano de Qualidade do Leite e Controle de Mastite, 2002, Ribeirão Preto. Anais... Ribeirão Preto: Instituto Fernando Costa, p. 179-188, 2002.

SANTOS, R.C.; MARIN, J.M. Isolation of *Candida* spp. From mastitic bovine milk in Brazil. **Mycopathologia**, v.159, p.251-253, 2005.

SAVILLE, J.A.; WITTUM, T.E.; SMITH, K.L. Association between measures of milk quality and risk of violative antimicrobial residues in grade-A raw milk. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.217, n.4, p.541-545, 2000.

SCHÄELLIBAUM, M. Efeitos de altas contagens de células somáticas sobre a produção e qualidade de queijos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 2, 2000, Curitiba. Anais... Curitiba: CIETEP/FIEP, p.21-26. 2000.

SCHALM, O.W., NORLANDER.D.O. Experimental and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.139, p.199-204, 1957.

SCHEPERS, J.A.; DIJKHUIZEN, A.A. The economics of mastitis and mastitis control in dairy cattle: a critical analysis of estimates published since 1970. **Preventive Veterinary Medicine**, v.10, p. 213-224. 1991.

SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.A.; NADER FILHO, F.A.; AVILA G.P.C. Sensibilidade dos *Staphylococcus* coagulase positiva, isolados em casos de mastite subclínica bovina, à ação de antibióticos e quimioterápicos. **ARS Veterinária**, v.12, n.1, p. 57-63.1996.

SCHUKKEN, Y.H; LESLIE, K.E; WEERSINK, A.J; MARTIN S.W. Ontario bulk milk somatic cell count reduction program. 2. Dynamics of bulk milk somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.12, p.3359-3366, 1992.

SCHUKKEN, Y.H; WILSON, D.J; WELCOME, F; GARRISON-TIKOFSKY, L; GONZALEZ, R.N. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. **Veterinary Research**, v.34, p.579–596. 2003.

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

SCHUTZ, M.; HANSEN, L.B.; STEUERNAGEL, G.R. Variation of milk, fat, protein, and somatic cells for dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v.73, p.484-493, 1990.

SEEGERS, H.; FOURICHON, C.; BEAUDEAU, F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. **Veterinary Research**, v.34, n.5, p.475-491, 2003.

SENA, M.J. Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes lisina e sistema lactoperoxidase de *Staphylococcus* sp. isolado de queijos coalho comercializados em Recife/PE. Dissertação de Mestrado (Faculdade de Medicina Veterinária). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2000. 75p.

SETTEPANI, J.A. The hazard of using chloramphenicol in food animal. **The Journal of the American Medical Association**, a.15, v.184, n.8, p.930–931. 1984.

SHITANDI, A.; KIHUMBU,G. Laboratory evaluation of the improved tube test detection limits for B-lactam residues in Kenya milk, **African Journal of Biotechnology**, v.3, n.1, p. 82-87, 2004.

SILVA, E.R.; ARAÚJO, A.M.; PINHEIRO, R.R.; ALVES, F.S.F. Efeito do estágio de lactação e da ordem de parto sobre o conteúdo celular do leite de cabras mestiças. **Veterinária Notícias**, v.11, n.1, p.81-86, 2005.

SILVA, T.J.P., SENA, M.C. Prevalência de antibióticos no leite pasteurizado tipo B e especial 3,2% de gordura consumido em Belo Horizonte, 1982-83. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, v.39, p.7-12, 1984.

SINDAN, Manual de Produtos Veterinários - MPV veiculo Oficial do SINDAN, 4 ed., São Paulo: Robe, 2003-2004. 1106p.

SISCHO, W.M. Quality Milk and Tests for Antibiotic Residues. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.6, p.1065-1073, 1996.

SMITH, B.P. **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais**. São Paulo: Manole Ltda, v.1, p.894-899, 1994.

SMITH, B.P. **Medicina interna de grandes animais**. 3.ed. São Paulo: Manole, 2006. 1728p

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

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, p. 35-37, 1997

SOUSA, F.C.; OLIVEIRA, E.N.A.; SANTOS, D.C.; SILVA, E.F.M. Ocorrência de resíduos de antibióticos em leites pasteurizados comercializados no estado do Ceará- Brasil. **Revista Verde**, v.5, n.4, p.10-14, 2010.

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

SPANAMBERG, A.; SANCHES, E.M.C.; SANTURIO, J.M.; FERREIRO, L. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. **Ciência Rural**, v.39, n.1, p.282-290, 2009.

SPANAMBERG, A; WÜNDER, JR E.A; PEREIRA, D.I.B; ARGENTA, J; SANCHES, E.M.C; VALENTE, P; FERREIRO, L. Diversity of yeasts from bovine mastitis in southern Brazil. **Revista Iberoamericana de Micología**. v.25, p.154-156. 2008.

SPINOSA H.S. Antibióticos: tetraciclina e cloranfenicol. In: *Ibid.*, **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. São Paulo: Guanabara Koogan, p.368-371. 1996.

STOGAARD, A.E.J.M; LONDON, N.; STOBBERINGH, E. Antimicrobial resistance in pig faecal samples from the Netherlands (five abattoirs) and Sweden. **Journal Antimicrobiology**, v.45, p.663-671, 2000.

SUHREN, G.; REICHMUTH, J. Interpretation of quantitative microbiological results. **Milchwissenschaft**, v.55, n.1, p.18-22, 2000

SUNDLOF, S.F. Drug and chemical residues in livestock. *Veterinary Clinics of North America*, **Food Animal Practice**, v.5, n.2, p.411-49. 1989.

TAPONEN, S; SIMOJORI, H; HAVERI, M; LARSEN, H.D; PYÖRÄLÄ, S. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. **Veterinary Microbiology**, v.115, p.199-207. 2006.

TAVARES W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antinfeciosos**. São Paulo: Editora Atheneu, p.43-100. 1996

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

TETZNER, T.A.D.; BENETTI, E.; GUIMARÃES, E.C.; PERES, R.F.G. Prevalência de resíduos de antibióticos em amostras de leite cru na região do Triângulo Mineiro, MG. **Revista Higiene Alimentar**, v.19, n.130, p. 69-72, 2005.

THORBERG, B.M.; DANIELSON-THAM, M.L.; EMANUELSON, U.; WALLER, P. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.4962-4970, 2009.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiology an introduction**. 5a. ed. Benjamin/Cummings, 2009, 960p.



TRAVERSO, S.D; CUNHA, L; FERNANDES, J.C.T; LORETTI, A.P; RHODEN, A; WUNDER JR, E; DRIEMEIER, D. Mastite com lesões sistêmicas por *Staphylococcus aureus subesp. aureus* em coelhos. **Ciência Rural**, v.33, n.2, p.373-376. 2003.

VALDE, J. P., OSTERAS, O.; SIMENSEN, E. Description of herd level criteria for good and poor udder health in Norwegian dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.86-92. 2005.

VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. **Leche y productos lácteos: tecnología, química e microbiología**. Espanha: Editorial Acribia. 1994, p.29-36.

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

VILELA, D.; LEITE, J.L.B.; RESENDE, J.C. Políticas para o leite no Brasil: passado presente e futuro. In: SANTOS, G.T.; JOBIM, C.C.; DAMASCENO, J.C. Sul Leite Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, 2002, Maringá. Anais... Maringá: UEM/CCA/DZO-NUPEL, 2002.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Dairy chemistry and physics**. Nova York: John Wiley; Sons, 1984.

WATANABE, E.T.; RIBEIRO, A.R.; SILVA, J.B.; G ARINO JR, 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.

WESTALL, S.; FILTENBORG, O. Spoilage yeasts of decorated soft cheese packet in modified atmosphere. **Food Microbiology**, v.15, p.243-249, 1998.

WEY, S.B. Bactérias multirresistentes: podemos minimizar este problema? Anais do 1o Encontro de Doenças Infecciosas Adquiridas na Comunidade e no Ambiente Hospitalar. **Arquivos Brasileiro de Medicina**, v.70, n.2, p.97-110, 1996.

WIEDMANN, M.; WEILMEIER, D.; DINEEN, S. S; RALYEA, R.; BOOR, J. K. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2085-2095, 2000.

WILLIAMS, A.M; COLLINS, M.D; Molecular taxonomic studies on *Streptococcus uberis* types I and II. Description of *Streptococcus parauberis* sp. nov. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 485-490. 1990.

WILSON C.D.; AGGER, G.A.; GILBERT, C.A; THOMASSON, C.A; TOLLING, S.T. Field trials with cefoperazone in the treatment of bovine clinical mastitis. **Veterinary Record**, v.118, p.17-19, 1986.

WILSON, D.J., GONZALEZ, R.N., DIAS, H.H. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.10, p. 2592-2598, 1997.

WINCK, C.A.; THALER NETO, A. Diagnóstico da adequação de propriedades leiteiras em Santa Catarina às normas brasileiras de qualidade do leite. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.8, n.2, p.164-172, 2009.

ZAFALON, L.F.; ARCARO, J.R.P.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; CASTELANI, L.; BENVENUTTO, F. Investigação de perfis de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lactação. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.67, n.2, p. 118-125, 2008.

ZANELA, M.B.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; BARBOSA, R.S.; MARQUES, L.T.; STUMPF JR, W.; ZANELA, C. Leite instável não-ácido e composição do leite de vacas Jersey sob restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.835-840, 2006.

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

ZSCHÖCK, M.; BOTZLER, D.; BLÖCHER, S.; SOMMERHÄUSEN, J.; HAMANN, H. P. Detection of genes for enterotoxins (ent) and toxic shock syndrome toxin-1 (tst) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase-chain-reaction. **International Dairy Journal**, v.10, p.569-574, 2000.

**CHECK LIST DE QUALIDADE**

**1. CADASTRO DA PROPRIEDADE**

Data:	Responsável pela linha:	Produtor No.
Nome da propriedade:		Telefone:
Proprietário:		Cidade:
Contato:		Tel:
e-mail:		

**2. HISTÓRICO DE QUALIDADE**

Frequência de coleta do leite pelo caminhão:	
CBT (mês: )	% Proteína (mês: )
CCS (mês: )	% Gordura (mês: )
Outros:	
Resfriamento	( ) Imersão – Temp. água: °C ( ) Expansão Próprio – Temp. do leite: °C ( ) Expansão Comunitário – Distância do tanque: m
Frequência de coleta do leite:	

**3. HISTÓRICO DA PRODUÇÃO**

Produção de leite/dia:	
Nº de animais no rebanho:	Nº de vacas:
Nº de vacas em lactação:	Nº de vacas na linha de ordenha:
Bezerros nascidos no ano:	Bezerros desmamados:

**4. MANEJO DE ORDENHA**

<b>Tipo de ordenha</b>	( ) Manual	Obs.:
	( ) Mecânica	
	( ) móvel balde/latão ao pé	
	( ) canalizada em estábulo	
	( ) balde ao pé em fosso	
	( ) canalizada em fosso	
<b>Funcionários na ordenha:</b>		
<b>Número de ordenhas/dia:</b>		
<b>Horário da(s) ordenha(s):</b>		
<b>Tempo de permanência:</b>		
Linha de ordenha: ( ) sim ( ) não		
Ordem de ordenha dos animais/lotos:		
Teste da caneca: ( ) sim ( ) não		CMT: ( ) sim ( ) não Frequência:
Os bezerros tem acesso à sala de ordenha? ( ) sim ( ) não		
Alguma alteração na rotina? ( ) sim ( ) não		
<b>Pré-dipping:</b> ( ) sim ( ) não		

<p>           Todo o teto: ( ) sim ( ) não      Todos os animais: ( ) sim ( ) não            Sempre: ( ) sim ( ) não            Tempo de contato: ( ) sim ( ) não  <b>Produto:</b>            Concentração: Conservação: Validade:            Condições de uso:            Secagem no pré-dipping? ( ) sim ( ) não                      Papel toalha: ( ) sim ( ) não         </p>
<p> <b>Higiene:</b>            Tetos ( ) sim ( ) não            Úbere ( ) sim ( ) não            Lava: ( ) sim ( ) não            Ducha ( ) Balde ( ) outra ( )            Sempre:            Todos:            Como:            Seca: ( ) sim ( ) não    Papel toalha: ( ) sim ( ) não         </p>
<p> <b>Pós-dipping:</b> ( ) sim ( ) não            Todo o teto: ( ) sim ( ) não            Todos os animais: ( ) sim ( ) não            Sempre: ( ) sim ( ) não            Tempo:            Produto:            Concentração:            Conservação:            Validade:            Condições de uso:         </p>
<p>           Alimentação pós ordenha: ( ) sim ( ) não            Obs.:         </p>

## 5. INFRAESTRUTURA

<p>           Confinado ( ) Semi-Confinado ( ) Extensivo ( )         </p>
<p>           Pasto: ( ) seco ( ) brejo ( ) encharcado ( ) acidentado ( ) em planície         </p>
<p>           Água encanada: sim ( ) não ( )            Clorada: sim ( ) não ( )            Fonte:         </p>
<p> <b>Curral de espera:</b> sim ( ) não ( )            Dimensões: ( ) pequeno ( ) médio ( ) grande            Sol: ( ) sim ( ) não            Tempo de permanência:            Recebe Suplemento: sim ( ) não ( )            Piso: ( ) limpo ( ) sujo ( ) muito sujo            Higiene: adequada ( ) não ( )            Obs.:         </p>
<p> <b>Sala de ordenha:</b>            Construção: ( ) alvenaria ( ) madeira ( ) ferro Outros:            Pé-direito: ( ) baixo - até 2 m ( ) médio - até 4 m ( ) alto - acima de 4m         </p>

Piso: ( ) terra batida ( ) cimento ( ) Outros: Condições: ( ) limpo ( ) sujo ( ) muito sujo Seco ( ) úmido ( ) Limpo: ( ) sim ( ) não Ventilação: Sol: Higiene: Obs.:
<b>Curral pós-ordenha:</b> Construção: ( ) alvenaria ( ) madeira ( ) ferro Outros: Piso: ( ) terra batida ( ) cimento ( ) Outros: Condições: ( ) limpo ( ) sujo ( ) muito sujo Seco ( ) úmido ( ) Limpo: ( ) sim ( ) não Ventilação: Sol: Higiene: Obs.:

## 6. VACAS

Raça:	
Animais antes da ordenha: ( ) limpos ( ) sujos ( ) muito sujos	
Úbere antes da ordenha: ( ) limpos ( ) sujos ( ) muito sujos	
Tetos: ( ) pequenos ( ) médios ( ) grandes Boa conformação: ( ) sim ( ) não Lesões: ( ) sim ( ) não ( ) cortes ( ) vesículas ( ) hiperqueratose ( ) Edema ( ) outros: Quartos afuncionais ( ) sim ( ) não	
Aplicação de ocitocina durante a ordenha: ( ) sim ( ) não	
<b>Comportamento durante a ordenha:</b> ( ) Calmos ( ) Estressados: ( ) Muito estressados	Micção: ( ) frequente ( ) pouco frequente Defecção: ( ) frequente ( ) pouco frequente Obs.:

## 7. ORDENHADOR(ES)

Número de ordenhadores:	
Funções específicas:	
É fixo na ordenha: ( ) sim ( ) não	Quanto tempo:
Recebeu treinamento: ( ) sim ( ) não	
Obs.:	
Uniforme: ( ) sim ( ) não	( ) limpo ( ) sujo ( ) muito sujo
Vestimenta completa: ( ) sim ( ) não	( ) limpo ( ) sujo ( ) muito sujo
Usa luvas: ( ) sim ( ) não	

Mãos: ( ) limpas ( ) sujas ( ) muito sujas Unhas cortadas e limpas: ( ) sim ( ) não Ferimentos: ( ) sim ( ) não
Lava as mãos antes da ordenha: ( ) sim ( ) não Seca: ( ) sim ( ) não ( ) vestimenta ( ) papel toalha
Obs.:

### 8. CONTROLE DA MASTITE

Existem anotações de casos de mastite clínica: ( ) sim ( ) não
Tem registro de novos casos e reincidentes: ( ) sim ( ) não
Trata casos clínicos: ( ) sim ( ) não Imediatamente após identificar: ( ) sim ( ) não Produto: Frequência: Critérios para tratamento:
Medicação prescrita por veterinários: ( ) sim ( ) não Obs.:
Descarta o leite das vacas tratadas: ( ) sim ( ) não Quanto tempo: ( ) todos os quartos ( ) quartos tratados
Faz tratamento de vaca seca: ( ) sim ( ) não ( ) sempre ( ) às vezes Produto:
Nº de casos no mês:
Responsável pelo tratamento:
Registro de animais tratados (data, produto, tempo) e evolução: ( ) sim ( ) não
Nº animais tratados: Evolução:
Animais descartados por mastite:
Produtos para tratamento disponíveis: Quais: Quantos: Conservação:

### 9. SANIDADE DO REBANHO

Estado Geral: ( ) bom ( ) regular ( ) ruim
Escore de condição corporal médio:
Enfermidades podais: ( ) sim ( ) não ( ) Quantos:
Histórico de enfermidades reprodutivas: ( ) sim ( ) não ( ) Distocias Retenção de placenta Metrite Abortos Repetição de cios Outros: Uso de hormônios ou programas de indução de cio Histórico de disfunções digestivas:

Histórico de mortalidade e causas de descarte de adultos: Causas:
VACINAS: Raiva ( ) Brucelose ( ) Carbúnculo ( ) Leptospirose ( ) IBR ( ) Mastite ( ) Aftosa ( ) Exames de Brucelose e Tuberculose: ( ) sim ( ) não Último realizado?
VERMÍFUGOS: Produto: Frequência:
CONTROLE DE CARRAPATOS Produto: Frequência: Forma de aplicação: Resultado:

### 10. EQUIPAMENTOS

Antes da ordenha: ( ) limpos ( ) sujos ( ) muito sujos
Falhas de higiene durante a ordenha: ( ) sim ( ) não Especificar:
As teteiras são desinfetadas entre as ordenhas: ( ) sim ( ) não Produto: Concentração:
A limpeza ocorre logo após a ordenha: ( ) sim ( ) não
Deslizamento/queda de teteiras excessivamente: ( ) sim ( ) não
Tempo de ordenha efetivo na ordenha:
Ordenha incompleta: ( ) sim ( ) não      Quantidade de leite residual:                  mL
Sobre ordenha: ( ) sim ( ) não
<b>OBS.:</b>