

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

**MASTITE SUBCLÍNICA: PATÓGENOS ISOLADOS E RESPECTIVA  
SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA, VARIAÇÃO DA CONTAGEM  
DE CÉLULAS SOMÁTICAS E FATORES DE RISCO**

Anna Carolina da Costa  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Auxiliadora Andrade

GOIÂNIA  
2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



## Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TE-DE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico:  Dissertação  Tese

### 2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor: **Anna Carolina da Costa** E-mail: **anna@veterinaria.med.br**

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?  Sim  Não

Vínculo Empregatício do autor: **Docente - Instituto Federal de Brasília** Agência de fomento:

—

País: **Brasil** UF: **GO** CNPJ: \_\_ Sigla: \_\_

Título: Mastite subclínica: patógenos isolados e respectiva sensibilidade antimicrobiana, variação da contagem de células somáticas e fatores de risco

Palavras-chave: **fitoterapia, leite, patógenos, resistência antimicrobiana**

Título em outra língua: **Subclinical mastitis: pathogens and their antimicrobial sensitivity, variation of somatic cell count and risk factors**

Palavras-chave em outra língua: **Phytoterapy, milk, pathogens, antimicrobial resistance**

Área de concentração: **Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos**

Data defesa: (dd/mm/aaaa) **25/02/2010**

Programa de Pós-Graduação: **Ciência Animal**

Orientador(a): **Maria Auxiliadora Andrade** E-mail: **maa@vet.ufg.br**

Co-orientador(1): **Edmar Soares Nicolau** E-mail: **rena@vet.ufg.br**

Co-orientador(2): **Valéria de Sá Jayme** E-mail: **valeria.mg@uol.com.br**

### 3. Informações de acesso ao documento:

Liberção para disponibilização?<sup>1</sup>  total  parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

[ ] Capítulos. Especifique:

[ ] Outras restrições:

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Goiânia 3 de maio de 2010

*Anna Carolina da Costa*  
Assinatura do(a) autor(a)

ANNA CAROLINA DA COSTA

**MASTITE SUBCLÍNICA: PATÓGENOS ISOLADOS E RESPECTIVA  
SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA, VARIAÇÃO DA CONTAGEM  
DE CÉLULAS SOMÁTICAS E FATORES DE RISCO**

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

**Área de concentração:**

Sanidade Animal, Higiene e  
Tecnologia de Alimentos

**Orientadora:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Auxiliadora Andrade – UFG

**Comitê de Orientação:**

Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau - UFG

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valéria de Sá Jayme - UFG

GOIÂNIA

2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
GPT/BC/UFG**

C837m Costa, Anna Carolina da.  
Mastite subclínica: patógenos isolados e respectiva sensibilidade antimicrobiana, variação da contagem de células somáticas e fatores de risco [manuscrito] / Anna Carolina da Costa. - 2010.  
xv, 90 f.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Auxiliadora Andrade, Co-orientadores: Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valéria de Sá Jayme.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, 2010.


Bibliografia.

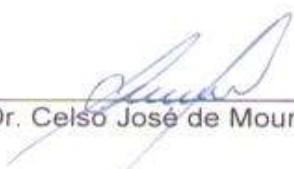
1. Fitoterapia 2. Leite 3. Patógenos 4. Resistência Antimicrobiana I.  
Título.


CDU: 618.19-002:578.76

**ANNA CAROLINA DA COSTA**

Dissertação defendida e aprovada em **25/02/2010**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade  
(ORIENTADOR (A))

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Celso José de Moura - EA/UFG

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Francisco de Carvalho Dias Filho - DMV/EV/UFG

***Dedico*** aos meus pais Maria de Fátima e Divino,  
Aos meus irmãos Eduardo e Daniella,

por todo apoio, educação e incentivo que  
sempre me prestaram, durante todos  
os momentos de minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ter me dado saúde e força para recomeçar em momentos difíceis, e poder realizar este trabalho.

Aos meus avôs pelo carinho, confiança e pelas palavras de motivação. E especialmente por compreender os constantes momentos de ausência.

À minha querida orientadora, professora Maria Auxiliadora Andrade, exemplo de profissional e mulher, agradeço pela credibilidade, confiança, pela paciência que sempre teve e a disponibilidade integral para orientar este trabalho.

À Médica Veterinária Dra. Maria Auxiliadora Leão “Dorinha” pelo carinho, amizade, conselhos e inestimável colaboração nas análises da bacteriologia, sem qual não teria isolado com segurança as bactérias deste trabalho.

À professora Maria Lúcia Gambarini por estar sempre disponível para as orientações relacionadas com a estatística do experimento.

Aos meus co-orientadores professores Edmar Soares Nicolau e Valéria de Sá Jayme pela amizade, incentivo e atenção dispensada.

À equipe do PDPL, Clayton Nunes, Saulo Paranhos, professor Milton Luiz Moreira Lima pela disponibilização dos resultados dos exames de CCS das propriedades cadastradas ao programa, e em especial ao Médico Veterinário Gustavo Feliciano Resende da Silva e estagiários pela preciosa colaboração durante as coletas de amostras de leite.

Aos produtores de leite: Hélio Bernardes, Carlos Lourenço, Sônia Maria, José Humberto, Wilton, José Neto, Júlio Maria, Rubens Júnior, Agnaldo, Mozarinho, Serley e Siles pela credibilidade e disponibilidade em abrir as portas de suas propriedades para execução deste trabalho.

Aos professores Francisco Dias de Carvalho Filho e Celso José de Moura meus sinceros agradecimentos pela participação nesta banca, o que certamente tornará este trabalho mais rico.

Aos colegas de Pós-graduação: Dunya, Eliete, Lucas, Hélio, Fernanda, Januária, Juliana, Hilari, Rodrigo, Gustavo, Mayara, Osvaldo e Fábio muito obrigada pela amizade, e pela troca de idéias, companheirismo e pelo auxílio que me ajudaram a dar continuidade dos trabalhos.



Às alunas da graduação e estagiárias do Laboratório de Bacteriologia: Ana Caroline, Angélica, Joelma e Mariana pelo auxílio na elaboração dos meios de cultivo microbiológicos.

À Tânia Almeida pela inestimável ajuda durante o período das análises laboratoriais, me auxiliando imensamente na organização dos materiais utilizados na microbiologia.

Às amigas Alice Rodrigues, Karollina Moraes e Priscilla Bessa pela grande amizade e carinho que sempre demonstraram desde a graduação e que persiste mesmo à distância, sempre me fazendo acreditar nas possibilidades de sucesso.

Ao professor João Maurício Lucas Gordo pelo grande incentivo, dedicação e disponibilidade sempre que solicitado e pela grande amizade e valiosos ensinamentos.

Ao Instituto Federal de Brasília e aos colegas de trabalho Lillian Pascoa, Ronaldo Liberato, Bruno Ceolim e Edilene Marchi pelo grande apoio e pelas várias substituições realizadas para que viabilizasse minhas vindas para Goiânia para a finalização da fase experimental e construção da dissertação.

Ao programa de Pós-Graduação da Escola de Veterinária da UFG por ter me ofertado este curso de mestrado e ter contribuído imensamente para meu crescimento profissional.

À CAPES pela bolsa concedida durante o primeiro ano do mestrado, à FUNAPE e ao Laboratório de Bacteriologia/EV/UFG pela infra-estrutura e aquisição dos materiais de consumo.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, e não tenha sido citada, minha eterna gratidão.

Meus sinceros agradecimentos.

*“Quando amamos e acreditamos do fundo de nossa alma em algo, nos sentimos mais fortes que o mundo, e somos tomados de uma serenidade que vem da certeza de que nada poderá vencer nossa fé. Esta força estranha faz com que sempre tomemos as decisões certas, na hora exata, e ficamos surpresos com nossa própria capacidade quando atingimos o nosso objetivo.”*

*Paulo Coelho*

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	1
1.1 Revisão sobre mastite bovina .....	2
1.2 Diagnóstico de Mastite .....	3
1.3 Fatores de risco para mastite .....	5
1.3.1 Fatores ligados ao hospedeiro .....	6
1.3.2 Fatores ligados ao ambiente .....	8
1.3.3 Fatores ligados ao agente etiológico .....	10
1.4 Perfil de sensibilidade .....	12
REFERÊNCIAS.....	15
CAPÍTULO 2 - PATÓGENOS ISOLADOS EM AMOSTRAS DE LEITE DE VACAS NA MESORREGIÃO DO CENTRO GOIANO E A VARIAÇÃO DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS.....	22
RESUMO.....	22
ABSTRACT .....	23
1. INTRODUÇÃO .....	24
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
2.1 Locais de estudo e seleção do rebanho.....	26
2.2 Colheita das amostras.....	26
2.3 Procedimentos laboratoriais .....	27
2.4 Análise estatística .....	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4. CONCLUSÕES .....	40
REFERÊNCIAS.....	41
CAPÍTULO 3 - FATORES DE RISCO E PROVÁVEIS FONTES DE INFECÇÃO PARA MASTITE .....	46
RESUMO.....	46
ABSTRACT .....	47
1. INTRODUÇÃO .....	48
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
2.1 Colheita das amostras e análises laboratoriais .....	50
2.2 Análise estatística .....	52
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53

4. CONCLUSÕES .....	63
REFERÊNCIAS .....	64
ANEXO.....	68
CAPÍTULO 4 - PERFIL DE SENSIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DOS AGENTES ISOLADOS DE MASTITE SUBCLÍNICA AOS ANTIMICROBIANOS E AO EXTRATO ETANÓLICO DAS FLORES DE <i>Calendula officinalis</i> .....	69
RESUMO.....	69
ABSTRACT .....	70
1. INTRODUÇÃO .....	71
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	73
2.1 Local de estudo e origem das amostras.....	73
2.2 Testes de sensibilidade <i>in vitro</i> .....	73
2.3 Análise estatística .....	75
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
3. CONCLUSÕES .....	83
REFERÊNCIAS.....	84
CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	89

## RESUMO

O presente trabalho foi conduzido em 12 explorações leiteiras e nos Laboratórios de Bacteriologia e de Qualidade de Leite, ambos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. Objetivou-se neste estudo caracterizar a população microbiana presente no leite de vacas com mastite subclínica e relacionar os patógenos identificados com a variação da contagem de células somáticas (CCS), além de identificar os fatores de risco e as prováveis fontes de infecção para a mastite subclínica, através de observações visuais, aplicação de questionários, pelo isolamento e identificação de patógenos das mãos de ordenhadores, suabes de teteiras e em soluções de *pre* e *posdipping*. O perfil de sensibilidade aos principais antimicrobianos e o efeito bactericida do extrato da *Calendula officinalis* foi determinado sobre os patógenos mais isolados em casos de mastite subclínica dos rebanhos estudados. Para avaliação da variação da CCS em relação aos patógenos envolvidos utilizou-se análises de frequência e o teste de qui-quadrado, e para os fatores de risco foram realizadas análises de Regressão Logística para testar associações entre as variáveis e o aumento da CCS. Constatou-se que os agentes com maior frequência de isolamento foram *S. aureus* (28,8% das amostras), *E. coli* (19,8%) e *Enterobacter* spp. (11,3%). A CCS média dos rebanhos foi de aproximadamente  $875 \times 10^3$  cél/mL, sendo que o tipo de agente etiológico apresentou efeito significativo sobre a variação na CCS. Verificou-se que *S. aureus* e *Streptococcus* spp. foram os responsáveis pela maior elevação da CCS, com média de  $1.192 \times 10^3$  cél/mL e  $1.174 \times 10^3$  cél/mL, respectivamente. Essa variação foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) ao ser comparado às CCS médias do leite em que foram isolados os demais microrganismos: *S. coagulase* negativo, *Pseudomonas* spp., *E. coli* e *Enterobacter* spp. Verificou-se que os fatores de risco que apresentaram associação significativa com o aumento da CCS foram higiene insatisfatória do ambiente e ordenhador, secagem inadequada dos tetos, e fatores relacionados ao equipamento de ordenha, como falta de manutenção e limpeza inadequada. As mãos dos ordenhadores assim como os conjuntos de teteiras foram capazes de veicular tanto os agentes contagiosos quanto os ambientais, importantes na epidemiologia da mastite bovina. Conclui-se também que o extrato de calêndula apresentou atividade bactericida *in vitro* sobre *S. aureus* isolados, e os antimicrobianos utilizados apresentaram variação no espectro de sensibilidade.

**Palavras-chave:** fitoterapia, leite, patógenos, resistência antimicrobiana

## CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

O setor leiteiro do Brasil destaca-se no cenário mundial como um dos maiores produtores de leite, ocupa o 6º lugar, registrando cerca de 26,75 bilhões de litros em 2007 (USDA, 2008). Nesta última década, o Estado de Goiás, tem alcançando índices cada vez mais crescentes de produção e produtividade de leite, destacando-se no *ranking* nacional com mais de um bilhão e 830 milhões de litros de leite produzidos em 2006 (IBGE, 2006).

Apesar de Goiás destacar-se pela sua elevada produção de leite, são poucos os dados relativos à qualidade do leite *in natura*, que tem se tornado cada vez mais valorizada para a comercialização, manutenção e crescimento da atividade leiteira. Segundo DIAS (2007), a qualidade do leite se define sobre os parâmetros de composição, por ser uma mistura complexa, nutritiva e estável de gordura, proteínas e outros elementos sólidos, que se encontram suspensos em água. Além deste parâmetro, tem-se o aspecto higiênico, que é influenciado pelo *status* sanitário do rebanho, presença de microrganismos e resíduos contaminantes químicos ou físicos, entre outros fatores.

Tanto na produção quanto na industrialização do leite, um dos fatores que mais reduzem a qualidade e a quantidade do produto é a mastite. Segundo CULLOR (1992), a mastite é uma doença que afeta em média 15% das vacas leiteiras em todo mundo, com prevalência na ordem de 50% (GONÇALVES & KOZICKI, 1997).

Segundo AXFORD et al. (2000) as perdas econômicas decorrentes da mastite contagiosa em termos de rebanho estão associadas principalmente à queda na produção de leite, podendo atingir prejuízos na ordem de US\$ 180,00 por animal doente, além de graves problemas de saúde pública.

Em função da ocorrência de mastite, nos Estados Unidos, estimam-se prejuízos da ordem de 1,8 bilhão de dólares ao ano, enquanto no Brasil registram-se perdas aproximadas de 3,3 bilhões de litros/ano em relação a produção anual (SANTOS & FONSECA, 2007).

Neste contexto, a sanidade do rebanho representa um dos pontos de sustentação da produção de leite de qualidade, pois a alta produtividade só pode ser alcançada se cada um dos animais que compõem o rebanho estiver em bom

estado sanitário. Portanto, a mastite surge como um grande problema a ser enfrentado, pois promove elevadas perdas de produtividade, devido à sua alta frequência nos rebanhos leiteiros.

### 1.1 Revisão da literatura sobre mastite bovina

A mastite é a denominação do processo inflamatório na glândula mamária (COSTA, 1998), que ocorre quando um agente infeccioso, químico, mecânico ou térmico agride a glândula mamária, produzindo uma reação inflamatória e danos ao epitélio glandular, caracterizando o quadro de mastite. É a doença de maior prevalência nos rebanhos leiteiros, capaz de comprometer a qualidade do leite, impactar a saúde pública e causar sérios prejuízos econômicos (TOZZETTI et al., 2008). A reação inflamatória é um mecanismo de defesa para eliminar o agente agressor, neutralizar suas toxinas e auxiliar no reparo dos tecidos produtores de leite (PHIPOT & NICKERSON, 2002).

Para BARKEMA et al. (1999), a extensão da resposta inflamatória varia de acordo com a natureza do estímulo e a capacidade de reação do animal. Reações brandas, sem alterações macroscópicas detectáveis, porém, com alterações químicas e microbiológicas do leite evidenciam a mastite subclínica.

Respostas inflamatórias mais severas, que caracterizam mastite clínica, resultam em mudanças no aspecto da secreção láctea, incluindo as alterações verificadas na forma subclínica, contudo, há visíveis mudanças no tecido mamário e alguns efeitos sistêmicos, como edema, hipertermia, prostração, dor na glândula mamária, grumos, pus ou qualquer alteração das características do leite podem estar presentes (FONSECA & SANTOS, 2000).

SANTOS & FONSECA (2007) categorizaram as mastites em ambientais e contagiosas, de acordo com os microrganismos causadores do processo inflamatório. Destas, as segundas são as mais importantes, por acometerem o maior número de matrizes produtivas, principalmente aquelas em que o agente etiológico é o *Staphyococcus aureus*, que provocam a forma subclínica de elevada incidência, de alta contagiosidade e de difícil controle com antimicrobianos. Segundo LIPMAN et al. (1996), a invasão e a lesão tecidual da glândula mamária por este microrganismo iniciam uma resposta inflamatória com

consequente aparecimento de sinais clínicos, que incluem mudanças na aparência e composição do leite, além de elevadas contagens de células somáticas (CCS) e grande redução do volume produzido, provocando grande impacto econômico.

Tanto a mastite clínica como a subclínica frequentemente têm origem bacteriana (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1999) e, de acordo com VAZ (2004), as mastites subclínicas são normalmente causadas por bactérias Gram-positivas que são transmitidas de um animal para outro principalmente durante a ordenha.

FONSECA (1996) considerou a mastite ambiental aquela causada por agentes que vivem preferencialmente no ambiente, tendo como característica a alta frequência em casos clínicos, com manifestação aguda, de curta duração e maior ocorrência no pré e pós-parto. Já a mastite contagiosa caracteriza-se por apresentar baixa frequência de casos clínicos, e alta de subclínicos, geralmente de longa duração e com contagem de células somáticas (CCS) elevada. De acordo com SANTOS & FONSECA (2007), este tipo de mastite é causada por patógenos cujo *habitat* preferido é o interior da glândula mamária e a pele dos tetos, o que propicia a disseminação do agente principalmente durante a ordenha, por meio das teteiras, das mãos dos ordenhadores e toalhas utilizadas na limpeza e secagem dos tetos.

## 1.2 Diagnóstico de Mastite

A mastite clínica pode ser diagnosticada através do exame clínico que se inicia com a inspeção visual da glândula mamária, observando inflamação do úbere, coloração e diferenças de tamanho entre os quartos mamários. Além dessas avaliações, também se devem observar as características macroscópicas do leite para detecção de anormalidades como a presença de grumos, coágulos, pus, sangue e alterações na coloração normal do leite. O exame do leite pode ser feito através da prova da caneca telada, utilizando-se os primeiros jatos da ordenha (RADOSTITIS et al., 2002; ROSA et al., 2009).

Entretanto, para o diagnóstico da mastite subclínica é necessária a utilização de exames complementares baseados no conteúdo celular do leite



(DIAS, 2007). Dessa maneira, a forma subclínica pode ser detectada indiretamente através do Califórnia Mastite Teste (CMT) e diretamente pela contagem de células somáticas (CCS) no leite. Estas são compostas basicamente por dois tipos de células: células de descamação do epitélio secretor e leucócitos de origem do sangue. As células epiteliais são oriundas da descamação normal do tecido de revestimento e secretor interno da glândula mamária, e correspondem a cerca de 2 a 25% do total de CCS da amostra. Já as células de defesa são os leucócitos, incluindo os monócitos, linfócitos, neutrófilos e macrófagos (SANTOS & FONSECA, 2007).

Para o CMT colhe-se de cada quarto mamário uma amostra de 2,0 mL de leite, à qual é adicionado na mesma proporção, um detergente aniônico (alquil-lauril sulfato de sódio) capaz de emulsificar os lipídios das membranas dos leucócitos presentes no leite, com consequente liberação de material nucléico, sendo que o DNA liberado produz uma viscosidade que caracteriza esta reação. A gelificação da mistura descrita acima é proporcional à quantidade de células presentes, e classificada em distintos escores, conforme as intensidades do processo inflamatório (RADOSTITIS et al., 2002).

A contagem eletrônica de células somáticas no leite é uma forma moderna de diagnóstico de mastite aceita internacionalmente como critério de avaliação da sanidade da glândula mamária da vaca e, conseqüentemente qualidade do leite, individualmente por ela produzido ou pelo rebanho, através do exame do tanque de expansão (RUEGG, 2006). A CCS pode ser determinada utilizando-se o contador eletrônico de células somáticas em que as amostras de leite têm os núcleos das células coradas e expostas a um raio laser, refletindo luz vermelha (fluorescência) e os sinais são transformados em impulsos elétricos detectados por um fotomultiplicador e transformados em número de células/mL (BRASIL, 2003).

De acordo com FONSECA & SANTOS (2000), na glândula mamária sadia, a CCS é geralmente menor que  $300 \times 10^3$  células/mL de leite, no entanto para HARMON (2001) e COENTRÃO et al. (2008) a mesma é considerada normal em bovinos quando está em níveis abaixo de  $200 \times 10^3$  cél/mL. Essa contagem aumenta rapidamente com a presença de bactérias dentro da glândula

mamária, podendo chegar a um milhão de células/mL de leite dentro de poucas horas.

Admite-se que a principal causa do aumento da CCS seja a presença de inflamação na glândula mamária, com envolvimento de patógenos (SOUZA et al. 2009), ainda que outros fatores como número de parições, estágio de lactação, estação do ano, possam ter efeitos indiretos na CCS (PEELER et al., 2000; CUNHA et al., 2008; RAIMUNDO et al., 2008; ZAFALON et al., 2008).

Além desses métodos, FONSECA & SANTOS (2000) recomendaram utilizar métodos microbiológicos para a identificação dos agentes etiológicos envolvidos, para a implantação de procedimentos terapêuticos e estratégias de controle e profilaxia adequados.

O exame microbiológico de amostras de leite coletadas assepticamente é considerado o método padrão para determinação da saúde do úbere e para o diagnóstico definitivo da mastite bovina, de modo que medidas de controle possam ser implementadas com maior eficiência (BRITO et al., 1999).

COSTA et al. (2001) relataram a presença de agentes microbianos, em animais que apresentaram CMT negativo, caracterizando-os como portadores. Por outro lado, amostras positivas ao teste CMT nem sempre revelam crescimento microbiano. Suspeita-se que o agente não seja eliminado de forma contínua, podendo ocorrer resultado falso negativo nas culturas. E segundo BRITO et al. (1999), as amostras de leite devem ser consideradas microbiologicamente negativas somente após duas ou três análises.

### **1.3 Fatores de risco para mastite**

Estudos epidemiológicos sobre fatores de risco identificaram características relacionadas ao animal, ao ambiente, aos patógenos, aos procedimentos de manejo e ao equipamento de ordenha, associados à mastite bovina e à variação da CCS (BRITO & BRITO, 2000; PELLER et al., 2000; SOUZA et al., 2005).

A presença de inflamação na glândula mamária, com envolvimento de patógenos é conhecida como a principal causa de aumento da CCS, podendo ainda se manifestar em decorrência de diferentes fatores, que incluem a

resistência natural do animal, infectividade e patogenicidade do agente etiológico, número de parições, estágio de lactação, estação do ano. Sendo que os fatores relacionados à rotina de ordenha, manejo, higiene do equipamento de ordenhar destacam-se pela possibilidade de difusão dos agentes causadores da enfermidade (PEELER et al., 2000; PRESTES et al., 2002; CUNHA et al., 2008).

Além desses aspectos, COENTRÃO et al. (2008) associaram a ocorrência de mastite subclínica a outros fatores, tais como animais com base do úbere junto ou abaixo do jarrete, rachaduras ou fissuras nas partes de borracha do equipamento de ordenha, inadequação das teteiras, deficiência de limpeza dos pulsadores, falta de treinamento dos ordenhadores, não utilização de diagnóstico microbiológico para mastite, imersão do conjunto de teteiras em solução desinfetante entre a ordenha de animais distintos e inserção total da cânula de antibiótico nos tetos na secagem da vaca.

No Brasil há poucos trabalhos sobre fatores de risco para mastite, sendo que um trabalho realizado por SOUZA et al. (2005) mostrou que a metodologia de análise dos fatores de risco para mastite permite a identificação e quantificação destes fatores para altas CCS do rebanho e para patógenos causadores da mastite.

### **1.3.1 Fatores ligados ao hospedeiro**

#### **Resistência natural**

Uma glândula mamária normal possui mecanismos de defesas frente às infecções. Esses mecanismos podem ser inespecíficos ou naturais e específicos (GIRAUDO, 1996). A imunidade natural ou inespecífica é predominante no início da infecção, enquanto a imunidade específica é ativada quando a infecção progride e ativam as células de defesa humoral e celular (SANTOS & FONSECA, 2007).

#### **Estágio de lactação**

Segundo HOGAN & SMITH (2008a), as infecções intramamárias (IIM) podem suceder-se em diferentes etapas da vida do animal. O parto, a

lactogênese e o período seco constituem eventos da vida reprodutiva da vaca que influenciam na suscetibilidade à mastite (ELBERS et al., 1998).

Para PRESTES et al. (2002), a ocorrência de mastite ambiental é maior no início da lactação, imediatamente ao período pós-parto. Por outro lado, a ocorrência de mastite subclínica de origem contagiosa é maior na medida em que a lactação progride. ANDERSON & CÔTÉ (1996) relacionaram a maior ocorrência da mastite no início da lactação ao estresse sofrido no parto, já que glicocorticóides contribuem para menor resposta das células de defesa. Também RAIMUNDO et al. (2008) demonstraram a significativa influência do primeiro mês de lactação sobre a contagem de células somáticas, em especial, durante o período no qual há secreção de colostro.

Outro elemento a ser considerado, segundo SANTOS & FONSECA (2005), é o período seco. Nesse período, a glândula mamária passa por uma involução ativa, principalmente nas duas semanas seguintes à secagem da vaca. ANDERSON & CÔTÉ (1996) citaram que 35% de todas as novas infecções ocorrem durante esse período. Também HURLEY & MORIN (2001), relataram que nessa fase a glândula continua a secretar leite principalmente nos dois a três dias depois de suspensão ordenha, ocorrendo acúmulo de leite que pressiona a glândula, promovendo dilatação do canal do teto e, em consequência, permitindo a penetração de microrganismos para o interior do órgão.

Além do período de secagem da vaca, ANDERSON & CÔTÉ (1996), destacaram que há outra fase crítica, ou seja, as duas últimas semanas que antecedem ao parto. Nesta fase ocorre a colostrogênese, processo que interfere em alguns mecanismos de defesa.

### **Hereditariedade, idade e número de lactações**

A seleção genética visando ao incremento na produção de leite foi acompanhada por aumento à suscetibilidade às infecções intramamárias (IIMs). A conformação mamária e tetas constituem uma característica moderada a altamente herdável; tetas planas e cilíndricas são mais suscetíveis a infecção do que as tetas de formato cônico (HURLEY & MORIN, 2001).

WANNER et al. (1998), estudando a influência da hereditariedade na frequência de IIMs, verificaram que a incidência tende a ser mais moderada no

primeiro parto. Também NICKERSON (2008) em investigações sobre mastite em novilhas verificou uma maior prevalência das IIMs em animais da raça Jersey (67,7%), quando comparado à raça Holandesa (35,0%).

Quanto à idade dos animais, LADEIRA (1998) citou que fêmeas mais velhas, de sete a nove anos, são mais suscetíveis às IIMs, devido a lesões internas e desgaste sofrido pelo esfíncter da teta e pela glândula em si.

Contudo, OLIVER et al. (2005) ressaltaram que a ocorrência das IIMs em novilhas em idade de acasalamento ou gestantes pode assumir grau significativo e persistir por longos períodos de tempo, estando associada à elevada CCS e redução substancial da produção pós-parto.

CUNHA et al. (2008) verificaram correlação negativa entre CCS e produção de leite, sendo que animais com maior número de lactações apresentam maior CCS, e animais com CCS acima de  $100 \times 10^3$  células/mL, menor produção de leite.

O aumento do número de partos é considerado um fator de risco associado ao aumento da ocorrência de mastite clínica e subclínica, pois além da maior exposição aos agentes patogênicos durante a vida produtiva, os animais jovens apresentam mecanismo de resposta imune mais eficiente que os mais velhos (PEELER et al., 2000).

WAAGE et al. (2001) mencionaram que em novilhas, a presença, antes do parto, de edema de úbere, edema de teta, sangue no leite ou vazamento de leite pelas tetas, está associada com aumento do risco de ocorrência de mastite clínica pós-parto.

### **1.3.2 Fatores ligados ao ambiente**

#### **Ordenha**

De acordo com PRESTES et al. (2002), a ordenha, seja mecânica ou manual, pode influenciar direta ou indiretamente na saúde da glândula mamária. Os aspectos negativos envolvidos neste processo e que podem influenciar na suscetibilidade à mastite compreendem: a) facilidade de transmissão de patógenos entre vacas devido à inadequada preparação da glândula para a ordenha, como lavagem e secagem dos tetos, e limpeza da ordenhadeira; b)

flutuações no sistema de vácuo da ordenhadeira, que proporcionam o movimento de leite entre as teteiras, facilitando a difusão de microrganismos; c) propensão à exposição do orifício e canal da teta aos patógenos, uma vez que pode modificar as condições da teta (eversão do orifício, microlesões e vesículas hemorrágicas), favorecendo a instalação das IIMs; d) modificação na teta e ambiente intramamário, pois pode haver perda da integridade da membrana de revestimento do canal da teta, proporcionando um meio favorável à colonização e multiplicação microbiana.

### **Instalações**

Em casos de mastite contagiosa, as instalações dos animais, os estábulos, têm pouco efeito sobre o aparecimento de novas infecções por agentes contagiosos, pois o mecanismo de transmissão se dá por meio de contágio direto durante o momento da ordenha. No entanto, o correto funcionamento do sistema de ordenha é fator fundamental no controle dessa infecção (SANTOS & FONSECA, 2007).

Segundo estes autores, em casos de mastite causada por patógenos ambientais, os sistemas de manejo com deficiência na higiene do ambiente predispõem ao alto risco de infecções, especialmente os sistemas de confinamento mal planejados. Em rebanhos com manejo inadequado do ambiente, as novilhas podem apresentar taxas de 5 a 10% de infecções após o parto.

A manutenção dos animais em baias facilita as práticas de manejo da fazenda, porém pode contribuir para aumentar a ocorrência de mastite, uma vez que os mesmos são mantidos sobre cama muitas vezes constituída por material orgânico, que favorece o desenvolvimento de microrganismos (HOGAN & SMITH, 2008b).

Além disso, os sistemas como *free-stall* quando mal projetados, deficientes em ventilação e drenagem, têm consequências danosas à saúde da glândula mamária. Para NICKERSON (2008), atenção deve ser dispensada ao combate aos insetos, uma vez que podem atuar traumatizando as tetas, bem como agindo como vetores para agentes contaminantes, difundindo as infecções.

## Clima

Segundo FERREIRA et al. (2006) e ZAFALON et al. (2008), o ambiente tem influência sobre o aparecimento de novos casos de mastite. Estes autores verificaram uma frequência superior de isolamentos de *S. aureus* em períodos com elevados índices pluviométricos, provavelmente devido às condições de umidade e temperatura favoráveis à sua sobrevivência e proliferação do patógeno e de insetos transmissores da doença.

SANTOS & FONSECA (2007) não observaram interferência entre a época do ano e o aumento na taxa de novas infecções por patógenos contagiosos nos meses mais quentes do ano. Contudo, no verão verifica-se maior taxa de manifestação clínica de casos e aumento na CCS dos animais infectados na forma subclínica, sendo provavelmente em função da queda da imunidade, resultante do estresse térmico.

### 1.3.3 Fatores ligados ao agente etiológico

Vários são os agentes etiológicos causadores da mastite, destacando-se as bactérias, fungos e algas, sendo as bactérias os agentes isolados com maior frequência. A literatura relaciona aproximadamente 137 espécies de microrganismos pertencentes a 35 gêneros, com predominância de bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* (SCHOCKEN-ITURRINO et al., 1996).

A gravidade da mastite varia consideravelmente dependendo da espécie bacteriana, da dose infectante e também da patogenicidade e infectividade do agente envolvido. Os microrganismos que comumente causam mastite podem ser divididos em dois grupos, baseados na sua origem: patógenos contagiosos e patógenos ambientais (PEELER et al., 2000; PRESTES et al., 2002).

BRITO & BRITO (1999) mencionaram que o grupo dos patógenos contagiosos de importância compreendem *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e ainda uma série de patógenos “menores”. Estes patógenos denominados menores, geralmente estão envolvidos em infecções subclínicas de menor severidade. Já *Staphylococcus* frequentemente causam mastites severas e podem ser encontrados colonizando

a pele da glândula mamária e dos tetos. Entretanto, os quartos mamários infectados são considerados os principais reservatórios destes microrganismos.

Para ZECCONI & HAHN (2000), no grupo das bactérias Gram-positivas destaca-se *Staphylococcus aureus* como o microrganismo causador de mastite contagiosa de maior ocorrência nos rebanhos mundiais. BRABES et al. (1999) relataram em levantamentos epidemiológicos nacionais e internacionais, que *S. aureus* está presente em cerca de 50% das infecções da glândula mamária dos bovinos leiteiros. Porém, estudos recentes realizados por SOUZA et al. (2009) demonstraram que entre os microrganismos patogênicos da mastite, o *Streptococcus agalactiae* foi responsável pelo maior aumento na CCS, evidenciando que os rebanhos infectados por este patógeno apresentam um aumento significativo na CCS do tanque.

Já nos grupos de bactérias causadoras de mastites ambientais, os coliformes e os *Streptococcus* não *agalactiae* são considerados como principais (FONSECA & SANTOS, 2000). Entre os coliformes, a *Escherichia coli* é a mais prevalente e grave, porque geralmente resulta em casos agudos decorrentes de um quadro causado por toxinas, causando mais frequentemente, casos de mastite clínica.

Existe também outro grupo de microrganismos capazes de causar a mastite bovina: os fungos e leveduras. Cada vez mais, a literatura registra casos esporádicos de microrganismos de origem ambiental com sua presença. Em relação à mastite micótica, as leveduras são frequentemente causas de infecções da glândula mamária. A maioria dos casos ocorre sob a forma de surtos localizados e/ou após tratamento com antimicrobianos. Os principais gêneros envolvidos são *Candida* e *Cryptococcus*, além de outros como *Geotrichum*, *Pichia* e *Trychosporon*, que vivem no ambiente dos animais leiteiros, tais como na pele do teto, nas mãos dos ordenhadores e em vários substratos orgânicos (SPANAMBERG et al., 2009).

Os sinais clínicos das mastites micóticas, na maior parte dos casos, não podem ser distinguidos das mastites bacterianas. Entretanto, o uso de antimicrobiano intramamário sem sucesso no tratamento ou a intensificação dos sintomas, com a continuidade da terapia, pode sugerir o desenvolvimento de uma etiopatogenia fúngica. O controle da mastite micótica é baseado em medidas



profiláticas, com adequado manejo da ordenha, correta higienização dos equipamentos e das instalações, com a finalidade de reduzir o número de animais acometidos, além de garantir a qualidade e a inocuidade dos produtos lácteos. (SPANAMBERG et al., 2009).

#### **1.4 Perfil de sensibilidade**

Para o tratamento da mastite bovina, a antibioticoterapia é ainda o procedimento mais utilizado. A eficácia terapêutica e benefícios econômicos são os principais pontos a serem considerados, tanto em relação ao aumento da produção como na redução das fontes de infecção (ANDRADE et al., 2000; MOTA et al., 2005).

A terapia tem por meta a eliminação das infecções preestabelecidas e, para tanto, é necessário que o antimicrobiano atinja concentrações no úbere maiores ou pelo menos iguais à concentração inibitória mínima (CIM) para os principais patógenos da mastite (COSTA et al., 1999).

ANDRADE et al. (2009) estudaram o comportamento de diferentes agentes isolados da mastite bovina, e demonstraram uma situação de alerta pelo uso indiscriminado de antibióticos no tratamento desta enfermidade. Conseqüentemente confirmaram a possibilidade de seleção bacteriana e promoção da resistência das mesmas aos diferentes antimastíticos comumente encontrados no comércio.

A origem da resistência pode ser genética ou não, e independente de qual seja a forma de maior importância neste processo, o fato é que o número de novas bactérias resistentes e patogênicas para os animais e humanos cresce mais rápido do que a capacidade dos laboratórios e indústrias produzirem novas drogas (MOTA et al., 2005).

Buscando-se a diminuição do processo de resistência microbiana aos medicamentos frequentemente utilizados, torna-se necessária a realização de isolamento bacteriano e respectivo antibiograma. Estas ferramentas são imprescindíveis no dia-a-dia da granja leiteira. Além de serem úteis para confirmar o diagnóstico clínico, os resultados laboratoriais demonstram através de seus

resultados erros de manejo, podem sugerir possíveis correções, as quais podem reduzir sensivelmente as recidivas (FERNANDES, 2006).

No entanto, REIS et al. (2003) constataram que a antibioticoterapia como estratégia para o controle de mastite subclínica em animais em lactação, não foi efetiva para o controle das mastites subclínicas, mesmo em animais que apresentaram alta contagem de células somáticas.

O antibiograma é um teste que oferece como resultado padrões de resistência ou suscetibilidade, de uma bactéria específica a antimicrobianos. A aferição de sensibilidade é fundamental para a segurança de se estar utilizando o produto certo e que melhor se aplica no combate aos agentes de mastite para cada indivíduo e levá-lo para a propriedade (FERNANDES, 2006).

Para avaliar a suscetibilidade aos antimicrobianos de espécimes isolados, os métodos habituais são baseados tanto em técnicas de difusão como de diluição em ágar. O método de difusão em disco consiste na interpretação da medida do halo de inibição formado pelo antibiótico (NCCLS, 2000a).

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) em tubos também pode ser utilizada para se avaliar a sensibilidade frente algumas drogas. O teste consiste em diluições seriadas de antibióticos em caldo e fornece a CIM de um dado antimicrobiano que, sob condições experimentais definidas, inibe o crescimento de uma bactéria. O valor da CIM é o critério de referência para definir a suscetibilidade de determinado antimicrobiano, de acordo com o NCCLS (2000b).

Outras medidas alternativas, como a utilização de produtos fitoterápicos tem sido utilizadas na tentativa de controlar a doença (PEREIRA et al., 2009a; 2009b; 2009c). O uso de extratos vegetais de conhecida atividade antimicrobiana podem adquirir significado nos tratamentos terapêuticos (LOGUERCIO et al., 2006), visto que as propriedades terapêuticas dos princípios e medicamentos fitoterápicos começam a ganhar cada vez mais espaço no tratamento veterinário. Profissionais adeptos da fitoterapia revelam alta frequência de sucessos em tratamento de parasitoses e enfermidades infecciosas, inclusive em tratamentos de mastites (COSTA, 1998).

Estudos revelam a atividade antimicrobiana da *Calendula officinalis* L., uma espécie exótica adaptada no Brasil, originária da região Mediterrânea, pertencente à família *Asteraceae* e conhecida popularmente como calêndula. O

uso do extrato das flores dessa planta tem sido recomendado devido a muitas de suas propriedades medicinais como: anti-inflamatória, bactericida, imunomodulador, anti-séptica, cicatrizante, entre outras (FRANCO, 1996; BROWN & DATTNER, 1998), além da comprovada inibição do crescimento *in vitro* de *S.aureus* (WHO, 2002; PARENTE et al., 2009), podendo ser indicada como alternativa para o controle das infecções subclínicas.

Objetivou-se neste trabalho estimar e prevalência dos principais agentes causadores da mastite subclínica, na Mesorregião do Centro Goiano, relacionar à variação da contagem de células somáticas, além de identificar os fatores de risco relacionados à ocorrência da mastite subclínica e avaliar o perfil de sensibilidade a diversos antibacterianos e ao extrato etanólico de *Calendula officinalis* sobre os patógenos isolados.

## REFERÊNCIAS

1. ANDERSON, N.G.; CÔTÉ, J.F. **Dry cow therapy**. 1996. [On line]. Disponível: <http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/dairy/facts/90-003.htm>. [Data de acesso: 25 de agosto de 2008].
2. 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.
3. ANDRADE, U.V.C.; FUNAYAMA, S.; ANDERSEN, E.R.; LEPKA, L.M.; SILVA, R.M.; SILVA, M.B.T. **Comportamento da flora e estudo da resistência bacteriana isolada em amostras de leite**. 2009. [On line]. Disponível: [http://www.utp.br/medicinaveterinaria/jornadaacademica/COMP\\_D\\_A\\_FLORA.pdf](http://www.utp.br/medicinaveterinaria/jornadaacademica/COMP_D_A_FLORA.pdf). [Data de acesso: 24 de dezembro de 2009].
4. AXFORD, R.F.E.; BISHOP, S.C.; NICHOLAS, F.W.; OWEN, J.B. **Breeding Diseases, Resistant In Farm Animals**. 2nd Edition, CAB International, Wallingford, UK, p. 3-21, 2000.
5. BARKEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y.H.; LAM, T.J.G.M.; BEIBOER, M.L.; BENEDICTUS, G.; BRAND, A. Management practices associated with the incidence rate of clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 8, p. 1643-1654, 1999.
6. BRABES, E.P.; CARVALHO, F.L.; DIONÍSIO, M.L.; PEREIRA, F. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas de gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Rev. Napgama**, v. 3, p. 4-11, 1999.
7. BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. **Diagnóstico microbiológico da mastite**. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, 1999. 16p. (Embrapa Gado Leite. Circular Técnica, 55).
8. BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P. **Mastite bovina**. São Paulo, 2000, p. 114-129.
9. 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.

10. BROWN, D.J.; DATTNER, A. Phytoterapeutic Approaches to Common Dermatologic Conditions. **Arch of Dermatologic**, v. 134, p. 1401-1404, 1998.
11. COENTRÃO, C.M.; SOUZA, G.M.; BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P.; LILENBAUM, W. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 60, n.2, p.283-288, 2008.
12. COSTA, E.O. Importância da mastite na produção leiteira do Brasil. **Revista de Educação Continuada do CMRV-SP**. São Paulo, v. 1, p. 3-9, 1998.
13. COSTA, E.O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNADI, M.M.; **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 422-434.
14. COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; GARINO JR., F. Portador: um importante elo na epidemiologia de mastite infecciosa bovina. In.: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2001. Salvador, **Anais....** Salvador, 2001, p. 159.
15. CULLOR, J.S. Mastitis in dairy cows. Does it hinder reproductive performance? **Veterinary Medicine**. v. 8, p. 830-835, 1992.
16. CUNHA, R.P.L.; MOLINA, L.R.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J.; FERREIRA, P.M.; GENTILINI, M.B. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 60, n. 1, p. 19-24, 2008.
17. DIAS, R.V.C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. **Acta Veterinária Brasília**. v. 1, n. 1, p. 23-27, 2007.
18. ELBERS, A.R.W., MILTENBURG, J.D., DE LANGE, D., CRAUWELS, A.P.P., BARKEMA, H.W., SCHUKKEN, Y.H. Factors for clinical mastitis in a random sample of dairy herds from the Southern part of the Netherlands. **Journal of Dairy Science**. v. 81, n. 2, p. 420-426, 1998.
19. FERNANDES, D. Diagnóstico laboratorial em mastites bovinas: sua real importância e aplicação prática. **Atualização técnica 33, Divisão Agropecuária Pfizer**, 2006. [On line]. Disponível: <[http://www.pfizersaudeanimal.com.br/bov\\_atualizacoes15.asp](http://www.pfizersaudeanimal.com.br/bov_atualizacoes15.asp)>. [Data de acesso: 28 de dezembro de 2009].

20. FERREIRA, L.M.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, E.; ZAFALON, L.F.; SOUZA, V. Variabilidade fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados em casos de mastite subclínica bovina. **Ciência Rural**. v. 36, p. 1228-1234, 2006.
21. FONSECA, L.F.L. Programa de Controle de Mastite; Mastite contagiosa, definição, diagnóstico e controle. **Bovinocultura Dinâmica**. Rhodia Mérieux. Ano II, n. 4, p. 1-5. 1996.
22. FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. p. 36-43.
23. FRANCO, L.L. **As Sensacionais 50 Plantas Medicinais campeãs de poder curativo**. Curitiba: Editora Santa Mônica, 1996. 241p.
24. GIRAUDO, J.A. Conceptos basicos sobre inmunologia de la glandula mamaria y utilización de vacunas contra mastitis. In: VERÍSSIMO, C.J, AMARAL, J.B. **2º Encontro de pesquisadores em mastite bovina do Estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto de Zootecnia, 1996. p. 73-86.
25. GONÇALVES, D.; KOZICKI, L.E. Biochemical and immunological profiles during the parturition period in dairy cows, with and without placental retention and mastitis. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**. v. 34, n. 6, p. 371-382, 1997.
26. HARMON, R. J. Somatic cell counts: a primer. In: ANNUAL MEETING NATIONAL MASTITIS COUNCIL, Reno. **Proceedings**. Madison: National Mastitis Council. p. 3-9, 2001.
27. HOGAN, J.S., SMITH, K.L. **Risk factors associated with environmental mastitis**. 2008. [On line]. Disponível: <<http://www.nmconline.org/articles/riskfactors.htm>>. [Data de acesso: 02 de setembro de 2008a].
28. HOGAN, J.S., SMITH, K.L. **Environmental streptococcal mastitis: Facts, Fables, and Fallacies**. 2008. [On line]. Disponível: <<http://www.wdmc.org/2007/hogan.pdf>>. [Data de acesso: 02 de setembro de 2008b].
29. HURLEY, W.L., MORIN, D.E. Factors affecting susceptibility to mastitis. **Lactation biology**. 2001 [On line]. Disponível: <<http://www.classes.aces.uiuc.edu/AnSci308/>>. [Data de acesso: 15 de julho de 2008].

30. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário**. 2006. [On line]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/1995\\_1996/52/d52\\_t09.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/1995_1996/52/d52_t09.shtm). [Data de acesso: 28 de abril de 2008].
31. LADEIRA, S.R.L. Mastite Bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MENDES, M.D.C. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. Pelotas: UFPEL Universitaria, 1998. 651 p.
32. LIPMAN, L.J.A.; NIJS, A.; LAM, J.G.M.; ROST, J.A.; DIJK, L.V.; SCHUKKEN, Y.H.; GAASTRA, W. Genotyping by PCR, of *Staphylococcus aureus* strains, isolated from mammary glands of cows. **Veterinary Microbiology**. n. 48, p. 51-55, 1996.
33. LOGUERCIO, A.P.; GROFF, A.C.M.; PEDROZZO, A.F.; WITT, N.M.; SILVA, M.S.; CASTAGNA DE VARGAS, A. Atividade *in vitro* do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 41, n. 2, p. 347-349, 2006.
34. MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos**. São Paulo, 2003. 115p.
35. MOTA, R.A.; SILVA, K.P.C.; FREITAS, M.F.L.; PORTO, W.J.N.; SILVA, L.B.G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana – Artigo de Revisão. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**. v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.
36. NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Laboratory Handbook on Bovine Mastitis**. Revised Edition. National Mastitis Council, Inc., Madison, WI. 222p. 1999.
37. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY PERFORMANCE STANDARDS. **Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. Approved Standard M2-A5 NCCLS, Villanova, PA, 2000a.
38. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY PERFORMANCE STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically**. Approved Standard M7-A4 NCCLS, Villanova, PA, 2000b.
39. NICKERSON, S.C. **Mastitis control in replacement heifers**. 2008. [On line]. Disponível em:

<<http://www.wcds.afns.ualberta.ca/Proceedings/1996/wcd96389.htm>> [Data de acesso: 10 de setembro de 2008].

40. OLIVER, S.P.; GILLESPIE, B.E.; LEWIS, M.J.; DOWLEN, H.H. Prevalence of mastitis in heifers and strategies for control. **The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**. v.3, n. 2. 2005. [On line]. Disponível: <<http://www.jarvm.com/articles/Vol3Iss2/OLIVER.pdf>>. [Data de acesso: 28 de agosto de 2008].
41. PARENTE, L.M.L.; SILVA, M.S.B.; BRITO, L.A.B.; LINO-JÚNIOR, R.S.; PAULA, J.R.; TREVENZOL, L.M.F.; ZATTA, D.T.; PAULO, N.M. Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 11, n. 4, p. 383-391, 2009.
42. PEELER, E.J.; GREEN, M.J.; FITZPATRICK, J.L. Risk factors associated with clinical mastitis in low somatic cell count British dairy herds. **Journal of Dairy Science**. v. 83, p. 2464-2472, 2000.
43. PEREIRA, A.V.; LÔBO, K.M.S.; BEZERRA, D.A.C.; RODRIGUES, O.G.; ATHAYDE, A.C.R.; MOTA, R.A.; DE LIMA, E.Q., DE MEDEIROS, E.S. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de jurema preta e neem sobre amostras de *Staphylococcus* sp. isoladas de mastite em búfalas. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 76, n. 3, p. 341-346, 2009a.
44. PEREIRA, A.V.; RODRIGUES, O.G.; AZEVEDO, T.K.B.; BEZERRA, D.A.C.; DE LIMA, E.Q.; PEREIRA, M.S.V. Perfil de extrato de plantas sobre *Staphylococcus aureus* isolado de mastite bovina. **Revista de Biologia e Farmácia**. ISSN 1983-4209, v. 3, n. 1, p.105-111, 2009b.
45. PEREIRA, A.V.; RODRIGUES, O.G.; LIMA, E.Q.; Oliveira, K.A.; MOTA, R.A.; DE MEDEIROS, E.S. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extrato de Jurema preta (*Mimosa tenuiflora*) e antibióticos sintéticos utilizados no tratamento de mastite em bubalinos. **Revista de Biologia e Farmácia**. SSN 1983-4209, v. 3, n. 1, p. 105-111, 2009c.
46. PHILPOT, N.W.; NICKERSON, S.C. **Vencendo a luta contra a mastite**. Piracicaba: Westfalia Surge/ Westfalia Landtechnik do Brasil, 2002. 192p.
47. PRESTES, D.S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam – uma revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**. v. 9, n. 1, p. 118-132, 2002.



48. RADOSTITIS, 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: Ganabara Koogan. p.1737. 2002.
49. RAIMUNDO, R.F.S.; POGLIANI, F.C.; CYRILLO, F.C.; NOGUEIRA, J.S.; BIRGEL JUNIOR, E.H. Avaliação do número de células somáticas do leite de bovinos da raça Jersey durante o primeiro mês de lactação. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science.** v. 45, n. 6, p. 443-450, 2008.
50. REIS, S.R.; SILVA, N.; BRESCIA, M.V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** v. 55, n. 6, p. 651-658, 2003.
51. ROSA, M.S.; COSTA, M.J.R.P.; SANT'ANNA, A.C.; MADUREIRA, A.P. **Boas Práticas de Manejo – Ordenha.** Jaboticabal: Funep, 2009. 43 p.
52. RUEGG, P.L. Uso de um novo teste rápido para contagem de células somáticas. 2006. In: X Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos – Sanidade. **Anais...** p. 222-229. 2006.
53. SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Importância do tratamento no controle da mastite bovina.** In: Coleção Gado de Leite. Campinas Quiron, p. 20. 2005.
54. SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria na Qualidade do Leite.** Barueri: Manole, 2007. 314p.
55. 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.
56. SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; MOREIRA, E.C.; BRITO, M.A.V.P.; BASTOS, R.R. Fatores de risco associados à alta contagem de células somáticas do leite do tanque em rebanhos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** v. 57, n. 2, p. 251-260, 2005.
57. SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; MOREIRA, E.C.; BRITO, M.A.V.P.; SILVA, M.V.G.B. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** v. 61, n.5, p. 1015-1020, 2009.

58. SPANAMBERG, A.; SANCHES, E.M.C.; SANTURIO, J.M.; FERREIRO, L. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras - Revisão Bibliográfica. **Ciência Rural**. v. 39, n. 1, 2009.
59. TOZZETTI, D.S.; BATAIER, M.B.N.; ALMEIDA, L.R.; PICCININ, A. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas – revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**. Ano VI – Número 10 – Janeiro de 2008 – Periódicos Semestral. [On line]. Disponível em: <<http://www.revista.inf.br/veterinaria10/revisao/edic-vi-n10-RL74.pdf>> [Data de acesso: 30 de dezembro de 2009].
60. USDA. **United States Department of Agriculture**. 2008. [On line] Disponível: <<http://www.milkpoint.com.br/estatisticas/Producao.htm>>. [Data de acesso: 21 de janeiro de 2008].
61. VAZ, A.K. Imunidade na Glândula Mamária. **CBQL em Revista**. v. 3, n. 5, p. 16-19. 2004.
62. WAAGE, S.; ODEGAARD, S.A.; LUND, A.; BRATTGJERD, S.; ROTHE, T. Case control study of risk factors for clinical mastitis in postpartum dairy heifers. **Journal of Dairy Science**. v. 84, n. 2, p. 392- 399, 2001.
63. WANNER, J.M.; ROGERS, G.W.; KEHRLI, M.E.; COOPER, J.B. Intramammary infections in primiparous Holsteins: heritabilities and comparisons of bovine leukocyte adhesion deficiency carriers and non carriers. **Journal of Dairy Science**. v. 81, n. 12, p. 3293-3299, 1998.
64. WHO. **Monographs on: Selected medicinal plants**. Geneve, v. 2, 2002, p. 35-44.
65. ZAFALON, L.F.; LANGONI, H.; BENVENUTTO, F.; CASTELANI, L.; BROCCOLO, C.R. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. **Veterinária e Zootecnia**. v. 15, n. 1, p. 56-65, 2008.
66. ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin of IDF**. v. 345, p. 15-18, 2000.

## CAPÍTULO 2 - PATÓGENOS ISOLADOS EM AMOSTRAS DE LEITE DE VACAS NA MESORREGIÃO DO CENTRO GOIANO E A VARIAÇÃO DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS

### RESUMO

A mastite subclínica constitui uma das principais causas de perdas econômicas nas explorações de bovinos leiteiros, devido principalmente à redução na produção de leite e aumento da contagem de células somáticas (CCS). Objetivou-se neste trabalho, caracterizar a população microbiana presente em mastite subclínica e relacionar os patógenos identificados com a variação da CCS. Realizou-se o estudo em 12 rebanhos leiteiros do Estado de Goiás. Os resultados encontrados foram analisados pela análise de frequência e teste de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Os agentes mais isolados foram *S. aureus* (28,7% das amostras), *E. coli* (19,8%) e *Enterobacter* spp. (11,3%). A CCS média dos rebanhos foi de aproximadamente  $875 \times 10^3$  cél/mL, sendo que o tipo de agente etiológico apresentou efeito significativo sobre a variação na CCS. Verificou-se que *S. aureus* e *Streptococcus* spp. foram os responsáveis pela maior elevação da CCS, com média de  $1.192 \times 10^3$  cél/mL e  $1.174 \times 10^3$  cél/mL, respectivamente. Essa variação foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) ao ser comparado às CCS médias do leite em que se isolaram os demais microrganismos: *S. coagulase* negativo, *Pseudomonas* spp., *E. coli* e *Enterobacter* spp. Por isso pode-se concluir que bactérias Gram-positivas elevaram os valores da CCS superiores às Gram-negativas.

**Palavras-chave:** agentes etiológicos, diagnóstico, prevalência, CCS, mastite subclínica.

## ISOLATED PATHOGENS IN MILK SAMPLES OF COWS IN THE MESOREGION OF GOIAS STATE CENTER

### ABSTRACT

The subclinical mastitis is one of the main causes of economic losses in milk cattle breeding, due, mainly, to the reduction of milk production and to the increase of somatic cells count (SCC). The purpose of this work was to characterize the microbial population in subclinical mastitis and to relate the pathogens identified with the variation of the SCC. The study was carried out with 12 milk herds from the State of Goias. The results were analyzed by the frequency analysis and by Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests. The most isolated agents were *S. aureus* (28,7% of the samples), *E. coli* (19,8%) and *Enterobacter* spp. (11,3%). The average SCC of the herds was approximately  $875 \times 10^3$  cel/mL, and the type of etiologic agent presented significant effect on the SCC variation. The agents *S. aureus* and *Streptococcus* spp. were identified as responsible for the greatest increase of the SCC, with average of  $1.192 \times 10^3$  cel/mL and  $1.174 \times 10^3$  cel/mL, respectively. This variation was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than the average SCC of the milk in which the other microorganisms were identified: *S. coagulase* negative, *Pseudomonas* spp., *E. coli* and *Enterobacter* spp. Therefore, it can be concluded that Gram-positive bacteria increased the values of SCC to a higher level than the Gram-negative.

**Keywords:** Etiologic agents, diagnosis, prevalence, SCC, mastitis subclinical.

## 1. INTRODUÇÃO

A mastite subclínica está entre as principais doenças em fazendas leiteiras, causando grandes prejuízos aos produtores, principalmente devido à redução na produção de leite (ZAFALON et al., 2007) e aos prejuízos na qualidade do leite produzido, com consequências no segmento da produção dos derivados lácteos (SPANAMBERG et al., 2009).

A realização periódica de exames laboratoriais do leite pode fornecer dados valiosos sobre a frequência e a prevalência dos agentes etiológicos envolvidos nos casos de mastite da região e, se bem aplicados, podem, com medidas simples indicar correções de manejo que o isolamento bacteriano venha a sugerir, evitar recidivas em vacas de boa produção e reduzir sensivelmente os prejuízos (GONÇALVES, 2006).

Dentre os agentes etiológicos, as bactérias têm maior incidência, consistindo cerca de 80 a 90% dos casos de mastite (BRABES et al., 1999). Os microrganismos que comumente causam mastite podem ser divididos em dois grupos, baseados na sua origem: patógenos contagiosos e patógenos ambientais, sendo que a gravidade da mastite varia consideravelmente dependendo da espécie bacteriana, da dose infectante e também da patogenicidade e infectividade do agente envolvido (PEELER et al., 2000; PRESTES et al., 2002).

Para SANTOS & FONSECA (2007), os chamados contagiosos são os mais importantes, por acometerem o maior número de matrizes produtivas. Tais agentes necessitam do animal para sobrevivência, multiplicam-se na glândula mamária, canal do teto ou sobre a pele e são transmitidos de uma vaca infectada ou quarto infectado para uma vaca sadia ou quarto sadio, principalmente durante a ordenha. Os principais agentes contagiosos são: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium bovis*. Os denominados ambientais são oportunistas, estão presentes no ambiente em que o animal vive e a infecção pode ocorrer no período entre as ordenhas. Neste grupo encontram-se: *Streptococcus uberis*, diversas bactérias da família *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. e outros microrganismos, tais como fungos, principalmente as leveduras.

A invasão e a lesão tecidual da glândula mamária pelos microrganismos iniciam uma resposta inflamatória que pode ou não determinar sinais clínicos, com mudanças na aparência e composição do leite, além de elevadas contagens de células somáticas (CCS) e grande redução do volume de leite produzido, provocando um impacto de grande importância econômica (LIPMAN et al., 1996).

Admite-se que a principal causa do aumento da CCS seja a presença de inflamação na glândula mamária, com envolvimento de patógenos (SOUZA et al., 2009), ainda que outros fatores como número de parições, estágio de lactação, resistência natural do animal, estação do ano, infectividade e patogenicidade do agente etiológico possam ter efeitos indiretos na CCS (PEELER et al., 2000; CUNHA et al., 2008; RAIMUNDO et al., 2008; ZAFALON et al., 2008). E fatores relacionados à rotina de ordenha, manejo, higiene do equipamento de ordenhar destacam-se pela possibilidade de difusão dos agentes causadores da enfermidade (PRESTES et al., 2002; CUNHA et al., 2008).

Desta maneira, a CCS do leite de uma vaca indica de maneira quantitativa, o grau de infecção da glândula mamária, e através da CCS do leite do tanque, o grau de infecção média de mastite do rebanho (MACHADO et al., 2000). A partir da instituição da Instrução Normativa 51, a qual estabelece novos padrões para a produção do leite cru, que inclui a contagem de células somáticas (CCS) e a contagem bacteriana total (CBT) como parâmetros para se avaliar a qualidade do leite produzido no Brasil (BRASIL, 2002), tornou-se necessária a adequação dos produtores para a produção de leite com índices aceitáveis de CCS. Destaca-se que a referida normativa determinou  $750 \times 10^3$  células/mL em 2008; padrão utilizado nos Estados Unidos, sendo que a partir de julho de 2011, prevê a diminuição para  $400 \times 10^3$  cél/mL, padrão utilizado na União Européia (BRASIL, 2002).

Diante deste quadro, objetivou-se no presente trabalho determinar o perfil microbiológico dos agentes causadores da mastite subclínica e relacioná-los a variação dos valores de CCS individualmente.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Locais de estudo e seleção do rebanho

O estudo foi conduzido em doze propriedades leiteiras, assistidas pelo Programa de Desenvolvimento da Pecuária Leiteira (PDPL), convênio Nestlé-UFG-FUNAPE, localizadas na mesorregião do Centro Goiano, no raio de 150 Km de Goiânia, durante os meses de janeiro a novembro de 2009. As análises da CCS foram realizadas no Laboratório de Qualidade do Leite (LQL) e as bacteriológicas no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária, ambos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (EV/UFG).

A seleção dos rebanhos que participaram do estudo foi realizada a partir de indicação da equipe de trabalho do PDPL, em propriedades que dispunham de equipamento de ordenha mecânica, sendo analisadas aproximadamente 50% das vacas em lactação de cada propriedade. Considerou-se, ainda, a disponibilidade e o interesse do proprietário em participar do estudo, e também a distância entre as propriedades e os laboratórios.

No momento da ordenha, após o teste da caneca telada e constatação de ausência de mastite clínica, coletaram-se de forma asséptica, 306 amostras de leite de vacas em lactação. Os animais que estavam no início da lactação e nos 30 dias anteriores à secagem, conforme preconizado por ZAFALON et al. (2008), foram excluídos do presente estudo.

### 2.2 Colheita das amostras

Imediatamente antes da ordenha, após os animais serem submetidos ao teste da caneca telada e não apresentarem mastite clínica, os tetos foram higienizados com a solução de *predipping* usada na propriedade. Após a secagem de cada quarto com papel-toalha, procedeu-se a desinfecção do orifício da teta com algodão embebido em álcool 70°GL, a seguir foi realizada a colheita asséptica da amostra de leite, 5 mL por teta de cada vaca em frascos esterilizados para a análise microbiológica. Para a realização da contagem de células somáticas (CCS) foram coletadas em frascos contendo o conservante Bronopol®. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas sob refrigeração,

em recipientes isotérmicos, com gelo reciclável, sendo encaminhadas imediatamente ao laboratório.

## **2.3 Procedimentos laboratoriais**

### **a) Análise da contagem de células somáticas**

A contagem de células somáticas (CCS) foi realizada utilizando-se o contador eletrônico de células somáticas Fossomatic 500 Basic (Foss Electric A/S. Hillerod, Denmark), com capacidade de análise de 300 amostras/hora e cujo princípio analítico baseia-se na citometria de fluxo.

### **b) Isolamento e identificação do agente infeccioso**

As amostras de leite foram submetidas à cultura bacteriológica pelo método convencional, de acordo com o NATIONAL MASTITIS COUNCIL (1999), com algumas modificações.

Foi semeado 1,0 mL de leite em Tioglicolato, e feitos repiques com uma alça de níquel cromo de 0,1 mL em ágar sangue contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro e ágar MacConckey. As placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas. Isolados do ágar sangue foram avaliados quanto às características morfológicas e submetidas ao teste de KOH a 3% e à coloração de Gram. Unidades formadoras de colônia identificadas como cocos Gram-positivos, foram submetidas a provas de catalase, utilização do manitol, oxidação e fermentação da glicose e coagulase em tubos. Com base em SEARS et al. (1993), os *Staphylococcus* coagulase positivo: *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* podem ser rotineiramente identificados como *S. aureus*, tal critério foi adotado neste trabalho.

Isolados Gram-negativos foram transferidos para o triplice açúcar ferro (TSI), assim como as colônias provenientes do ágar MacConckey, para se avaliar o comportamento em relação aos açúcares. Após, realizaram-se testes de produção de urease, de indol, prova do vermelho metila, utilização de citrato de *Simmons* e malonato (KONEMAN et al., 2001).



Quando não ocorria crescimento bacteriano algum nos meios utilizados, reiniciava-se o procedimento repicando 0,1 mL de tioglicolato nos meios ágar sangue e MacConckey e seguia-se o mesmo protocolo.

#### **2.4 Análise estatística**

A análise dos resultados dos patógenos encontrados foi realizada de forma descritiva. Os valores absolutos foram tabulados, calculados os respectivos percentuais e comparados às informações disponíveis na literatura (SAMPAIO, 1998).

Utilizaram-se os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis para relacionar a variação da CCS de acordo com os patógenos isolados, na análise estatística fixou-se o nível de 95% de confiança. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o Software SPSS 15.0 (MONTEIRO FILHO, 2004).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os rebanhos estudados eram constituídos por animais mestiços (Holandês x Gir com diferentes graus de sangue), sendo que o número médio de vacas em lactação foi de 50 animais, tendo a propriedade menor 22 vacas em lactação e a maior 80.

Na Tabela 1 estão expressos os microrganismos isolados no leite dos quartos mamários de vacas oriundas das 12 propriedades leiteiras estudadas. Das 306 amostras de leite obtidas, *Staphylococcus aureus* foi o microrganismo mais isolado 122/425 (28,8%), seguido por *Escherichia coli* 84/425 (19,8%), *Enterobacter* spp. 48/425 (11,3%), *Pseudomonas* spp. 40/425 (9,4%), *Staphylococcus* coagulase negativo 37/425 (8,7%), *Streptococcus* spp. 35/425 (8,2%), *Bacillus* spp. e *Citrobacter* spp. 11/425 (2,6%), *Alcaligenes faecalis* 6/425 (1,4%), *Micrococcus* spp. 5/425 (1,2%), *Proteus* spp. 4/425 (0,9%), *Corynebacterium* spp. 3/425 (0,7%), *Klebsiela* spp. e *Providencia* spp. 1/425 (0,2%). Registra-se que 17 amostras de leite (4,0%) não apresentaram crescimento bacteriano.

TABELA 1 - Frequência de patógenos isolados de 306 amostras de leite de fêmeas bovinas, em 12 propriedades leiteiras, durante os meses de janeiro e novembro de 2009.

Patógenos isolados	Nº de patógenos	Frequência (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	122	28,8
<i>Escherichia coli</i>	84	19,8
<i>Enterobacter</i> spp.	48	11,3
<i>Pseudomonas</i> spp.	40	9,4
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	37	8,7
<i>Streptococcus</i> spp.	35	8,2
<i>Bacillus</i> spp.	11	2,6
<i>Citrobacter</i> spp.	11	2,6
<i>Alcaligenes faecalis</i>	6	1,4
<i>Micrococcus</i> spp.	5	1,2
<i>Proteus</i> spp.	4	0,9
<i>Corynebacterium</i> spp.	3	0,7
<i>Klebsiela</i> spp.	1	0,2
<i>Providencia</i> spp.	1	0,2
Sem crescimento	17	4,0
Total	425	100,0

Visualiza-se na Tabela 1, a predominância de *Staphylococcus* spp. sobre os demais microrganismos, com 37,5% do total de microrganismos isolados, sendo 28,8% *S. aureus* e 8,7% *S. coagulase* negativo. Estes resultados encontram respaldo nos resultados obtidos por ANDRADE (1997), 43,0%, e REIS et al. (2003), 43,1%, em amostras de leite que apresentaram Califórnia Mastite Teste (CMT) positivo. No entanto, esses achados foram menores que os relatados por SANTOS (2006), o qual pesquisou a ocorrência de mastites recorrentes em rebanhos da região de Uberlândia-MG e relatou a incidência de 90,24% de *Staphylococcus* spp. Essas diferenças nas frequências dos patógenos isolados podem ser atribuídas a fatores relacionados ao manejo e ao sistema de criação.

A despeito do grande número de pesquisas sobre o controle dessa doença em vários países, a maior parte dos casos de mastite bovina é de etiologia bacteriana e o *Staphylococcus aureus* tem sido o patógeno primário mais frequentemente isolado e identificado (ANDRADE, 1997; CADEMARTORI, 2001; FONTANA, 2002; SANTOS et al. 2006), o que reforça a importância deste microrganismo nas infecções intramamárias.

Ressalta-se que *Staphylococcus aureus* foi o microrganismo mais encontrado com 28,8% dos isolamentos realizados, dados que corroboram aos resultados de MEDEIROS et al. (2009), MEDEIROS & SOUZA (2009) e SOUZA et al. (2009) os quais relataram, respectivamente, a frequência de 28,9%, 30,0% e 30,2% de *Staphylococcus aureus*. Outros resultados que também se aproximam dos aqui obtidos foram reportados por MOTA et al. (2001) e REIS et al. (2003), os quais isolaram 23,0% de *S. aureus* em amostras de leite positivas no teste do CMT. SILVA (2007) avaliando 101 amostras de leite obtidas de vacas com mastite subclínica, também isolou em maior frequência, 20,8%, o *S. coagulase* positivo.

No entanto, outros pesquisadores verificaram resultados inferiores, dentre os quais podem ser citados BEXIGA et al. (2005), que investigando o perfil bacteriano em amostras de leite em Portugal, verificaram que a presença de 7,8% eram positivas para *S. aureus*. Porém, GONÇALVES (2006) isolou mais frequentemente as bactérias Gram-positivas, e *S. aureus* foi encontrado na proporção de 34,61% e GUILLOUX et al. (2008) determinaram que 84,1% das vacas que apresentavam infecção por este agente, não apresentavam sinais

clínicos. Contudo, DONATELE et al. (2002) observaram 47,5% de *S. coagulase* positivo após o isolamento microbiológico em amostras de leite de rebanhos no Estado do Rio de Janeiro.

Assim sendo, todos estes dados demonstram concordância com o isolamento realizado nesta pesquisa, sendo o *S. aureus* o principal causador de mastite subclínica bovina também na região avaliada, o que leva a perdas significativas aos produtores, principalmente devido à redução do volume de leite produzido. Vários são os relatos que sistemas modernos de ordenha têm favorecido a penetração deste agente na glândula mamária pelo canal do teto, uma vez que esta bactéria é um ativo colonizador do canal galactóforo, de grande contagiosidade e fácil transmissibilidade. Em função disto a ordenhadeira e mão de ordenhador podem ser veículos na difusão, portanto atenção especial deve ser dada aos procedimentos de preparação das vacas na sala de ordenha para se prevenir a mastite estafilocócia.

A segunda bactéria Gram-positiva mais encontrada foi *Staphylococcus coagulase* negativo, em 8,7% (37/425) das identificações, valor inferior aos reportados por CUNHA et al. (2006), que isolaram com maior frequência este microrganismo, em 33,3% das amostras. Já REIS et al. (2003) isolaram em 20,0%, BEXIGA et al. (2005) 18,1%, SOUZA et al. (2009) 17,8%, MEDEIROS & SOUZA (2009) 15% e VIANNA et al. (2002) em 13,52% dos casos. *S. coagulase* negativo é tido por alguns autores como patógenos menores, porém algumas vezes são responsáveis por quadro de mastite severa, porém nesta pesquisa o microrganismo foi isolado em animais sem sinais clínicos.

Ainda em relação aos patógenos Gram-positivos, *Streptococcus* spp. apresentaram frequência de 8,2% (35/425) nas amostras analisadas, SILVA (2007) encontraram 9,9%, SOUZA et al. (2009) verificaram em 13,4% e MEDEIROS & SOUZA (2009) relataram a presença de 6,0% para os mesmos agentes. Estes microrganismos são importantes na epidemiologia da mastite, uma vez que pode causar tanto mastite contagiosa, como é o caso de *Streptococcus agalactiae*, quanto mastite ambiental causada pelas demais espécies de *Streptococcus*, e segundo SANTOS et al. (2007) este patógeno apresenta maior capacidade de sobreviver e multiplicar em sítios extramamários incluindo, por

exemplo, várias regiões do corpo do animal e outras fontes do ambiente de produção.

As amostras identificadas como *Corynebacterium* spp. no presente estudo apresentaram uma baixa frequência, sendo apenas três isolamentos em 306 amostras (0,7%), diferindo da prevalência encontrada por VIANNA et al. (2002) (6,15%), REIS et al. (2003) (12,8%), BEXIGA et al. (2005) (12,4%), SILVA (2007) (3,96%), MEDEIROS & SOUZA (2009) (23%) e SOUZA et al. (2009) (31,6%). Este percentual observado pode ser explicado em relação à metodologia de isolamento empregada neste estudo e à sensibilidade deste agente aos desinfetantes. Características epidemiológicas das infecções causadas por *Corynebacterium* spp. têm sido relacionadas com a ausência ou com a ineficiência do processo de desinfecção de tetas após a ordenha, destacando-se, no entanto, que este procedimento de manejo adotado em todos os rebanhos estudados.

Em relação às enterobactérias isoladas, pode-se constatar a frequência desses agentes em 35,0% das amostras coletadas, percentual superior ao detectado por SANTOS (2006) de 24,39%, em análise de ocorrência de mastites recorrentes em rebanhos da região de Uberlândia. Por outro lado, BEXIGA et al. (2005) isolaram apenas 7,9% de bactérias Gram-negativas. Essas diferenças encontradas nos resultados das frequências desses agentes, quando comparada aos trabalhos levantados, podem ser atribuídas, em parte, à metodologia de isolamento, a fatores ambientais como clima, sistema de criação, higiene do ambiente de permanência dos animais, manejo adotado e conseqüentemente o nível de exposição.

Dentre os bastonetes Gram-negativos, como pode ser visualizado na Tabela 1, a *Escherichia coli* foi detectada em 84/425 dos isolamentos (19,8%) nas amostras, resultado superior aos detectados por REIS et al. (2003), 11,6%. *E. coli* é considerada como o microrganismo predominante na etiologia da mastite ambiental e seus reservatórios são principalmente as fezes dos animais ou materiais contaminados (SANTOS & FONSECA, 2007). Portanto, presença de matéria orgânica, lama e medidas higiênicas e manejo deficientes, favorecem a proliferação e disseminação desta bactéria.

Verifica-se ainda, pela análise da Tabela 1, a frequência de 9,4% de *Pseudomonas* spp., resultados semelhantes aos apresentados por ANDRADE (1997), 10,0%, e superiores aos relatados por REIS et al. (2003), 2,9%. De acordo com SANTOS & FONSECA (2007), a mastite bovina por *Pseudomonas* spp. está intimamente relacionada à água contaminada utilizada na lavagem dos tetos, das teteiras, da canalização do equipamento de ordenha, do conteúdo reutilizável de *pre* ou *posdipping*, ou mesmo em cânulas contaminadas durante a terapia intramamária. Ainda para estes autores, a maioria dos casos se apresenta na forma hiperaguda, com manifestações clínicas graves na glândula mamária e alterações significativas no leite, no entanto neste estudo as amostras coletadas eram oriundas de animais que não apresentaram quadros de mastite clínica.

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

A presença de *Bacillus* spp. foi identificada em apenas 2,6% das amostras de leite, enquanto REIS et al. (2003) encontraram 17,2%, SILVA (2007) 5,94% e SOUZA et al. (2009) 5,8%. Os autores classificaram estas amostras como contaminadas no exame microbiológico, justificando que a frequência de isolamentos de *Bacillus* spp. não apresenta importância na cadeia epidemiológica da mastite, por ser uma bactéria encontrada no ar, e provavelmente, indicar contaminação da amostra no momento da coleta de amostras deste estudo. Isto demonstra que as amostras foram coletadas com rigor, impedindo o crescimento de contaminantes.

Do total, 17 amostras (4,0%) apresentaram-se sem crescimento durante as análises bacteriológicas, no entanto CADEMARTORI (2001), BEXIGA et al. (2005) e SANTOS (2006) descreveram que após o cultivo de amostras positivas ao CMT, em 46,2%, 23,5% e 38,80%, respectivamente não houve isolamento de nenhum microrganismo. Dentre as prováveis causas da ausência do agente etiológico nestes casos, postula-se, com base em COSTA et al. (1996) à presença de um processo inflamatório de etiologia não bacteriana. Deve-se considerar, ainda, que as diferenças nos resultados encontrados em relação aos

descritos por outros pesquisadores muitas vezes se dão em função dos protocolos utilizados para isolamentos serem distintos.

Das amostras em que houve crescimento bacteriano, em 108/306 (35,2%) ocasiões foram isolados mais de um agente, sendo observadas com maior frequência as associações bactérias Gram-positivas e enterobactérias em 30,7% e em 4,5% (14/306) infecções a presença de duas bactérias Gram-negativas.

No entanto, SANTOS (2006) descreveu que 21,95% (18/82) amostras tiveram infecções mistas, e nestes casos, a associação observada foi de *Staphylococcus* spp. e enterobactérias. E para SOUZA et al. (2009) e SHUM et al. (2009), a ocorrência de infecção mista se deu em 15,5% e 16,7% das amostras analisadas, respectivamente. Os resultados dos isolamentos desta pesquisa corroboram com os autores sendo a presença de patógenos ambientais, incluindo coliformes, constatada em cultivos com mais de um agente. E isto é influenciado em maior parte pelo manejo da exploração leiteira.

Considerando os casos de infecção com o isolamento de um único patógeno, o *Staphylococcus aureus* foi o microrganismo mais prevalente, seguido de infecção causada por *E. coli*, com índices de 20,2% (62/306) e 10,8% (33/306), respectivamente. *Streptococcus* spp. foram isolados em 6,5% amostras (20/306); *S. coagulase* negativo e *Pseudomonas* spp. foram individualmente isolados em 5,9% (18/306); e *Enterobacter* spp. foi responsável por apenas 2,6% (8/306) dos casos causados por um único agente. Tais dados reafirmam que os patógenos considerados maiores são os reais responsáveis pelos casos de infecção, com a presença de um único agente.

Para SANTOS (2006), *S. aureus* também foi destacado o microrganismo mais isolado unicamente em amostras de leite, seguido dos *S. coagulase* negativo, com índices de 32,9% e 20,7%, respectivamente. *Streptococcus* spp. foi isolado em 7,3% amostras e em nenhuma ocasião estava associado a outro microrganismo, enquanto as enterobactérias contribuíram em 2,4% das infecções. Verifica-se que, pelos resultados obtidos, tanto os agentes contagiosos transferidos de vaca a vaca, durante a ordenha, quanto os ambientais carregados do ambiente à vaca, principalmente no intervalo entre ordenhas, estão contribuindo para infecções intramamárias nos rebanhos.

Considerando como ponto de corte  $300 \times 10^3$  células/mL para classificar animais infectados de acordo com FONSECA & SANTOS (2000), apenas 47/306 (15,4%) amostras apresentaram resultados inferiores e 259/306 (84,6%) tiveram a CCS acima desse valor. Também BUENO et al. (2002) e MEDEIROS & SOUZA (2009) encontraram alta frequência de mastite subclínica em 63,6% e 95,0%, respectivamente. Os resultados deste trabalho assim como dos autores pesquisados demonstram alto percentual de animais, com a enfermidade em sua forma subclínica.

CADEMARTORI (2001) e GUILLOUX et al. (2008) observaram, respectivamente, que 32,8% e 33,5% dos animais avaliados apresentavam CCS acima desse ponto de corte estipulado em pelo menos um quarto mamário. No entanto, COENTRÃO et al. (2008) em seus estudos, estipularam a CCS maior que  $200 \times 10^3$  cél/mL para classificar animais provavelmente infectados, e encontraram 52,0% de amostras positivas. A grande variação dos valores de CCS sugere a presença de animais com infecções intramamárias, animais saudáveis, possivelmente alterados em função da ordem de parto e período de lactação, fatores estes que não foram levados em consideração neste estudo.

Para SOUZA et al. (2009) o fator que apresenta maior efeito sobre a CCS é, sem dúvida, o nível de infecção da glândula mamária no rebanho e o tipo de agente etiológico. Portanto, agruparam-se os diversos microrganismos isolados do leite das 12 propriedades estudadas de acordo com suas principais características morfotinturiais em: cocos Gram-positivos (G+), bastonetes Gram-negativos (G-) e infecções mistas onde se identificou G+ associados com G-, e relacioná-los com as CCS identificadas a partir das amostras de leite proveniente das vacas pertencentes ao estudo (Tabela 2).

A contagem média de células somáticas das 306 amostras de leite das propriedades foi de aproximadamente  $875 \times 10^3$  cél/mL, com o mínimo registrado de  $227 \times 10^3$  cél/mL em um rebanho, e o máximo de  $1.450 \times 10^3$  cél/mL em outro. COENTRÃO et al. (2008) obtiveram valores da média da CCS individual por rebanho de  $608 \times 10^3$  cél/mL. No entanto, estudos realizados por VIANNA et al. (2002), encontraram valores das médias de CCS de  $469 \times 10^3$  cél/mL de leite animais com mastite subclínica e já MEDEIROS & SOUZA (2009) identificaram a  $1.631 \times 10^3$  cél/mL.



Como pode ser observada na Tabela 2, a presença de agentes infecciosos no leite influenciou a variação na CCS com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos avaliados. O maior valor,  $1.194 \times 10^3$  cél/mL, pode ser visto naquelas amostras nas quais foram isoladas bactérias Gram-positivas, que são categorizadas, em sua maioria, no grupo de patógenos contagiosos e de maior relevância nos casos subclínicos de mastite.

TABELA 2 – Variação da contagem de células somáticas (CCS) em função dos grupos bacterianos identificados em vacas leiteiras, em 12 propriedades leiteiras de Goiás.

Grupos bacterianos isolados	CCS ( $\times 10^3$ )
	Média $\pm$ Desvio-padrão
Gram-positivas (G+)	1.194 <sup>A*</sup> $\pm$ 1.378
Gram-negativas (G-)	616 <sup>C</sup> $\pm$ 1.573
Associação ente G+ e G-	755 <sup>B</sup> $\pm$ 732

\* Médias seguidas de letras diferentes, diferem estatisticamente pelo teste de Mann – Whitney ( $p < 0,05$ ).

Os resultados apontados na Tabela 3 demonstram que houve efeito específico dos patógenos na variação da CCS, o que encontra respaldo nos dados apresentados por SOUZA et al. (2009), os quais verificaram que a maior variação na CCS dos animais não foi devido a características de rebanho, como o manejo, e sim em relação ao patógeno envolvido na infecção intramamária.

TABELA 3 - Variação dos valores médios da contagem de células somáticas ( $\times 10^3$ /mL) de acordo com os principais agentes etiológicos isolados em leite.

Grupos	Patógeno	CCS ( $\times 10^3$ )
		Média $\pm$ Desvio-padrão
Gram-positivas	<i>Staphylococcus aureus</i>	1.192 <sup>Aa*</sup> $\pm$ 1845
	<i>Streptococcus</i> spp.	1.174 <sup>Aa</sup> $\pm$ 941
	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	827 <sup>Bb</sup> $\pm$ 1.102
Gram-negativas	<i>Pseudomonas</i> spp.	498 <sup>Bc</sup> $\pm$ 594
	<i>Escherichia coli</i>	491 <sup>Bc</sup> $\pm$ 186
	<i>Enterobacter</i> spp.	311 <sup>Cc</sup> $\pm$ 555

\* Médias seguidas de letras diferentes (maiúsculas e minúsculas), diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ), respectivamente, entre os Grupos (bactérias Gram-positivas e Gram-negativas) e dentro de cada grupo.

Observa-se ainda, na Tabela 3, que entre os patógenos identificados, os responsáveis pela maior elevação da CCS foram *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* spp. com média de  $1.192 \times 10^3$  cél/mL e  $1.174 \times 10^3$  cél/mL,

respectivamente. Essa variação foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) ao ser comparado às CCS médias do leite em que se isolaram os demais microrganismos: *Staphylococcus* coagulase negativo, *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli* e *Enterobacter* spp. Estes resultados encontram-se respaldos nos dados apresentados por VIANNA et al. (2002) e MEDEIROS & SOUZA (2009), os quais relataram comportamento semelhante do *S. aureus*, onde detectaram médias das CCS de  $1.246 \times 10^3$  cél/mL e  $1.432 \times 10^3$  cél/mL, respectivamente. Por outro lado, SOUZA et al. (2009) verificaram contagens inferiores a essas, com média de  $966 \times 10^3$  cél/mL pelo *S. aureus*.

VIANNA et al. (2002) observaram que o gênero *Streptococcus* foi o segundo agente capaz de elevar mais a CCS, com média de  $1.094 \times 10^3$  cél/mL. Porém, contagens superiores foram descritas por ELIAS et al. (2005),  $1.800 \times 10^3$  cél/mL), e MEDEIROS & SOUZA (2009) que observaram a CCS média de amostras de leite oriundas de animais infectados por *Streptococcus* spp. com  $1.556 \times 10^3$  cél/mL. SOUZA et al. (2009) relataram  $894 \times 10^3$  cél/mL em animais infectados por esse patógeno. Entretanto, neste estudo não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre *S. aureus* e *Streptococcus* spp. em relação à variação da CCS, apesar de que estas bactérias influenciaram significativamente a elevação da CCS quando foram comparadas às demais bactérias isoladas.

Nesta pesquisa comprovou-se que mastites causadas por *S. aureus* e *Streptococcus* spp. resultaram em grandes variações ( $p < 0,05$ ) na CCS do leite (Figura 2), corroborando com HARMON (1994), e ao mesmo tempo, demonstrando a importância destes patógenos como causadores de mastite, sendo que estes agentes foram isolados com alta frequência nos rebanhos estudados. Além disso, HAAS et al. (2002) relataram ainda que esses agentes causam aumento na CCS mesmo sem apresentação de sinais clínicos. Isto implica numa redução do volume de leite produzido, assim como a desvalorização do produto, levando prejuízos econômicos ao produtor, à cadeia láctea em geral e problemas relacionados à saúde pública.

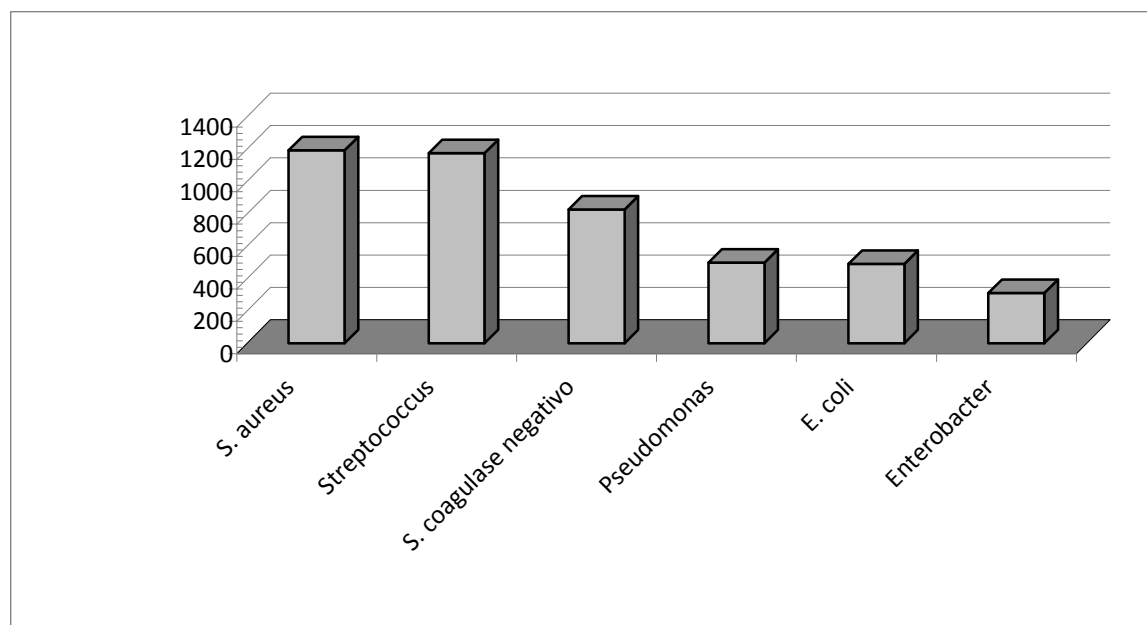


FIGURA 2 - Variação da contagem de células somáticas ( $\times 10^3$  cél/mL) de acordo com tipo de agente etiológico isolado em leite.

A CCS média encontrada para amostras positivas ao *Staphylococcus* coagulase negativo foi de  $827 \times 10^3$  cél/mL, valores superiores aos constatados por VIANNA et al. (2002) ( $372 \times 10^3$  cél/mL) e SOUZA et al. (2009) ( $422 \times 10^3$  cél/mL). HARMON (1994) considerou este microrganismo um patógeno secundário que determina um moderado processo inflamatório com relação à elevação na CCS.

Para SOUZA et al. (2009) os resultados relativos à estatística da CCS de acordo com o tipo de bactéria envolvida na infecção intramamária mostraram que os patógenos classificados como primários (*S. aureus* e *Streptococcus* spp.) e secundários (*Staphylococcus* coagulase negativo e *Corynebacterium* spp.) foram os responsáveis pelas maiores e menores variações da CCS, respectivamente.

As menores variações da CCS foram em relação ao isolamento de *E. coli* e *Enterobacter* spp., respectivamente  $491 \times 10^3$  cél/mL e  $311 \times 10^3$  cél/mL, enquanto MEDEIROS & SOUZA (2009) relataram CCS média de  $777 \times 10^3$  cél/mL para *E. coli* (quatro amostras) e  $3.596 \times 10^3$  cél/mL para *Enterobacter* spp. (seis amostras). Os mesmos autores afirmaram que tanto os agentes ambientais como os agentes contagiosos resultaram em contagens extremamente altas, comprometendo a qualidade do leite nas propriedades estudadas. Justifica-se

essa diferença de resultados pelo número de amostras que os pesquisadores avaliaram.

A Tabela 4 mostra a frequência dos escores de CCS em relação espécie bacteriana responsável pelo processo infeccioso.

Agente	Total	CCS X 10 <sup>3</sup>									
		< 300		301 a 600		601 a 900		901 a 1.200		> 1.200	
		n	%	n	%	n	%	n	%	N	%
<b><i>Streptococcus spp.</i></b>	35	1	2,9	10	28,6	4	11,4	9	25,7	11	31,4
<b><i>S. aureus</i></b>	122	17	13,9	27	22,1	29	23,8	20	16,4	29	23,8
<b><i>S. coag negativo</i></b>	37	9	24,3	14	37,8	3	8,1	2	5,4	9	24,3
<b><i>Pseudomonas spp.</i></b>	40	12	30,0	17	42,5	4	10,0	4	10,0	3	7,5
<b><i>Escherichia coli</i></b>	71	26	36,6	23	32,4	7	9,9	8	11,3	7	9,9
<b><i>Enterobacter spp.</i></b>	45	20	44,4	16	35,6	7	15,6	0	0,0	2	4,4

TABELA 4 – Frequência dos isolamentos bacterianos do leite de vacas em lactação em relação aos escores de CCS.

Visualiza-se a Tabela 4, a variação da CCS em relação à quantidade de amostras analisadas no qual os agentes etiológicos envolvidos foram bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *Streptococcus spp.*) e Gram-negativas (*E. coli*, *Enterobacter spp.* e *Pseudomonas spp.*). Os microrganismos Gram-negativos apresentaram-se com maior frequência quando os valores médios da CCS foram menores do que  $600 \times 10^3$  cél/mL. Estes resultados indicam que esses agentes não são os maiores responsáveis pela elevação da CCS do rebanho, segundo SANTOS & FONSECA (2007) as mastites causadas por coliformes e bactérias que vivem no ambiente, como água e solo, têm sido incriminadas por cursarem com alta frequência de casos clínicos, com manifestação aguda e geralmente de curta duração, diferente do que foi verificado nas amostras de leite analisadas neste estudo que eram provenientes de animais sem sinais clínicos.

#### 4. CONCLUSÕES

A caracterização fenotípica das bactérias demonstrou que o *S. aureus* foi o agente mais frequentemente isolado e que determinou maiores valores médios de CCS em mastite subclínica bovina na região estudada. Observou-se que a variação da CCS está relacionada com o tipo de bactéria envolvida na infecção intramamária sendo que as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foram responsáveis pelas maiores e menores variações da CCS, respectivamente.

## REFERÊNCIAS

1. ANDRADE, M.A. **Mastite bovina subclínica: prevalência, etiologia e frequência de patógenos isolados das mãos de ordenhadores e teteiras e testes de sensibilidade a drogas antimicrobianas.** 1997. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Goiás. Goiânia.
2. BEXIGA, R.; CAVACO, L.M.; VILELA, C.L. Mastites subclínicas bovinas na zona do Ribatejo-Oeste Subclinical bovine mastitis in the Ribatejo-Oeste área. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias.** v. 100, p. 39-44, 2005.
3. BRABES, E.P.; CARVALHO, F.L.; DIONÍSIO, M.L.; PEREIRA, F. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas de gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Rev. Napgama.** v. 3, p. 4-11, 1999.
4. BRASIL. Instrução Normativa Número 51 de 18 de setembro de 2002. Dispõe sobre regulamentos técnicos aplicados ao leite cru e pasteurizado. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, n. 83, p. 13-22, 20 set. 2002.
5. BUENO, V.F.F.; NICOLAU, E.S.; MESQUITA, A.J.; RIBEIRO, A.R.; SILVA, J.A.B.; COSTA, E.O.; NEVES, R.B.S. Mastite bovina clínica e subclínica, na região de Pirassununga, SP: frequências e redução na produção. **Ciência Animal Brasileira.** v. 3, n. 2, p. 47-52, 2002.
6. 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.** Resumo de dissertação: Arquivos da Faculdade de Veterinária. UFRGS. v. 29, n. 1, p. 69-70, 2001.
7. COENTRÃO, C.M.; SOUZA, G.M.; BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P.; LILENBAUM, W. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** v. 60, n. 2, p. 283-288, 2008.
8. COSTA, E.O.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R.; VIANI, F.C.; MASCOLI, R.; OLIVEIRA, P.J. Mastite bovina: CMT versus microbiológico. **Hora Veterinária.** n. 89, p. 53-54, 1996.
9. CUNHA, R.P.L.; MOLINA, L.R.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J.; FERREIRA, P.M.; GENTILINI, M.B. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição

- química do leite em vacas da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 60, n. 1, p. 19-24, 2008.
10. CUNHA, A.P.; SILVA, L.B.G.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; SILVA, D.R.; OLIVEIRA, A.A.F.; SILVA, K.P.C; MOTA, R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. **Arquivo do Instituto Biológico**. v. 73, n.1, p.17-21, 2006.
  11. DONATELE, D.M.; MOTTA, O.V.; FOLLY, M.M. Perfil antimicrobiano de linhagens de *Staphylococcus* spp coagulase positivo na mastite subclínica de vacas leiteiras nas regiões Norte e Noroeste do Estado do Rio de Janeiro. Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira **Napgama**. v. 5, n. 2, p. 3-6, 2002.
  12. ELIAS, A.O.; VICTORIA, C.; DA SILVA, A.V.; LANGONI, H. Características físico-químicas e contagem de células somáticas de leite proveniente de vacas naturalmente infectadas por *Streptococcus* spp. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**. v. 8, n. 2, p. 165-170, 2005.
  13. FERNANDES, M.C.; RIBEIRO, M.G.; SIQUEIRA, A.K.; SALERNO, T.; LARA, G.H.B.; LISTONI, F.J.P. Surto de mastite bovina causada por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 61, n.3, p.745-748, 2009.
  14. FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, p. 36-43. 2000.
  15. FONTANA, V.L.D.S. **Etiologia da mastite bovina subclínica da região de Jataí/GO. Padrão genética e de suscetibilidade à drogas antimicrobianas com ênfase ao gênero *Staphylococcus***. 2002. 61f. Universidade Estadual Paulista Júlia de Mesquita Filho, Araraquara.
  16. GONÇALVES, D. **Caracterização molecular de isolados de *Staphylococcus aureus* e produção de marcadores genéticos para diagnóstico de mastite em bovinos leiteiros**. 2006. 118f. Tese (Doutorado em Processos Tecnológicos) Universidade Federal do Paraná. Curitiba.
  17. 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.

18. HAAS, Y. BARKEMA, H.W.; VEERKAMP, R.F. The effect of pathogen-specific mastitis on the lactation curve for somatic cell count. **Journal of Dairy Science**. v. 85, p. 1314-1323. 2002.
19. HARMON, R.J. Symposium: mastitis and genetic evaluation for somatic cell count. **Journal of Dairy Science**. v. 77, n. 7, p. 2103-2112, 1994.
20. KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR., W.C. **Diagnóstico microbiológico**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 1488p.
21. LIPMAN, L.J.A.; NIJS, A.; LAM, J.G.M.; ROST, J.A.; DIJK, L.V.; SCHUKKEN, Y.H.; GAASTRA, W. Genotyping by PCR, of *Staphylococcus aureus* strains, isolated from mammary glands of cows. **Veterinary Microbiology**. n. 48, p.51-55, 1996.
22. 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.
23. 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.
24. MEDEIROS, M.I.M.; SOUZA, L.C. Associação de agentes patogênicos isolados em análise microbiológica da água, com a presença de mastite clínica ou subclínica, em vacas de propriedades leiteiras da região de Cerqueira César – SP. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 33, n. 2, p. 580-585, 2009.
25. MOTTA, O.V.; FOLLY, M.M.; SAKYIAMA, C.C.H. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 32, p. 27-31. 2001.
26. MONTEIRO FILHO, G. **Segredos da Estatística em Pesquisa Científica**. 1ª ed. Goiânia: Ed. Vieira. 2004. 188p.
27. NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Laboratory Handbook on Bovine Mastitis**. Revised Edition. National Mastitis Council, Inc., Madison, WI. 222p. 1999.



28. PEELER, E.J.; GREEN, M.J.; FITZPATRICK, J.L. Risk factors associated with clinical mastitis in low somatic cell count British dairy herds. **Journal of Dairy Science**. v. 83, p. 2464-2472, 2000.
29. PRESTES, D.S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam – uma revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**. v. 9, n. 1, p. 118-132. 2002.
30. RAIMUNDO, R.F.S.; POGLIANI, F.C.; CYRILLO, F.C.; NOGUEIRA, J.S.; BIRGEL JUNIOR, E.H. Avaliação do número de células somáticas do leite de bovinos da raça Jersey durante o primeiro mês de lactação. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**. v. 45, n. 6, p. 443-450, 2008.
31. REIS, S.R.; SILVA, N.; BRESCIA, M.V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 55, n. 6, p. 651-658, 2003.
32. SAMPAIO, I.B.M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. UFMG, Belo Horizonte. 1998. 221p.
33. SANTOS, C.D.M. **Staphylococcus sp. e Enterobactérias isoladas de mastite recorrente em oito rebanhos da região de Uberlândia-MG: Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos**. 2006. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal de Uberlândia.
34. 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.
35. 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. **Veterinária Notícias**. v. 12, n. 2, p. 83-88, 2006.
36. SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo: Manole, 2007. 314p.
37. SHUM, L.W.C.; MCCONNELL, C.S.; GUNNA, A.A.; HOUSEA, J.K. Environmental mastitis in intensive high-producing dairy herds in New South Wales. **Australian Veterinary Journal**. v. 87, n. 12, p. 469-475, 2009.

38. SEARS, P.M.; GONZALEZ, R.N.; WILSON, D.J.; HAN, H.R. Procedures for mastitis diagnosis and control. **Veterinary Clinics of North America, The: Large Animal Practice**. v. 9, n. 3, p. 445-467, 1993.
39. SILVA, T.F. **Correlação entre o crescimento bacteriano em placa com a contagem de células somáticas (CCS) e a contagem bacteriana total (CBT) de leite proveniente de vacas com mastite subclínica do norte e noroeste fluminense**. 2007. 83f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes.
40. SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; MOREIRA, E.C.; BRITO, M.A.V.P.; SILVA, M.V.G.B. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 61, n.5, p. 1015-1020, 2009.
41. SPANAMBERG, A.; SANCHES, E.M.C.; SANTURIO, J.M.; FERREIRO, L. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras - Revisão Bibliográfica. **Ciência Rural**. v. 39, n. 1, 2009.
42. VIANNA, L.C.; MÜLLER, E.E.; FREITAS, J.C.; PRETTO-GIORDANO, L.G.; SALVADOR, R.; DIAS, J.A. Etiologia das infecções intramamárias e contagem de células somáticas em vacas primíparas. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 23, n. 1, p. 3-8, 2002.
43. ZAFALON, L.F.; LANGONI, H.; BENVENUTTO, F.; CASTELANI, L.; BROCCOLO, C.R. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. **Veterinária e Zootecnia**. v. 15, n. 1, p.56-65, 2008.
44. ZAFALON, L.F.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J.V.; RESENDE, F.D. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custobenefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 59, p. 577-585, 2007.

## **CAPÍTULO 3 - FATORES DE RISCO E PROVÁVEIS FONTES DE INFECÇÃO PARA MASTITE**

### **RESUMO**

Objetivou-se com este trabalho identificar e quantificar fatores de risco que determinam altas contagens de células somáticas (CCS) no leite e verificar prováveis fontes de infecção através do isolamento e identificação de patógenos das mãos de ordenhadores, suabes de teteiras e em soluções de *pre* e *posdipping*. Para análise dos fatores de risco foram realizadas análises de regressão logística para testar associações entre as variáveis e o aumento da CCS, e análise descritiva de frequência para as fontes de infecção. Verificou-se que os fatores de risco que apresentaram associação significativa com a CCS acima de  $300 \times 10^3$  cél/mL foram higiene insatisfatória do ambiente e ordenhador, secagem inadequada dos tetos, e fatores relacionados ao equipamento de ordenhar, como falta de manutenção e limpeza inadequada. Conclui-se também que as mãos dos ordenhadores assim como os conjuntos de teteiras foram capazes de veicular tanto os agentes contagiosos quanto os ambientais, importantes na epidemiologia da mastite bovina.

**Palavras-chave:** contagem de células somáticas, equipamento de ordenha, patógenos, ordenhador

## RISK FACTORS AND PROBABLE INFECTION SOURCES FOR MASTITIS

### ABSTRACT

This work aimed to identify and to quantify risk factors that contribute to high somatic cell count (SCC) in milk and to verify probable infection sources by the isolation and identification of pathogens in milkers' hands, teatcups swabs and in pre and post-dipping solutions. To evaluate the risk factors, Logistic Regression analyses were carried out in order to test associations between the variable and the increase of SCC, and, for the infection sources, frequency descriptive analysis was performed. It was verified that the risk factors that presented significant association with the SCC higher than  $300 \times 10^3 \text{cel/mL}$  were unsatisfactory hygiene of the environment and of the milker, inadequate drying of the teats, and lack of maintenance and inadequate cleanness of the milking equipment. Furthermore, it is also concluded that the milkers' hands as well as the sets of teatcups may propagate both the contagious agents and the environmental ones, important factors in the bovine mastitis epidemiology.

**Keywords:** somatic cell count, milk machine, pathogens, milker.

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre as doenças que acometem o rebanho leiteiro e comprometem a qualidade do leite, a mastite ocupa lugar de destaque pela sua importância econômica e pela saúde pública. Pode ser causada por agentes ambientais ou do próprio animal, contagiosos, determinando perdas ao produtor, tanto pela redução na produção de leite das vacas quanto pelos gastos com medicamentos (REIS et al., 2003).

A mastite é uma doença multifatorial influenciada por procedimentos adotados no processo de ordenha, o nível de treinamento dos ordenhadores e o uso correto da máquina de ordenhar (FINGER, 2001). Além disso, estudos epidemiológicos sobre fatores de risco identificaram ainda características relacionadas ao animal, ao ambiente, aos procedimentos de manejo e a higiene do equipamento de ordenhar, associados à mastite bovina e à variação da contagem de células somáticas (CCS) (PELLER et al., 2000; SOUZA et al., 2005b; CUNHA et al., 2008).

PRESTES et al. (2002) relataram que a ordenha, seja mecânica ou manual, pode influenciar direta ou indiretamente na saúde da glândula mamária, pela facilidade de transmissão de patógenos entre vacas devido à inadequada preparação do úbere para a ordenha, como lavagem e secagem dos tetos. A limpeza da ordenhadeira, assim como flutuações no sistema de vácuo da ordenhadeira, podem proporcionar o movimento de leite entre as teteiras, facilitando a difusão de microrganismos e propensão à exposição do orifício e canal da teta aos patógenos, levando à perda da integridade da membrana de revestimento deste canal e modificação do ambiente intramamário, proporcionando um meio favorável à colonização e multiplicação microbiana.

Para CORRÊA & CORRÊA (1992), as mãos dos ordenhadores, quando contaminadas, também podem ser fatores de difusão de patógenos e, muitas vezes, o processo é desencadeado por ordenhas mal conduzidas e, dependendo do tipo de agente, poderão ocorrer infecções intramamárias.

Sistemas de manejo com deficiência na higiene do ambiente de permanência dos animais predispõem ao alto risco de infecções, especialmente os sistemas de confinamento mal planejados, pela disseminação de patógenos

ambientais, principalmente coliformes, no período entre as ordenhas, que são capazes de causar alta frequência de casos clínicos (COSTA, 1998).

No Brasil há poucos trabalhos sobre fatores de risco para mastite, sendo que uma pesquisa realizada por SOUZA et al. (2005b) demonstrou que a metodologia de análise dos fatores de risco para mastite permite a identificação e quantificação destes fatores para altas CCS do rebanho e para patógenos causadores da mastite.

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo verificar fatores de risco para o desenvolvimento da mastite bovina e prováveis fontes de infecção pelo isolamento e identificação de patógenos das mãos de ordenhadores, suabes de teteiras e em soluções de *pre* e *posdipping* utilizadas nas fazendas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido em doze propriedades leiteiras localizadas em um raio de 150 Km da cidade de Goiânia - Goiás, com sistema de criação realizado em piquetes e os animais levados ao estábulo no momento da ordenha. Salas de ordenha compostas de ordenhadeiras mecânicas e utilização de solução à base de cloro para a desinfecção das teteiras entre as ordenhas. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Bacteriologia, da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.

Por meio da aplicação de um questionário estruturado fechado, composto por 20 variáveis, elaborado com base em ROUQUAYROL (1999) e TRHUSFIELD (2004) foram obtidas variáveis com o objetivo de investigar os fatores de risco para mastite, monitorando os diferentes procedimentos de rotina de ordenha, funcionamento das ordenhadeiras, ambiente de permanência dos animais, hábitos higiênicos do ordenhador, diagnóstico, tratamento e controle dos casos clínicos de mastite. (Anexo 1)

Além do questionário, realizou-se, paralelamente, a colheita de amostras por meio de suabes dos insufladores das teteiras, mãos de ordenhadores, assim como de amostras de soluções de *pre* e *posdipping*.

### 2.1 Colheita das amostras e análises laboratoriais

Foram colhidas amostras, com o auxílio de suabes esterilizados, das mãos dos ordenhadores e das teteiras. Os suabes foram esfregados em toda superfície palmar, nos espaços interdigitais e regiões peri-ungueais das mãos dos ordenhadores, de cada uma das propriedades. No caso das teteiras, os suabes foram friccionados em movimentos circulares nas paredes internas das mesmas. Após a colheita, os suabes foram transferidos para tubos com tampa de rosca esterilizados, contendo cinco mL de água peptonada a 0,1% e acondicionados em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e encaminhados ao laboratório.

Foram analisadas bacteriologicamente 38 amostras oriundas das mãos dos ordenhadores, sendo 19 antes da ordenha e 19 após, e 46 amostras de teteiras, sendo 23 coletadas antes da ordenha, após o processo de sanitização do

equipamento, com solução a base de cloro, quando naquela propriedade este procedimento era adotado, e 23 amostras dos insufladores ao final da ordenha. Também foram coletadas amostras de soluções de *pre* e *posdipping* nas 12 propriedades estudadas, no início e ao final da ordenha, totalizando 48 amostras, sendo acondicionadas da mesma maneira.

Para o isolamento e identificação dos patógenos, alíquotas da água peptonada a 0,1% foram estriadas com uma alça de níquel cromo de 0,1 mL em ágar sangue contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro e no ágar MacConckey. As placas foram invertidas e incubadas a 37°C durante 48 horas. Isolados do ágar sangue foram avaliados quanto às características morfológicas e submetidas ao teste de KOH a 3% e à coloração de Gram. Unidades formadoras de colônia, identificadas como cocos Gram-positivos, foram submetidas a provas de catalase, utilização do manitol, oxidação e fermentação da glicose e coagulase em tubos, pelo método convencional de acordo com o NATIONAL MASTITIS COUNCIL (1999), com algumas modificações. Com base em SEARS et al. (1993) *Staphylococcus* coagulase positivo foram identificados como *S. aureus*.

Isolados Gram-negativos foram transferidos para o TSI, assim como as colônias provenientes do ágar MacConckey, para se avaliar o comportamento em relação aos açúcares. Após, realizaram-se testes de produção de urease, de indol, prova do vermelho metila, utilização de citrato de *Simmons* e malonato (KONEMAN et al., 2001).

A metodologia de isolamento microbiológico das amostras de soluções desinfetantes utilizadas antes e após a ordenha (*pre* e *posdipping*) constou de transferência de 1,0 mL da solução para um frasco contendo caldo Tioglicolato, e repicados 0,1 mL em ágar sangue e ágar MacConckey, conforme a técnica descrita acima. Caso não houvesse crescimento nas primeiras 24 horas, reiniciava-se o procedimento, repicando novamente 0,1 mL nos meios utilizados.



## **2.2 Análise estatística**

Para a análise estatística dos fatores de risco da mastite subclínica foram realizadas análises de Regressão Logística para testar associações entre as variáveis e a ocorrência de CCS maior que  $300 \times 10^3$  cél/mL nas amostras leite das 12 propriedades. Na análise das variáveis categóricas foi utilizado o Teste Qui-quadrado. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o Software SPSS 15.0 (MONTEIRO FILHO, 2004).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da aplicação do questionário e das observações realizadas durante as visitas nas 12 propriedades estudadas encontram-se na Tabela 1. As variáveis estudadas no modelo de regressão foram aquelas que apresentaram risco (OR) acima de 1,0.

TABELA 1 – Frequência das variáveis qualitativas relacionadas aos procedimentos de manejo, cuidados higiênicos, tratamento de mastite e métodos de diagnósticos utilizados em 12 rebanhos.

Variável	Exposição		Não exposição		p <sup>1</sup>	p <sup>2</sup>	OR
	n	%	n	%			
Higiene do ambiente insatisfatória	8	66,7	4	33,3	0,248	0,141	1,0523
Não realiza teste da Caneca	-	0,0	12	100,0	-	-	-
Não realiza <i>predipping</i>	-	0,0	12	100,0	-	-	-
Não realiza <i>posdipping</i>	-	0,0	12	100,0	-	-	-
Secagem inadequada dos tetos	8	66,7	4	33,3	0,248	0,473	1,0028
Não faz linha de ordenha	6	50,0	6	50,0	1,000	0,914	1,0002
Não faz manejo pós-ordenha	5	41,7	7	58,3	0,564	0,679	1,0007
Não utiliza periodicamente CCS	3	25,0	9	75,0	0,083	0,330	0,9973
Não realiza teste periódico de CMT <sup>1</sup>	11	91,7	1	8,3	0,004	0,264	0,9936
Higiene do ordenhador insatisfatória	2	16,7	10	83,3	0,021	0,579	1,0011
Deficiência de limpeza do equipamento	5	41,7	7	58,3	0,564	0,803	1,0024
Não faz troca de borrachas das teteiras	4	33,3	8	66,7	0,248	0,507	1,0011
Nível de vácuo incorreto	6	50,0	6	50,0	1,000	0,465	1,0013
Não realiza terapia de vaca seca	2	16,7	10	83,3	0,021	-	-
Não descarta de animais com IC <sup>2</sup>	9	75,0	3	25,0	0,083	0,242	0,9978
Não realiza tratamento adequado CC <sup>3</sup>	1	8,3	11	91,7	0,004	0,308	0,9923

<sup>1</sup> CMT: Califórnia Mastite Teste; <sup>2</sup> IC: infecções crônicas; <sup>3</sup> CC: casos clínicos de mastite. Teste: Regressão Logística. OR = *odds ratio* (estimador do risco relativo); p<sup>1</sup> = nível de significância da variável dos modelos finais de regressão; p<sup>2</sup> = nível de significância para variáveis utilizadas nos modelos de acordo com as situações estudadas.

Verifica-se na Tabela 1, que em oito propriedades (66,7%), a higiene do ambiente foi considerada insatisfatória, com alta carga de matéria orgânica no local de permanência das vacas. A presença de lama e esterco foi observada na maioria das explorações leiteiras estudadas e contribuiu em 5,23% para o aumento de CCS superior a 300 x 10<sup>3</sup> cél/mL (OR de 1,0523). Este fator também

foi apontado por BRITO et al. (2002), onde constataram que o ambiente pode se tornar uma fonte de infecção de mastite durante o período entre as ordenhas, por isso torna-se necessário que o ambiente sejam bem manejado.

Dentro dos parâmetros avaliados em relação à rotina de ordenha, observou-se que os procedimentos de preparação das vacas na sala de ordenha, foram utilizados em 100% das propriedades visitadas, porém estes muitas vezes não foram finalizados de forma apropriada. Observou-se que em oito (66,7%) rebanhos a secagem dos tetos não era realizada adequadamente, o que contribuiu em 0,28% (Tabela 1) para a ocorrência da enfermidade ( $CCS > 300 \times 10^3$  cél/mL), podendo ser incriminado com um fator de risco para o desenvolvimento da doença. Segundo SOUZA et al. (2005a), tais procedimentos são fundamentais no controle e na prevenção da mastite e merecem treinamento específico.

Observou-se que o teste da "caneca telada" é uma prática adotada por todas as fazendas acompanhadas, o exame que consiste na retirada dos primeiros jatos de leite deve ser realizado imediatamente antes de todas as ordenhas, com a finalidade de observar alterações no leite que possam diagnosticar a mastite clínica, além de trazer o benefício do estímulo para a ejeção do leite (SANTOS & FONSECA, 2007; MENDONÇA, 2009).

Após a ordenha, verificou-se que em 100% das propriedades faz-se o uso de *posdipping*, resultado semelhante ao observado por BEXIGA et al. (2005), 91,7%, demonstrando que essa prática é amplamente conhecida entre os produtores de leite e de acordo com SENAR (2008) é fundamental para a prevenção e controle da mastite contagiosa nos rebanhos. Verificou-se que em 58,3% das propriedades eram oferecidos alimentos às vacas na saída da sala de ordenha, realizando o manejo pós-ordenha adequadamente, e este procedimento foi apontado por GRECELLÉ (2008), segundo o qual, com esse método é possível manter as vacas em posição quadrupedal até que o esfíncter do teto se feche, e desta maneira poderá diminuir a penetração de microrganismos no canal do teto logo após a ordenha, reduzindo o risco de novas infecções.

Durante as visitas realizadas, percebeu-se que apenas em seis propriedades (50%) realizava-se "linha de ordenha" e de acordo com FONSECA & SANTOS (2000) é importante que este procedimento seja estabelecido,

recomendando-se que animais sejam ordenhados em lotes de acordo com o estado sanitário. BEXIGA et al. (2005) reportaram que em 58,3%, das explorações leiteiras analisadas, as vacas com mastite clínica eram ordenhadas sem segregação especial, em 33,3% no fim da ordenha e noutra sala de ordenha somente em 8,3% das propriedades.

Constatou-se que a manutenção dos equipamentos de ordenha não estava sendo realizada de forma correta, sendo que 33,3% dos produtores avaliados não efetuavam a troca dos insufladores de acordo com a recomendação do fabricante, o que constituiu em um provável fator de risco. Neste estudo contribuiu em 0,11% para o aumento da CCS, destacando-se que apenas 50% das propriedades estavam com o equipamento de ordenha funcionando com a vazão de vácuo adequada para o tipo de ordenha, demonstrando a falta de assistência de técnicos especializados para sua manutenção. Esta manutenção inadequada colaborou em 0,13% para a elevação da CCS. SOUZA et al. (2005a) observaram que em 79 rebanhos leiteiros ordenhados mecanicamente, 28 (35,4%) não realizavam ou realizavam de forma esporádica a manutenção do equipamento. Concordando com tais observações e os resultados aqui constatados, CAVAZOS (2003), relacionou o funcionamento inadequado do equipamento de ordenha, não treinamento e motivação dos ordenhadores à ocorrência de novas infecções e aumento da CCS do leite.

Tanto a troca periódica dos componentes de borracha e teteiras das ordenhadeiras quanto a utilização e manutenção do equipamento de ordenha foram identificados por SOUZA et al. (2005a) como pontos importantes no controle e na prevenção de mastite. As teteiras, em particular, constituem-se em importante fômite, podendo funcionar como um elemento de transferência de bactérias de uma vaca infectada para uma sadia. O surgimento de fissuras nas partes de borracha do equipamento de ordenha facilita o acúmulo de leite e dificulta a aderência no teto, permitindo a entrada de ar no sistema e a queda do conjunto de teteiras, favorecendo a entrada de patógenos para dentro da glândula mamária.

Apesar da limpeza adequada dos equipamentos de ordenha estar associada diretamente à prevenção de novas infecções, apenas 58,3% dos

produtores incluídos no estudo realizavam os procedimentos corretamente, podendo ser assinalado como um fator de risco importante na disseminação dos patógenos, contribuindo em 0,24%.

A escolha de animais que receberão terapia de vaca seca e a secagem inadequada dos tetos após o *predipping* foram alguns procedimentos incorretos identificados, confirmando os relatos de SOUZA et al. (2005b). COENTRÃO et al. (2008) identificaram fatores de risco relacionados ao animal, ao manejo e ao equipamento de ordenha como estado inadequado das teteiras e deficiência na limpeza dos pulsadores, sendo que nesse caso os animais apresentaram 1,41 vezes mais chance de apresentar CCS acima de  $200 \times 10^3$  cél/mL.

Confirmando os resultados encontrados neste estudo, SOUZA et al. (2005b) relataram a não realização de anti-sepsia dos tetos antes e após a ordenha, a não adoção de linha de ordenha e a não higienização do equipamento de ordenha como fatores de risco para mastite.

O tratamento imediato dos casos clínicos de mastite foi realizado em 91,7% das propriedades analisadas. A adoção dos demais procedimentos relacionados ao controle variou de 83,3% para o tratamento à secagem, sendo fundamental para a cura de infecções subclínicas e a prevenção de novas infecções no período seco (BOTARO & SANTOS, 2008) a apenas 25,0% na segregação e descarte dos animais cronicamente infectados. Alguns destes resultados corroboram com os relatos de SOUZA et al. (2005a), que verificaram que em todos os rebanhos estudados o tratamento dos casos clínicos era adotado, e em 27,8% realizavam a terapia de vaca seca e 65,1% na segregação de animais com mastite clínica.

A não realização de exames de CMT das vacas, assim como o descarte de animais cronicamente infectados, não foram identificados como fatores de risco no presente estudo, talvez pelo reduzido número de amostras estudadas, porém, são considerados fundamentais para o controle e a prevenção da enfermidade nos rebanhos leiteiros.

Os valores de OR encontrados neste estudo foram relativamente baixos, (OR próximo de 1,0), quando comparado aos verificados por SOUZA et al. (2005b) e COENTRÃO et al. (2008). Estes resultados podem ser em decorrência da população estudada, que é assistida pelo PDPL, contando com a presença

periódica de um médico veterinário e acadêmicos dos cursos de graduação de agronomia, veterinária e zootecnia.

Em relação às análises microbiológicas das prováveis fontes de infecção, como suabes de mãos dos ordenhadores, os resultados do isolamento encontram-se na Figura 1. Dentre os patógenos contagiosos identificados destacaram-se *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus* coagulase negativo e os patógenos ambientais foram *Enterobacter* spp.; *Pseudomonas* spp.; *Escherichia coli* e *Citrobacter* spp.

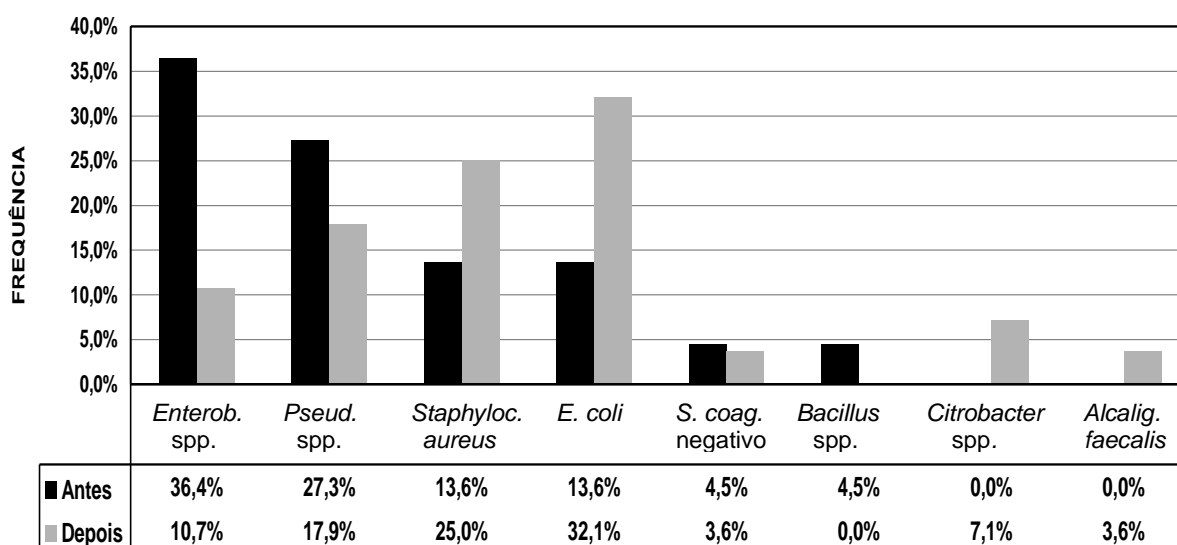


FIGURA 1 - Frequência de bactérias isoladas de mãos de 19 ordenhadores, antes e após a ordenha, em 12 propriedades leiteiras.

*Pseudomonas* spp. foram isoladas e identificadas nas mãos de seis ordenhadores, correspondendo a 27,3% (6/22) das bactérias isoladas antes da ordenha, e cinco, representando 17,9% (5/22) dos microrganismos nas mãos ao final da ordenha. Tal observação provavelmente se deu em função de que a maioria dos ordenhadores não possui o hábito de lavagem das mãos antes de iniciar e mesmo durante a ordenha.

Dentre os agentes contagiosos, destacou-se o grupo *Staphylococcus*, sendo também o grupo mais frequentemente isolado na mastite bovina. Constatou-se, neste trabalho, que 13,6% dos ordenhadores apresentaram *S. aureus* nas mãos antes da ordenha e ao final foram 25,0%, confirmando a frequência encontrada por ANDRADE (1997), 12,0% e 20,0%, antes e após a ordenha, respectivamente. O aumento da frequência do isolamento durante a

ordenha assinala a possibilidade do ordenhador ter manuseado material contaminado com a bactéria, como o teto, a pele e o próprio leite. Caso o leite seja oriundo de glândulas infectadas, as mãos contaminadas podem carrear os patógenos de uma vaca infectada para outra sadia no momento em que o ordenhador estiver fazendo a preparação da vaca antes da colocação das teteiras (McDONALD, 1984).

DIAS (2007) indicou que seja feita antes da ordenha a lavagem completa das mãos dos ordenhadores com água e sabão, seguida preferencialmente pela desinfecção em solução desinfetante à base de cloro, iodo ou clorexidina com o objetivo de diminuir o número de patógenos que possam ser transmitidos aos animais. De acordo com DINGWELL et al. (2004), a higiene do ordenhador é um ponto crucial na profilaxia da mastite, pois as mãos podem ser veiculadores de bactérias para o úbere, o leite e todo o material utilizado na ordenha. Destaca-se que durante as análises dos fatores de risco, verificou-se que a higiene do ordenhador, quando insatisfatória contribuiu significativamente para o aumento da CCS.

Segundo SILVEIRA FILHO (2007) as vias mais importantes para transmissão de *S. aureus* são mãos de ordenhadores, além dos equipamentos de ordenha e outros fômites, enquanto COSTA (1998) ressalta para os animais portadores assintomáticos, atuando como importantes reservatórios deste patógeno.

Foi identificada a presença nas mãos antes da ordenha das enterobactérias: *Enterobacter* spp. e *Escherichia coli*, com frequência de 36,4%, 13,6%, respectivamente. Estas bactérias são apontadas como importantes agentes das mastites ambientais (PRESTES et al., 2002), e são constituintes da microbiota intestinal tanto do homem como dos animais. Constatou-se a frequência desses microrganismos em 10,7% (3/28) e 32,1% (9/28) das mãos analisadas após a ordenha. O aumento da frequência de *E. coli* pode ser atribuído ao manuseio direto dos animais, como o toque na cauda, contato com úbere sujo e fezes na sala de ordenha.

Quando se analisou a carga microbiana das teteiras das ordenhadeiras notou-se que estas são incriminadas como fonte de infecção e veículos de agentes infecciosos. *Escherichia coli* e *Pseudomonas* spp. foram isoladas em

16,7% enquanto *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase negativo e *Staphylococcus aureus* tiveram frequência de 11,1% cada e *Enterobacter* spp., 5,6% (Figura 2).

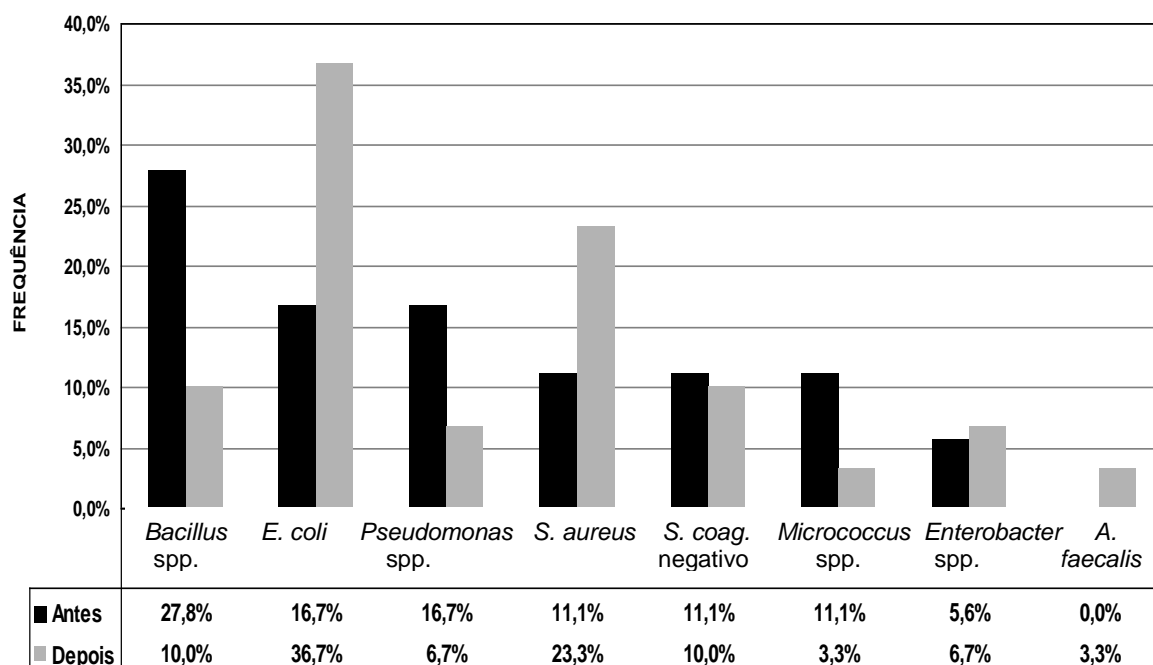


FIGURA 2 - Frequência de bactérias isoladas de 46 suabes de teteiras, sendo 23 coletados antes e 23 ao final da ordenha, em 12 propriedades leiteiras.

Registra-se na Figura 2, a presença de patógenos contagiosos e ambientais antes da ordenha, mesmo após o processo de sanitização com solução a base de cloro, corroborando com relatos de AMARAL et al. (2004), que observaram que a desinfecção das teteiras com soluções a base de cloro não foram eficientes como método preventivo de eliminação ou redução de agentes infecciosos. Assim, GUTHY (1982) relatou que as teteiras constituem potenciais veículos de microrganismos para o úbere e para o leite. Outro aspecto a ser considerado são as borrachas velhas de teteiras, onde os agentes patogênicos podem aderir-se e multiplicar-se facilmente e disto resultar na transferência de microrganismos patogênicos de vaca a vaca, durante a ordenha, contribuindo para o aparecimento de infecções intramamárias.

A influência da ordenhadeira mecânica sobre a saúde do úbere é destacada como principal risco durante o uso para a transmissão de patógenos ao longo da ordenha de um animal a outro e quando não são realizadas a limpeza



e manutenção adequadamente, são considerados fatores de risco para mastite. Para PRESTES et al. (2002) as teteiras podem servir de fonte de contaminação e transmitir bactérias contagiosas entre as vacas e flutuações no vácuo dentro da teteira podem resultar em movimento contrário do leite, fazendo com que este possa voltar para o ducto da teta e desta maneira implantar bactérias patogênicas

Diante disso, os equipamentos de ordenha podem atuar como reservatórios ou fômites de microrganismos e, ainda em casos de utilização inadequada, provocar lesões nos tetos dos animais, que podem resultar em redução das barreiras à penetração dos agentes, tornando os mesmos mais suscetíveis às infecções.

*Escherichia coli* foi o microrganismo patogênico mais isolado nas amostras de suabes de teteiras seguido por *S. aureus* (Figura 2), demonstrando a presença destes agentes dentro dos rebanhos e confirmando que as teteiras podem servir de veículo de transmissão. De acordo com CUNHA et al. (2006), esta espécie é a mais isolada em infecções intramamárias de vacas leiteiras em todo o mundo.

A presença de *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp. e *Staphylococcus* spp. nas teteiras antes da ordenha sugere que os equipamentos não estavam sendo adequadamente higienizados, portanto podem ser considerados reservatórios destes microrganismos. O aumento de três deles, *E. coli*, *Enterobacter* spp. e *Staphylococcus* spp. durante o processo de ordenha apontam para a possibilidade de falta de cuidados higiênicos sanitários dos operários, secagem inadequada dos tetos ou mesmo desconhecimento do risco potencial de carrear tais patógenos.

Ainda, nas mesmas propriedades coletaram-se amostras das soluções utilizadas na desinfecção dos tetos antes e após o término da ordenha, as quais foram analisadas bacteriologicamente, e os resultados obtidos expressos na Figura 3.

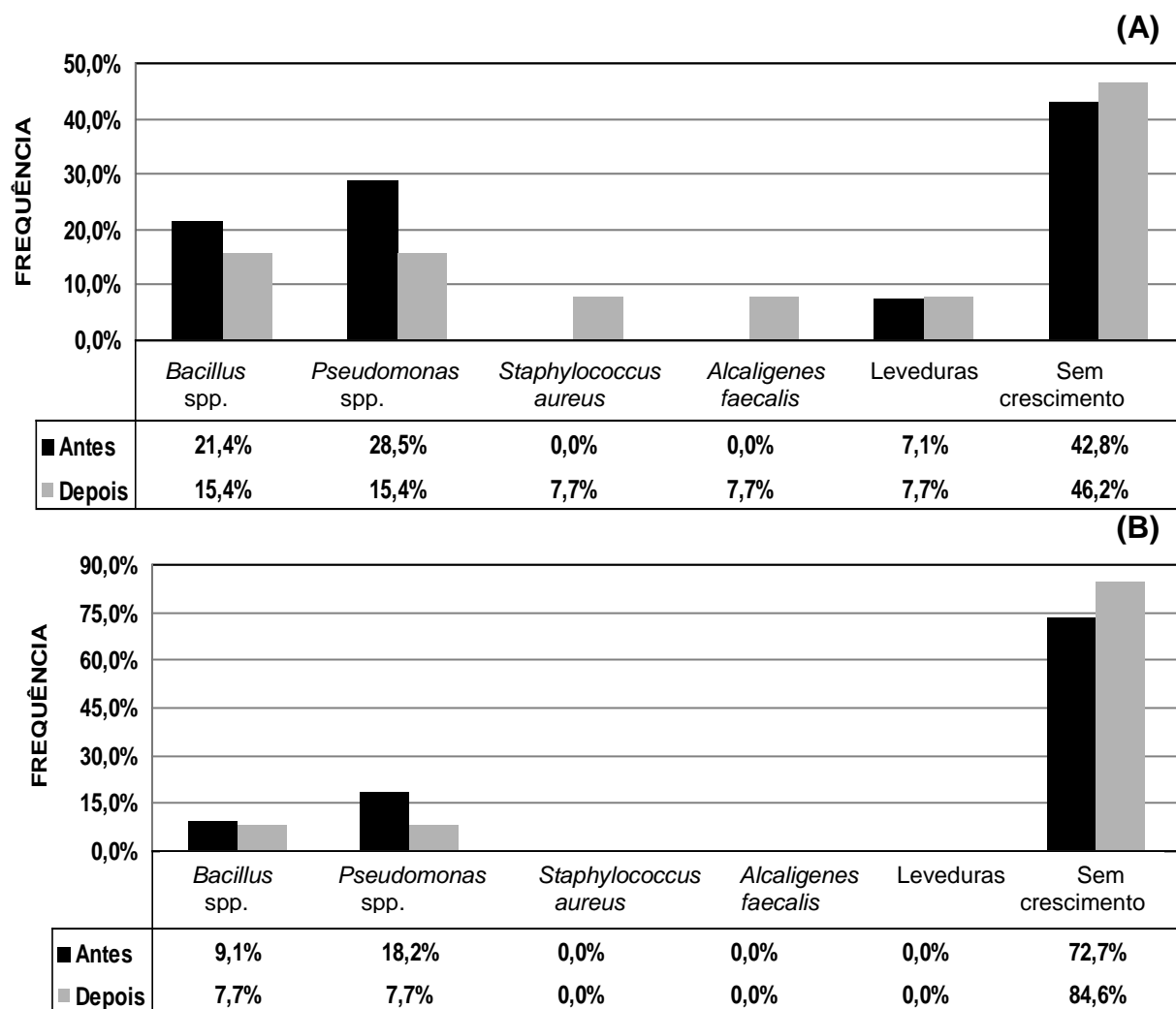


FIGURA 3 - Frequência de bactérias isoladas de 24 soluções de *predipping* (A) e *posdipping* (B), sendo 12 colheitas no início da ordenha e 12 ao final da ordenha, em 12 propriedades leiteiras.

Como pode ser observado na Figura 3, as amostras das soluções de *pre* e *posdipping* utilizadas tiveram a presença de microrganismos principalmente de origem ambiental, sendo que a ausência de crescimento bacteriano foi registrada na maioria das amostras coletadas.

Identificou-se nas soluções de anti-sepsia antes e após a ordenha, uma baixa frequência de isolamentos, exceto por *Pseudomonas* spp. Esta bactéria teve maior importância epidemiológica, sendo isolada em 28,5% e 18,2%, ao início e final da ordenha, respectivamente (Figura 3). Este achado pode ser justificado, em parte, porque foram utilizados, em todas as propriedades,

recipientes sem retorno, observando-se, ainda, que os produtos desinfetantes foram colocados nestes recipientes logo no início da ordenha, e as condições de limpeza destes encontravam-se aparentemente satisfatórias.

A presença dessa bactéria no *predipping* e *posdipping* também foi reportada por FERNANDES et al. (2009), além disso, os autores isolaram *P. aeruginosa* no cultivo de amostras de água de lavagem das teteiras e da canalização do equipamento de ordenha da propriedade. SANTOS & FONSECA (2007) relataram que a água utilizada no ambiente de ordenha dos animais é uma das principais vias de transmissão do agente para a glândula mamária, entretanto nesta pesquisa a análise bacteriológica da água não foi realizada.

Esses dados estão em consonância com afirmação de AMARAL et al. (2004), os quais relataram que os métodos de desinfecção dos tetos proporcionaram redução no número de microrganismos, mostrando-se como ferramenta simples capaz de minimizar o risco de transmissão de patógenos durante a ordenha e aumentar a qualidade microbiológica do leite produzido.

#### **4. CONCLUSÕES**

A higiene insatisfatória do ambiente e ordenhador, secagem inadequada dos tetos, manutenção e limpeza inadequadas do equipamento foram identificados como fatores de risco.

As mãos dos ordenhadores assim como os conjuntos de teteiras foram capazes de veicular tanto os agentes contagiosos quanto os ambientais, durante o procedimento de ordenha.

## REFERÊNCIAS

1. AMARAL, L.A; ISA, H.; DIAS, L.T.; ROSSI JR., O.D.; NADER FILHO, A. Avaliação da eficiência da desinfecção de teteiras e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 24, n. 4, p. 173-177. 2004.
2. ANDRADE, M.A. **Mastite bovina subclínica: prevalência, etiologia e frequência de patógenos isolados das mãos de ordenhadores e teteiras e testes de sensibilidade a drogas antimicrobianas**. 1997. 113f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Goiás. Goiânia.
3. BEXIGA, R.; CAVACO, L.M.; VILELA, C.L. Mastites subclínicas bovinas na zona do Ribatejo-Oeste Subclinical bovine mastitis in the Ribatejo-Oeste área. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 100, p. 39-44, 2005.
4. BOTARO, B.; SANTOS, M.V. **Os outros benefícios da terapia da vaca seca**. 2008. [On line]. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/?noticiaID=46456&actA=7&areaID=61&secaoID=180>. [Data de acesso: 15 de dezembro de 2009].
5. BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P.; ARCURI, E.F. **Como (re)conhecer e controlar a mastite em rebanhos bovinos**. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, 2002. 8p. (Embrapa Gado Leite. Circular Técnica, 70).
6. CAVAZOS, F. Useful ideas and principles for the implementation of reinforcement programs to keep milkers motivated. *In*: Annual Meeting of National Mastitis Council, 42., 2003, Fort Worth. **Proceedings...** Madison: NMC, 203. p. 77-85.
7. COENTRÃO, C.M.; SOUZA, G.M.; BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P.; LILENBAUM, W. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 60, n.2, p.283-288, 2008.
8. CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992, 843p.
9. COSTA, E.O. Importância da mastite na produção leiteira do Brasil. **Revista de Educação Continuada do CMRV-SP**. São Paulo, v. 1, p.3-9, 1998.

10. CUNHA, A.P.; SILVA, L.B.G.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; SILVA, D.R.; OLIVEIRA, A.A.F.; SILVA, K.P.C; MOTA, R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. **Arquivo do Instituto Biológico**. v. 73, n.1, p.17-21, 2006.
11. CUNHA, R.P.L.; MOLINA, L.R.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J.; FERREIRA, P.M.; GENTILINI, M.B. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 60, n. 1, p. 19-24, 2008.
12. DIAS, R.V.C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. **Acta Veterinária Brasília**. v.1, n.1, p.23-27, 2007.
13. DINGWELL, R.T.; LESLIE, K.E.; SCHUKKEN, Y.H.; SARGEANT, J.M.; TIMMS, L.L.; DUFFIELD, T.F.; KEEFE, G.P.; KELTON, D.F.; LISSEMORE, K.D.; CONKLIN, J. Association of cow and quarter-level factors at drying-off with new intramammary infections during the dry period. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 63, p. 75-89, 2004.
14. FERNANDES, M.C.; RIBEIRO, M.G.; SIQUEIRA, A.K.; SALERNO, T.; LARA, G.H.B.; LISTONI, F.J.P. Surto de mastite bovina causada por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.61, n.3, p.745-748, 2009.
15. FINGER, R.M. **Fatores de riscos da higiene de vacas com elevado número de bactérias mesofílicas aeróbias no leite**. 2001. 87f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.
16. FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, p. 36-43. 2000.
17. GRECELLÉ, C.B.Z. **Manejo da ordenha para melhoria da qualidade do leite**. 2008. [On line]. Disponível em: <<http://www.fefa-ro.com.br/noticia081125-1.php>> [Data de acesso: 28 de dezembro de 2009].
18. GUTHY, K. A influência da técnica e do trabalho de ordenha sobre a saúde do úbere do conteúdo de células somáticas do leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 37, n. 223, p. 37-43, 1982.

19. KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR., W.C. **Diagnóstico microbiológico**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 1488p.
20. McDONALD, J.S. Streptococcal and Staphylococcal mastitis. **Veterinary Clinics of North America, The: Large Animal Practice**. v. 6, n. 2, p. 269-285, 1984.
21. MENDONÇA, L.C. **A importância do ordenhador para a produção de leite de qualidade**. 2009. [On line]. **Panorama do leite on line**. Ano 3, n. 31, junho de 2009. Disponível em: <<http://www.cileite.com.br/panorama/qualidade31.html>>. [Data de acesso: 01 de dezembro de 2009].
22. MONTEIRO FILHO, G. **Segredos da Estatística em Pesquisa Científica**. 1ª ed. Goiânia: Ed. Vieira. 2004. 188p.
23. NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Laboratory Handbook on Bovine Mastitis**. Revised Edition. National Mastitis Council, Inc., Madison, WI. 222p. 1999.
24. PEELER, E.J.; GREEN, M.J.; FITZPATRICK, J.L. Risk factors associated with clinical mastitis in low somatic cell count British dairy herds. **Journal of Dairy Science**. v. 83, p. 2464-2472, 2000.
25. PRESTES, D.S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam – uma revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**. v. 9, n. 1, p. 118-132. 2002.
26. REIS, S.R.; SILVA, N.; BRESCIA, M.V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 55, n. 6, p. 651-658, 2003.
27. ROUQUAYROL, M.Z. **Epidemiologia e saúde**. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1999. 570p.
28. SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo: Manole, 2007. 314p.
29. SEARS, P.M.; GONZALEZ, R.N.; WILSON, D.J.; HAN, H.R. Procedures for mastitis diagnosis and control. **Veterinary Clinics of North America, The: Large Animal Practice**. v. 9, n. 3, p. 445-467, 1993.

30. SENAR – SERVIÇO NACIONAL DE APRENDIZAGEM RURAL. Programa pecuária leiteira “Proleite”. **Manejo de ordenha e qualidade do leite**. São Paulo, 2008. 38 p.
31. SILVEIRA FILHO, V.M. **Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina no Estado de Pernambuco**. 2007. 82 f. Dissertação (Mestrado em Genética). Universidade Federal de Pernambuco. Recife.
32. SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; MOREIRA, E.C. Fontes de variação para a contagem de células somáticas em vacas leiteiras. *In*: CARVALHO, L.A.; ZOCCAL, R.; MARTINS, P.C. **Tecnologia e gestão na atividade leiteira**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, p. 121-135, 2005a.
33. SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; MOREIRA, E.C.; BRITO, M.A.V.P.; BASTOS, R.R. Fatores de risco para alta contagem de células somáticas do leite do tanque em rebanhos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 57, n. 2, p. 251-260, 2005b.
34. TRHUSFIELD, M.V. **Epidemiologia veterinária**. São Paulo: Roca, 2004. 556p.



## ANEXO

Questionário			
Produtor:	Município:		
Produção diária (litros):	Propriedade:		
Número de vacas em lactação:	Média de litros/vaca:		
CCS tanque:	Tipo de ordenha:		
CBT tanque:	Composição racial do rebanho:		
Variáveis avaliadas	Escore de higiene		Observações:
Conforto e higiene do ambiente de permanência dos animais			
Rotina de ordenha	Sim	Não	
Realiza teste da caneca de fundo preto			Frequência:
Realiza predipping			
Secagem adequada dos tetos			
Ajusta o equipamento corretamente			
Realiza posdipping			
Faz linha de ordenha			
Manejo de vacas pós-ordenha correto			Oferece comida ao sair da sala de ordenha?:
Faz avaliação periódica da CCS individual das vacas			
Realiza teste periódico de CMT			
Higiene do ordenhador satisfatória			
Higiene e limpeza do equipamento	Sim	Não	
Limpeza adequada do equipamento de ordenha			Descrição do processo de higienização:
Utiliza sanitizante antes das ordenhas			Qual:
Manutenção e funcionamento do equipamento	Sim	Não	
Realiza troca periódica dos insulfladores			Qual frequência:
Nível de Vácuo adequado ao tipo de ordenha (1)			
Conta com assistência técnica			
Tratamentos	Sim	Não	
Realiza terapia de vaca seca			Qual medicação:
Segregação e descarte de animais cronicamente infectados			
Tratamento imediato de casos clínicos de mastite			Qual medicação e frequência:
	<b>Sim</b>	<b>Não</b>	
<b>Produtor consciente dos problemas existentes</b>			

(1)- **Linha Baixa:** 42-46 kPa    **Linha Média e Balde ao Pé:** 44-46 kPa    **Linha Alta:**47-51 kPa

## CAPÍTULO 4 - PERFIL DE SENSIBILIDADE *IN VITRO* DOS AGENTES ISOLADOS DE MASTITE SUBCLÍNICA AOS ANTIMICROBIANOS E AO EXTRATO ETANÓLICO DAS FLORES DE *Calendula officinalis*

### RESUMO

A mastite, doença de maior prevalência nos rebanhos leiteiros, é capaz de comprometer a qualidade do leite, impactar a saúde pública e causar sérios prejuízos econômicos. O tratamento e controle muitas vezes baseiam-se em protocolos terapêuticos com o uso indiscriminado de antibióticos encontrados no comércio. Objetivou-se neste estudo avaliar o comportamento de diferentes agentes isolados da mastite bovina em sua forma subclínica frente às principais drogas antimicrobianas e determinação do efeito bactericida do extrato etanólico das flores de calêndula. Verificou-se o espectro de sensibilidade, através do método de imunodifusão em ágar e o efeito do fitoterápico foi avaliado através da concentração inibitória mínima. Constatou-se que bactérias Gram-positivas apresentaram maior sensibilidade aos princípios antimicrobianos do que bactérias Gram-negativas, e também a eficácia *in vitro* do extrato de calêndula sobre *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica.

**Palavras-chave:** antibiograma, concentração inibitória mínima, fitoterápicos, mastite

**PROFILE OF *IN VITRO* SUSCEPTIBILITY OF ISOLATED AGENTS OF SUBCLINICAL MASTITIS TO ANTIMICROBIAL AGENTS AND TO ETHANOLIC EXTRACT OF *Calendula officinalis* FLOWERS**

**ABSTRACT**

Mastitis, the highest prevalence disease in milk cattle, compromises the milk quality, impacts the public health and causes serious economic loss. Treatment and control are usually based on therapeutic protocols with the indiscriminate use of antibiotics available in the market. This study aimed to evaluate the behavior of different isolated agents of the bovine subclinical mastitis opposite to the main antimicrobial drugs and to establish the bactericidal effect of the ethanolic extract of *Calendula officinalis* flowers. The sensitivity specter was verified by the imunodiffusion in agar method, and the effect of phytoterapics was evaluated by the minimum inhibitory concentrations. Gram-positive bacterias presented greater sensitivity to the antimicrobial principles than Gram-negative bacterias, and the *in vitro* effectiveness of the *Calendula officinalis* extract on isolated *Staphylococcus aureus* of milk samples of cows with subclinical mastitis was verified.

**Keywords:** tests of drug sensitivity, minimum inhibitory concentrations, milk, phytoterapics, mastitis

## 1. INTRODUÇÃO

Considerada uma doença multifatorial de grande importância para a pecuária de leite, a mastite acarreta sérios prejuízos econômicos decorrentes da diminuição da secreção láctea, além de representar um sério problema do ponto de vista clínico e de saúde pública (REIS et al., 2003; TOZZETTI et al. 2008). As dificuldades para controle dos patógenos, na mastite subclínica, ocorrem em razão da grande quantidade de animais infectados no rebanho, diversidade de reservatórios e resistência dos agentes aos antibióticos e quimioterápicos utilizados nos tratamentos (SANTOS & FONSECA, 2007).

Apesar da disponibilidade de vários antimicrobianos para tratamento da mastite, o problema de resistência dos microrganismos a estes se acentuou pelo uso indiscriminado e inadequado, particularmente no Brasil (COSTA, 1999). De acordo com MOTA et al. (2005) há evidências que o tratamento indiscriminado de animais com antibióticos tornem seus produtos e derivados, fonte para resistência aos antibióticos também na espécie humana.

Os antibióticos pertencem ao grupo das substâncias residuais de maior influência na qualidade do leite. Eles são os contaminantes mais estudados em todo o mundo e os responsáveis pelas maiores regulamentações internacionais. Os danos que os antibióticos produzem na saúde humana são divididos em três aspectos: efeitos tóxicos diretos, indução de alergias e desenvolvimento de resistência. A maior incidência na resistência a antibióticos de microrganismos isolados de animais de produção reflete o uso indiscriminado (MOTA et al., 2005).

Em decorrência da diversidade de agentes etiológicos envolvidos em mastites, a utilização de exames microbiológicos e posteriormente testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* são medidas indicadas antes da eleição do tratamento, pois esta diversidade microbiológica pode ter diferentes respostas frente ao medicamento a ser utilizado (SILVA et al., 2008). Podendo assim, contribuir para um melhor controle, devido à utilização de terapêutica adequada, e conseqüentemente promover um decréscimo na resistência aos antibióticos (SANTOS & FONSECA, 2007).

O novo paradigma para a produção agropecuária, trazido pela agroecologia, busca a integração entre os conhecimentos tradicionais e

modernos, através da investigação de propriedades terapêuticas de princípios e medicamentos fitoterápicos, que ganham cada vez mais espaço em medicina veterinária. Profissionais adeptos da fitoterapia revelam alta frequência de sucessos em tratamento de parasitoses e enfermidades infecciosas, inclusive para o controle de mastites (LOGUERCIO et al., 2005; LOGUERCIO et al., 2006; PEREIRA et al., 2009a, SCHUCH, 2007).

A *Calendula officinalis* L. é uma herbácea anual, espécie exótica adaptada no Brasil, originária da região Mediterrânea, pertencente à família *Asteraceae* e conhecida popularmente como calêndula. Apresenta flores alaranjadas ou amareladas, às quais são atribuídas propriedades medicinais, e dentre elas, destaca-se a atividade cicatrizante, antiespasmódica, colerética, sudorífica, emética, hipotensora, antiinflamatória, antibiótica e anti-séptica, entre outras atividades (ALONSO, 1998; WHO, 2002).

O uso do extrato das flores de *Calendula officinalis* pode ser uma alternativa para o controle das infecções subclínicas. A recomendação de seu uso deve-se a muitas de suas propriedades medicinais como: antiinflamatória, bactericida, anti-séptica, cicatrizante, entre outras (FRANCO, 1996; BROWN & DATNER, 1998), além da comprovada inibição do crescimento *in vitro* de *S. aureus* (WHO, 2002; PARENTE et al., 2009).

Tendo em vista os problemas enfrentados em decorrência da mastite, em função do uso indiscriminado dos produtos químicos, resíduos no leite e a resistência bacteriana, torna-se necessário a busca de novas alternativas de tratamento e também a determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos mais comercializados na Mesorregião do Centro Goiano. Para tanto, objetiva-se neste trabalho avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana do extrato etanólico das flores da calêndula e também o perfil de suscetibilidade frente diferentes antimicrobianos amplamente utilizados para os patógenos isolados da mastite subclínica.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local de estudo e origem das amostras

O estudo foi conduzido no Laboratório de Bacteriologia, da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, após o isolamento e identificação de patógenos provenientes do leite de vacas com mastite subclínica de 12 rebanhos leiteiros localizados no raio de 150 Km da cidade de Goiânia.

As amostras escolhidas para se analisar o perfil de sensibilidade foram aquelas com a maior frequência de agentes isolados. Verificou-se o espectro de sensibilidade de 116 cepas de *Staphylococcus aureus*; 30 cepas *Staphylococcus* coagulase negativo; 30 de *Streptococcus* spp.; 81 cepas de *Escherichia coli*; 41 cepas de *Enterobacter* spp. e 40 cepas de *Pseudomonas* spp.

### 2.2 Testes de sensibilidade *in vitro*

#### a) Teste de difusão em ágar

Os testes de sensibilidade frente aos principais antimicrobianos de utilização intramamária, comercializados na região, foram realizados segundo o método de Kirby-Bauer modificado (LABORATORY AND FIELD HANDBOOK ON BOVINE MASTITIS, 1987).

Os patógenos isolados foram testados frente aos seguintes antimicrobianos: amoxicilina (10 µg), ampicilina (10 µg), cefalexina (30 µg), ceftiofur (30 µg), cefquinome (30 µg), doxiciclina (30 µg), enrofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), neomicina (30 µg), norfloxacina (10 µg), sulfonamida (300 µg), trimetoprin-sulfametaxol (25 µg) e tetraciclina (30 µg).

Após a identificação das bactérias cinco unidades formadoras de colônias foram transferidas para 5,0 mL de Caldo Casoy, que foi incubado a 37°C até atingir a turvação de 0,5 mL na escala de MacFarland. Então um suabe esterilizado foi introduzido no tubo contendo o inóculo, umedecido, pressionando nas paredes para retirar o excesso e passado por toda placa contendo o ágar Müller-Hinton, com ou sem sangue de acordo com o patógeno, até obter-se uma camada uniforme. Aguardava-se aproximadamente 15 minutos para ocorrer a

difusão do inóculo no ágar e com o auxílio de uma pinça esterilizada depositava-se os discos dos antimicrobianos numa distância aproximada de 2,0 cm um do outro e da borda da placa.

Uma vez preparadas as placas foram incubadas invertidas a 37°C por 18-24 horas. Após esse período procedeu-se a leitura do diâmetro do halo de inibição de cada disco e, os resultados foram interpretados como cepa sensível, intermediária ou resistente, conforme as tabelas padrões de dispersão desses antimicrobianos.

### **b) Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

Isolados de *Staphylococcus aureus* (70 cepas) foram obtidos a partir de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. Estes foram submetidos à diferentes concentrações do extrato etanólico bruto das flores de *C. officinalis*, obtido e cedido por PARENTE (2008).

1. Pesou-se 1000 mg do extrato etanólico da calêndula, e colocou-se em um tubo de ensaio esterilizado contendo 2,0 mL de Dimetilssulfóxido (DMSO). Após a solubilização retirou-se 1,0 mL dessa solução e acrescentou em um tubo previamente contendo 1,0 mL do solvente DMSO, dessa maneira realizou-se uma diluição seriada 1:2 para cada amostra. Foram desprezadas as primeiras diluições, pela dificuldade da interpretação na leitura, dessa maneira se obteve tubos com concentrações variando de 12,5 mg/mL a 0,19 mg/mL para o extrato bruto.

2. De cada isolado retirou-se 3 a 5 unidades formadoras de colônias (UFC) de *S. aureus* do ágar sangue, as quais foram suspensas em 4,0 mL de Caldo Müller-Hinton até atingir a turbidez equivalente ao tubo de 0,5 da escala de MacFarland.

3. Após a preparação dos tubos contendo as concentrações desejadas, o inóculo foi transferido na mesma quantidade da suspensão preparada, sendo 0,5 mL de inóculo para 0,5 mL de suspensão. No tubo controle, colocou-se apenas DMSO e o inóculo. Os tubos foram incubados a 37°C por 18-24 horas. A CIM dos isolados foi definida como a menor concentração do extrato em que não foi observado nenhum crescimento bacteriano indicada pela ausência de turvação no tubo.

### **2.3 Análise estatística**

A análise do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e CIM da calêndula utilizando-se e análise descritiva de cálculo de frequências (SAMPAIO, 1998). Para a análise estatística também foi realizada testes Qui-quadrado, com nível de significância  $p < 0,05$ , para comparar a ação dos grupos de antimicrobianos utilizados sobre as bactérias isoladas (MONTEIRO FILHO, 2004)



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os antimicrobianos foram agrupados em categorias de acordo com as classes do princípio ativo, em:  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, tetraciclina e sulfas. Constatou-se, como pode ser visto na Tabela 1, que a maioria das bactérias Gram-positivas isoladas apresentou frequência de sensibilidade acima de 70%, exceto para a classe das sulfas, com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

TABELA 1 – Resultado do perfil ao teste de sensibilidade *in vitro* das bactérias Gram-positivas isoladas de amostras de leite de vacas em lactação com mastite subclínica frente a diferentes quimioterápicos

Grupos de antimicrobianos	Perfil de Sensibilidade					
	<i>S. aureus</i>		<i>S. coag. Negativo</i>		<i>Streptococcus spp.</i>	
	N	%	N	%	N	%
<b>Quinolonas</b>	161 /178	90,4 <sup>A</sup>	43 /48	89,6 <sup>A</sup>	47 /54	87,0 <sup>A</sup>
<b><math>\beta</math>-lactâmicos</b>	349 /488	71,5 <sup>B</sup>	111/127	87,4 <sup>A</sup>	107 /135	79,3 <sup>A</sup>
<b>Aminoglicosídeos</b>	159 /224	71,0 <sup>B</sup>	51/58	87,9 <sup>A</sup>	45 /60	75,0 <sup>B</sup>
<b>Tetraciclina</b>	156 /200	78,0 <sup>B</sup>	48 /56	85,7 <sup>A</sup>	43 /54	79,6 <sup>A</sup>
<b>Sulfas</b>	130 /227	57,3 <sup>C</sup>	37 /57	64,9 <sup>B</sup>	33 /58	56,9 <sup>C</sup>
<b>Quimioterápicos</b>						
<b>Enrofloxacina</b>	103 /115	89,6	27 /30	90,0	26 /30	86,7
<b>Norfloxacina</b>	58 /63	92,1	16 /18	88,9	21 /24	87,5
<b>Amoxicilina</b>	70 /116	60,3	23 /30	76,7	21 /30	70,0
<b>Ampicilina</b>	67 /116	57,8	25 /30	83,3	26 /29	89,7
<b>Cefalexina</b>	87 /111	78,4	28 /30	93,3	23 /30	76,7
<b>Ceftiofur</b>	92 /104	88,5	26 /27	96,3	23 /26	88,5
<b>Cefquinome</b>	34 /41	82,9	9 /10	90,0	14 /20	70,0
<b>Gentamicina</b>	83 /114	72,8	24 /29	82,8	25 /30	83,3
<b>Neomicina</b>	76 /110	69,1	27 /29	93,1	20 /30	66,7
<b>Doxiciclina</b>	72 /87	82,8	25 /26	96,2	21 /24	87,5
<b>Tetraciclina</b>	84 /113	74,3	23 /30	76,7	22 /30	73,3
<b>Sulfonamida</b>	32 /114	28,1	13 /30	43,3	13 /28	46,4
<b>Trimetoprin+sulfametaxol</b>	98 /113	86,7	24 /27	88,9	20 /30	66,7

Teste: Qui-quadrado ( $p < 0,05$ ) utilizado somente entre os grupos.

Na avaliação dos perfis de sensibilidade *in vitro* com diferentes antibióticos de utilização em medicina veterinária frente às amostras bacterianas isoladas de mastite subclínica, os antimicrobianos do grupo das quinolonas foram os que demonstraram o maior percentual de eficácia, 90,4%, 89,6% e 87,0% sobre as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativo* e *Streptococcus spp*, respectivamente. (Tabela 1). Esta é uma informação

importante para indicação de protocolos terapêuticos, principalmente para profissionais que atuam a campo e que não dispõem de estruturas para procedimentos laboratoriais.

Apesar de que os resultados obtidos oferecem valiosas informações em relação a essas bactérias Gram-positivas, todavia, deve-se assinalar que a escolha aleatória de medicamentos que possuam, por exemplo, antibióticos do grupo das quinolonas como princípio ativo, não implicará necessariamente no sucesso do tratamento, especialmente naquelas propriedades onde seu uso é frequente e inadequado.

Ao se analisar a sensibilidade frente aos antibióticos e quimioterápicos dentro de cada grupo, outro aspecto importante a ser considerado neste estudo foi o elevado percentual de amostras de *S. aureus* sensíveis à norfloxacin (92,1%), à enrofloxacin (89,6%), ao ceftiofur (88,5%) e ao cefquinome (82,9%), fazendo destes uma opção de tratamento sistêmico associado ao uso intramamário.

Resultados semelhantes aos reportados por MOREIRA et al. (1997), que observaram em 35 propriedades rurais da bacia leiteira de Goiânia vacas com mastite clínica e determinaram que as cepas de *S. coagulase positiva* apresentavam a maior frequência de sensibilidade frente à enrofloxacin (96%) e ao ceftiofur (94%), demonstrando que apesar de ter se passado 12 anos estas drogas ainda apresentam boa sensibilidade *in vitro*.

Estes dados sobre a alta sensibilidade demonstrada pela maioria dos princípios ativos testados, e comumente utilizados para o tratamento de casos desta enfermidade, sejam por infusões intramamárias ou sistêmicas sugere que muitas vezes o insucesso na terapia de vacas com mastite pode estar relacionado a outros fatores como a aplicação inadequada da droga, tratamento incompleto e a resposta individual de cada animal.

O grupo das sulfas foi o que apresentou a menor eficácia *in vitro*, e estes valores foram influenciados pelo quimioterápico sulfonamida, o qual mostrou menor eficácia frente às bactérias testadas, com 28,1%, 43,3% e 46,4% sobre *S. aureus*, *S. coagulase negativo* e *Streptococcus spp.*, respectivamente (Tabela 1). Mas, CORRÊA et al. (2005) identificaram 19,8% para *S. aureus*, enquanto MACHADO et al. (2008), encontraram um perfil ainda menor de

sensibilidade (11,1%) de cepas de *S. coagulase* negativo. E de acordo com CUNHA et al. (2006), esta droga foi amplamente empregada no passado, e devido ao seu uso incorreto e excessivo a doses sub-terapêuticas em medicina veterinária, associado à seleção natural dos microrganismos desafiados, provavelmente resultaram no fenômeno de resistência.

Verifica-se ainda na Tabela 1, que além da sulfonamida, as drogas bacterianas de menor eficácia para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus*, foram ampicilina (57,8%) e amoxicilina (60,3%). Esses dados divergem dos resultados de CORRÊA et al. (2005) os quais observaram 21,1% de sensibilidade frente à ampicilina.

Outros autores demonstraram uma maior resistência a ampicilina, FONTANA (2002) encontram 100% de resistência dos *Staphylococcus* spp, em Goiás; SANTOS et al. (2006) confirmaram que 90% (27/30) das cepas eram resistentes à ampicilina e NADER FILHO et al. (2007) relataram eficácia em somente 4,2% das cepas. Também, MEDEIROS et al. (2009) relataram a ampicilina como a droga menos eficaz. Para esses autores, os resultados evidenciaram uma elevada porcentagem de cepas resistentes, reforçando a importância do uso adequado e monitorado de antibióticos, já que cepas resistentes podem ser disseminadas no ambiente e se transformarem em sério problema de saúde pública e animal.

De acordo com BRITO et al. (2001), diversos estudos sobre a sensibilidade antimicrobiana realizados no Brasil com patógenos envolvidos na mastite bovina demonstram um aumento crescente no padrão de resistência, principalmente para *S. aureus*, e MEDEIROS et al. (2009) citaram a necessidade da realização periódica de testes de sensibilidade *in vitro*, por causa dessa variação que pode comprometer o tratamento do animal bem como os programas de controle da mastite bovina causada por esse agente.

Verifica-se também que a maioria dos antibióticos testados contra *Staphylococcus* coagulase negativo tiveram sensibilidade maior que 80%, exceto trimetoprim + sulfametoxazol (76,7%), amoxicilina (76,7%) e menor sensibilidade pela sulfonamida. Já para CUNHA et al. (2006), a maior eficácia foi em relação à gentamicina (97,98%) e enrofloxacina (90,90%), e em relação a este antibiótico os dados foram semelhantes aos encontrados no presente estudo.

A ação da ampicilina sobre *Streptococcus* spp. foi de 89,7%, sendo o antibiótico de maior eficácia sobre essas cepas, porém não foi encontrada na literatura consultada a melhor eficácia desse medicamento.

A Tabela 2 mostra os resultados dos testes de sensibilidade *in vitro* das bactérias Gram-negativas frente às diferentes drogas antimicrobianas.

TABELA 2 – Resultados dos testes de sensibilidade *in vitro* de *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. isoladas de amostras de leite de vacas em lactação com mastite subclínica.

Grupos de antimicrobianos	Perfil de Sensibilidade					
	<i>Escherichia Coli</i>		<i>Enterobacter Spp.</i>		<i>Pseudomonas spp.</i>	
	N	%	N	%	N	%
<b>Quinolonas</b>	97 /122	79,5 <sup>A</sup>	43 /56	76,8 <sup>A</sup>	49 /69	71,0 <sup>A</sup>
<b>β-lactamicos</b>	186 /340	54,7 <sup>B</sup>	47 /169	27,8 <sup>B</sup>	44 /161	27,3 <sup>C</sup>
<b>Aminoglicosídeos</b>	64 /145	44,1 <sup>C</sup>	22 /77	28,6 <sup>B</sup>	42 /69	60,9 <sup>B</sup>
<b>Tetraciclinas</b>	83 /146	56,8 <sup>B</sup>	23 /73	31,5 <sup>B</sup>	33 /64	51,6 <sup>B</sup>
<b>Sulfas</b>	71 /149	47,7 <sup>C</sup>	30 /77	39,0 <sup>B</sup>	30 /78	38,5 <sup>C</sup>
<b>Quimioterápicos</b>						
<b>Enrofloxacina</b>	63 /79	79,7	30 /39	76,9	29 /40	72,5
<b>Norfloxacina</b>	34 /43	79,1	13 /17	76,5	20 /29	69,0
<b>Amoxicilina</b>	30 /80	37,5	6 /40	15,0	7 /40	17,5
<b>Ampicilina</b>	41 /81	50,6	4 /40	10,0	10 /40	25,0
<b>Cefalexina</b>	40 /81	49,4	11 /41	26,8	9 /38	23,7
<b>Ceftiofur</b>	55 /76	72,4	16 /34	47,1	14 /33	42,4
<b>Cefquinome</b>	20 /22	90,9	10 /14	71,4	4 /10	40,0
<b>Gentamicina</b>	36 /78	46,2	13 /40	32,5	25 /38	65,8
<b>Neomicina</b>	28 /67	41,8	9 /37	24,3	17 /31	54,8
<b>Doxiciclina</b>	33 /66	50,0	6 /33	18,2	16 /26	61,5
<b>Tetraciclina</b>	50 /80	62,5	17 /40	42,5	17 /38	44,7
<b>Sulfonamida</b>	24 /80	30,0	5 /41	12,2	11 /40	27,5
<b>Trimetoprin+sulfametaxol</b>	47 /69	68,1	25 /36	69,4	19 /38	50,0

Teste: Qui-quadrado ( $p < 0,05$ ) utilizado somente entre os grupos.

Comprando-se os resultados da Tabela 1 e Tabela 2, nota-se uma grande variação dos percentuais de sensibilidade entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, o que encontra respaldo nas observações de NIKAIDO (1998). Outra explicação pode ser fundamentada pela estrutura morfológica das bactérias Gram-negativas, que possuem a membrana externa, que limita o acesso do agente antimicrobiano ao interior celular dificultando a ação destes produtos (VAARA, 1992).

Os resultados demonstraram que as drogas que apresentaram menor eficácia foram sulfonamida, amoxicilina e ampicilina sobre as bactérias Gram-

negativas (Tabela 2). A literatura consultada registra os resultados de SANTOS (2006) que analisando o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos para enterobactérias isoladas de vacas com mastite verificou 100% de resistência a ampicilina e 65% a amoxicilina.

Verificou-se que as classes dos agentes antimicrobianos de menor eficácia ( $p < 0,05$ ) para *E. coli* foram os aminoglicosídeos e as sulfas. Destacando-se o percentual de sensibilidade de 46,2% e 41,8%, para gentamicina e neomicina, respectivamente. No grupo das sulfas obteve-se 30,0% e 68,1%, frente à sulfonamida e trimetoprin+sulfametaxol, respectivamente. Achados semelhantes aos obtidos neste estudo foram descritos por RANGEL (2007) que também encontrou um percentual similar para trimetoprin+sulfametaxol (68,8%), enquanto em relação à gentamicina (32,0%) os achados diferiram.

Nota-se na Tabela 2, um baixo espectro de ação da maioria dos antibióticos testados sobre os isolados de *Enterobacter* spp., sendo que as drogas de menor eficácia foram doxiciclina (18,2%), amoxicilina (15,5%), sulfonamida (12,2%) e ampicilina (10,0%) E em relação às classes de antimicrobianos, as quinolonas apresentaram um perfil de sensibilidade significativamente maior que às demais.

O perfil de sensibilidade microbiana das 40 cepas de *Pseudomonas* spp. mostrou que a enrofloxacina (72,5%) e norfloxacina (69,0%) foram os antimicrobianos mais efetivos frente aos microrganismos isolados, dados que comprovam os relatos de FERNANDES et al. (2009), pois encontraram que *P. aeruginosa* foi sensível em 73,7% das amostras.

Neste trabalho foi possível verificar a existência de resistência múltipla dos microrganismos para vários princípios ativos, e baixa sensibilidade frente amoxicilina (17,5%), cefalexina (23,7%), ampicilina (25,0%) e sulfonamida (27,5%). Esses dados estão em concordância com os resultados de GASPAROTTO et al. (2007) identificaram que as cepas foram resistentes a todos os princípios ativos testadas. Ressalta-se ainda, que infecções causadas por *Pseudomonas* são particularmente problemáticas devido à resistência intrínseca que elas desenvolvem e habilidade adquirirem resistência adaptável durante um curso de terapêutica (KOLLEF, 2005).

A Tabela 3 mostra os resultados de diferentes concentrações do extrato etanólico das flores da calêndula sobre 70 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. Nota-se que o extrato apresentou atividade antibacteriana em todas as dosagens testadas, sendo que a concentração 3,12 mg/mL do extrato foi capaz de inibir o crescimento de 54,3% (38/70) dos isolados. Por outro lado, nove cepas não foram inativadas pelo extrato nessas concentrações utilizadas.

TABELA 3 – Resultado de diferentes concentrações do extrato etanólico das flores de *Calendula officinalis* sobre 70 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas do leite de vacas com mastite subclínica.

Dosagem do Extrato	Sensibilidade	
	Número (N)	Frequência (%)
3,12 mg/mL	38 /70	54,3
1,56 mg/mL	12 /70	17,1
0,78 mg/mL	5 /70	7,1
0,39 mg/mL	3 /70	4,3
0,19 mg/mL	3 /70	4,3
Sem efeito	9 /70	12,9
<b>Total</b>	<b>70</b>	<b>100,00</b>

Os resultados do presente estudo estão de acordo com os encontrados por PARENTE et al. (2009), os quais relataram que a CIM de 0,39 mg/mL desse extrato frente a *S. aureus* ATCC 13048. Outros estudos realizados por PEREIRA et al. (2009a; 2009b, 2009c) demonstraram ação antimicrobiana *in vitro* de vários extratos de plantas testados sobre *S. aureus* e *S. coagulase* negativo isolados de vacas e búfalas com mastite.

Não foram encontrados na literatura consultada outros trabalhos para testar a atividade antimicrobiana dessa planta, no entanto, deparou-se com várias pesquisas utilizando-se diversas outras plantas medicinais. Em 2008, SCHUCH et al. produziram soluções desinfetantes a partir de folhas e talos de *Baccharis trimera* (nome comum Carqueja), *Eucalyptus* ssp. (Eucalipto) e *Tagetes minuta* (Cravo-de-defunto) para testar sua atividade antibacteriana sobre os microrganismos causadores da mastite bovina, *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Pseudomonas aeruginosa* e concluíram que as plantas apresentaram potencial antimicrobiano.

Também, SILVA et al. (2009) relataram que *Staphylococcus aureus* foram sensíveis à solução do extrato *Mimosa tenuiflora* (Jurema preta) e ainda

assinalaram que os extratos de plantas são utilizados há muitos anos por várias populações em todo o mundo no tratamento de várias doenças.

Todos esses estudos, testando atividades de produtos fitoterápicos evidenciam que várias plantas possuem ação bactericida mostrando a importância de se avaliar meios alternativos no tratamento de infecções causadas, principalmente contra microrganismos que apresentam multirresistência.

### 3. CONCLUSÕES

A variação do perfil de sensibilidade às drogas comumente utilizadas para casos de mastite demonstrou que as bactérias Gram-positivas apresentaram maior sensibilidade aos princípios antimicrobianos do que as bactérias Gram-negativas.

Conclui-se também que o extrato de calêndula apresentou atividade antibacteriana *in vitro* sobre *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica.



## REFERÊNCIAS

1. ALONSO, J.R. **Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas**. Buenos Aires: Isis, 1998. 1038p.
2. 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.
3. BROWN, D.J.; DATTNER, A. Phytoterapeutic Approaches to Common Dermatologic Conditions. **Arch of Dermatologic**, v.134, p.1401-1404, 1998.
4. CORRÊA, I.; CORRÊA, M.G.P.; MARIN, J.M. Antimicrobial susceptibility of strains of coagulase-positive *Staphylococcus* isolated from mastitic bovine milk. **Ars Veterinária**. v. 21, n. 1, p. 69-76, 2005.
5. COSTA, E.O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S. L.; BERNADI, M. M.; **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 422-434.
6. CUNHA, A.P.; SILVA, L.B.G.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; SILVA, D.R.; OLIVEIRA, A.A.F.; SILVA, K.P.C; MOTA, R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. **Arquivo do Instituto Biológico**. v. 73, n.1, p.17-21, 2006.
7. FERNANDES, M.C.; RIBEIRO, M.G.; SIQUEIRA, A.K.; SALERNO, T.; LARA, G.H.B.; LISTONI, F.J.P. Surto de mastite bovina causada por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 61, n. 3, p. 745-748, 2009.
8. FONTANA, V.L.D.S. **Etiologia da mastite bovina subclínica da região de Jataí/GO. Padrão genética e de suscetibilidade à drogas antimicrobianas com ênfase ao gênero *Staphylococcus***. 2002. 61p. Universidade Estadual Paulista Júlia de Mesquita Filho, Araraquara.
9. FRANCO, L.L. **As Sensacionais 50 Plantas Medicinais campeãs de poder curativo**. Curitiba: Editora Santa Mônica, 1996. 241p.

10. GASPAROTTO, P.H.; PLASZEZESKI, F.; ROCHA, C.S.; GRECELLÉ, C.B.Z. Sensibilidade a antimicrobianos da *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de amostras de leite *in natura*. (**Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná**). 2007.
11. KOLLEF, M.H. Gram-negative bacterial resistance: evolving patterns and treatment paradigms. **Clinical Infectious Diseases**. 15:40 (Suppl 2):85-88, 2005.
12. LABORATORY AND FIELD HANDBOOK ON BOVINE MASTITIS. Arlington VA: National Mastitis Council, 1987. 208p.
13. LOGUERCIO, A.P.; BATTISTIN, A.; CASTAGNA DE VARGAS, A.; NIURA, A.H.; WITT, N.M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jabolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**. v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005.
14. LOGUERCIO, A.P.; GROFF, A.C.M.; PEDROZZO, A.F.; WITT, N.M.; SILVA, M.S.; CASTAGNA DE VARGAS, A. Atividade *in vitro* do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 41, n. 2, p. 347-349, 2006.
15. 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.
16. 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.
17. MONTEIRO FILHO, G. **Segredos da Estatística em Pesquisa Científica**. 1ª ed. Goiânia: Ed. Vieira. 2004. 188p.
18. 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.
19. MOTA, R.A.; SILVA, K.P.C.; FREITAS, M.F.L.; PORTO, W.J.N.; SILVA, L.B.G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a

- multirresistência bacteriana – Artigo de Revisão. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**. v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.
20. NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; AMARAL, L.A.; ROSSI JUNIOR, O.D.; OLIVEIRA, R.P. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.74, n.1, p.1-4, 2007.
21. NIKAIDO, H. Multiple antibiotic resistance and efflux. **Current Opinion of Microbiology**. v. 1, p. 516-23, 1998.
22. PARENTE, L.M.L. **Atividades angiogênica, antiinflamatória, cicatrizante e antibacteriana do extrato etanólico e frações das flores da *Calendula officinalis* L cultivadas no Brasil**. 2008. 53 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária. Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
23. PARENTE, L.M.L.; SILVA, M.S.B.; BRITO, L.A.B.; LINO-JÚNIOR, R.S.; PAULA, J.R.; TREVENZOL, L.M.F.; ZATTA, D.T.; PAULO, N.M. Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.11, n.4, p.383-391, 2009.
24. PEREIRA, A.V.; LÔBO, K.M.S.; BEZERRA, D.A.C.; RODRIGUES, O.G.; ATHAYDE, A.C.R.; MOTA, R.A.; DE LIMA, E.Q., DE MEDEIROS, E.S. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de jurema preta e neem sobre amostras de *Staphylococcus* sp. isoladas de mastite em búfalas. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 76, n. 3, p. 341-346, 2009a.
25. PEREIRA, A.V.; RODRIGUES, O.G.; AZEVEDO, T.K.B.; BEZERRA, D.A.C.; DE LIMA, E.Q.; PEREIRA, M.S.V. Perfil de extrato de plantas sobre *Staphylococcus aureus* isolado de mastite bovina. **Revista de Biologia e Farmácia**. ISSN 1983-4209, v. 3, n. 1, p.105-111, 2009b.
26. PEREIRA, A.V.; RODRIGUES, O.G.; DE LIMA, E.Q.; OLIVEIRA, K.A.; MOTA, R.A.; DE MEDEIROS, E.S. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extrato de Jurema preta (*Mimosa tenuiflora*) e antibióticos sintéticos utilizados no tratamento de mastite em bubalinos. **Revista de Biologia e Farmácia**. SSN 1983-4209, v. 3, n. 1, p. 105-111, 2009c.
27. RANGEL, P.M. **Perfil genético e microbiológico de cepas de *Escherichia coli* isoladas de leite mastítico bovino**. 2007. 73f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Jaboticabal.

28. REIS, S.R.; SILVA, N.; BRESCIA, M.V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.55, n.6, p.651-658, 2003.
29. SAMPAIO, I.B.M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Belo Horizonte: UFMG, 1998. 221p.
30. SANTOS, C.D.M. **Staphylococcus sp. e Enterobactérias isoladas de mastite recorrente em oito rebanhos da região de Uberlândia-MG: Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos**. 2006. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal de Uberlândia.
31. SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo: Manole, 2007. 314p.
32. 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. **Veterinária Notícias**. v. 12, n. 2, p. 83-88, ago.-dez. 2006.
33. SCHUCH, L.F.D. **Perfil genético e microbiológico de cepas de Escherichia coli isoladas de leite mastítico bovino**. 2007. 206f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
34. SCHUCH, L.F.D.; WIEST, J.M.; COIMBRA, H.S.; PRESTES, L.S.; TONI, L.; LEMOS, J.S. Cinética da atividade antibacteriana *in vitro* de extratos naturais frente a microrganismos relacionados à mastite bovina. **Ciência Animal Brasileira**. v. 9, n. 1, p. 161-169, 2008.
35. SILVA, C.C.; VARGAS, C.G.; LUND, R.G.; LADEIRA, S.; GONZALES, H.L.; NASCENTE, P.S. Suscetibilidade *in vitro* de bactérias causadoras de mastite frente a antibióticos. 2008. In.: XVII Congresso de Iniciação Científica e X Encontro de Pós-graduação, novembro de 2008. **Anais....** Pelotas.
36. SILVA, V.A.; FREITAS, A.F.R.; PEREIRA, M.S.V.; LACERDA, J.T.J.G. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* da *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poir. (Jurema Preta) sobre linhagens de *staphylococcus aureus* de origem bovina. In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia. 2009. **Anais eletrônicos....** [On line]. Disponível em: <<http://sbmicrobiologia.org.br/PDF/cdsbm/resumos/R0285-1.htm>>. [Data de acesso: 02 de janeiro de 2010].

37. TOZZETTI, D.S.; BATAIER, M.B.N.; ALMEIDA, L.R.; PICCININ, A. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas – revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**. Ano 6, n. 10, janeiro de 2008 – Periódicos Semestral. [On line]. Disponível em: < <http://www.revista.inf.br/veterinaria10/revisao/edic-vi-n10-RL74.pdf>> [Data de acesso: 30 de dezembro de 2009].
  
38. VAARA, M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. **Microbiology Review**, v.56, n.3, p. 395-411, 1992.
  
39. WHO. **Monographs on: Selected medicinal plants**. Geneve, v. 2, 2002, p. 35-44.

## CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A mastite bovina é um sério problema econômico no contexto da pecuária nacional, causando prejuízos tanto na quantidade quanto na qualidade do leite produzido, com consequências no segmento da produção dos derivados lácteos. Seu controle baseia-se na aplicação de práticas de manejo com função preventiva fundamentadas nas medidas de higiene durante a ordenha e do ambiente com conseqüente diminuição da exposição das tetas aos patógenos, e também com o uso de antimicrobianos.

A partir do experimento realizado, comprovou-se que *Staphylococcus aureus* foi o agente mais isolado de casos de mastite subclínica nos rebanhos estudados respaldado em estudos desenvolvidos em outras regiões. Tal patógeno pode ser prevenido adotando-se procedimentos corretos na rotina de ordenha. Embora tais protocolos para o controle de mastite contagiosa sejam amplamente divulgados entre os produtores, o isolamento do referido agente demonstra muitas vezes sua utilização inadequada.

Constatou-se que houve efeito específico dos patógenos na variação da contagem de células somáticas, sendo que os microrganismos Gram-positivos (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* spp.) foram os responsáveis pela maior elevação da CCS em níveis significativos em relação à variação de CCS das amostras de leite em que se isolaram os demais patógenos. Encontrou-se neste estudo que as menores variações da CCS para o isolamento das enterobactérias, foram referentes aos isolados de *E. coli* e *Enterobacter* spp. Os resultados relativos à estatística da CCS, de acordo com o tipo de bactéria envolvida na infecção intramamária, mostraram que bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foram responsáveis pelas maiores e menores variações da CCS, respectivamente.

Quando se analisaram os fatores de risco para o desenvolvimento da mastite, verificou-se que as variáveis relacionadas à higiene insatisfatória do ambiente e ordenhador, secagem inadequada dos tetos, e fatores relacionados ao equipamento de ordenhar, como manutenção e limpeza inadequadas, estiveram associados ao aumento da CCS nas propriedades estudadas.

Em relação às prováveis fontes de infecção dos patógenos observou-se que as mãos dos ordenhadores, assim como os conjuntos de teteiras são capazes de veicular tanto os agentes contagiosos quanto os ambientais, importantes na epidemiologia da mastite bovina.

Em função dos problemas enfrentados por causa do uso indiscriminado dos produtos químicos, resíduos no leite e a resistência bacteriana, torna-se necessária a busca de novas alternativas de tratamento e o conhecimento do medicamento correto para a terapêutica. Neste contexto, o isolamento e identificação dos patógenos envolvidos representam grande importância como prova definitiva no diagnóstico da mastite e a análise *in vitro* da sensibilidade antimicrobiana se faz necessária nas amostras isoladas, pois existem variações no perfil de sensibilidade e resistência que podem comprometer o tratamento do animal, bem como os programas de controle da enfermidade.

Apesar da constatação que a maioria das bactérias isoladas apresentaram sensibilidade aos antimicrobianos testados, houve variação do perfil de sensibilidade às drogas, demonstrando a importância da realização de antibiogramas para a escolha adequada do princípio ativo de acordo com a sensibilidade do agente infeccioso.

A busca por alternativas de controle de enfermidades com a utilização de produtos fitoterápicos ganha cada vez mais espaço dentro da veterinária, visto que existem muitos estudos que comprovam a atividade antibacteriana *in vitro* de extratos de plantas sobre patógenos infecciosos, o que foi verificado neste trabalho, demonstrando o efeito bactericida do extrato da calêndula sobre *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)