

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFICÁCIA DO CEFTIOFUR NO TRATAMENTO ESTENDIDO
INTRAMAMÁRIO DA MASTITE SUBCLÍNICA POR
ESTAFILOCOCOS EM PRIMÍPARAS BOVINAS

RODRIGO GARCIA MOTTA

BOTUCATU – SP

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFICÁCIA DO CEFTIOFUR NO TRATAMENTO ESTENDIDO
INTRAMAMÁRIO DA MASTITE SUBCLÍNICA POR
ESTAFILOCOCOS EM PRIMÍPARAS BOVINAS

RODRIGO GARCIA MOTTA

BOTUCATU – SP

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFICÁCIA DO CEFTIOFUR NO TRATAMENTO ESTENDIDO
INTRAMAMÁRIO DA MASTITE SUBCLÍNICA POR
ESTAFILOCOCOS EM PRIMÍPARAS BOVINAS

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Botucatu, para obtenção do título de doutor em Medicina Veterinária, Área de Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar

Orientador: Prof. Adj. Márcio Garcia Ribeiro

BOTUCATU – SP

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Motta, Rodrigo Garcia.
Eficácia do ceftiofur no tratamento estendido
intramamário da mastite subclínica por estafilococos em
primíparas bovinas / Rodrigo Garcia Motta. - Botucatu,
2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia
Orientador: Márcio Garcia Ribeiro
Capes: 50502000

1. Ovino - Doenças. 2. Mastite - Tratamento. 3.
Estafilococos. 4. Anti-infecciosos. 5. Parto animal.

Palavras-chave: Bovina; Estafilococos; Mastite subclínica;
Primíparas; Tratamento.

Nome do autor: Rodrigo Garcia Motta

Título: Eficácia do ceftiofur no tratamento estendido intramamário da mastite subclínica por estafilococos em primíparas bovinas

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Adjunto Márcio Garcia Ribeiro

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu - SP

Prof. Adjunto Antônio Carlos Paes

Membro Titular

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu - SP

Prof. Titular Helio Langoni

Membro Titular

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu - SP

Prof. Dr. Geraldo de Nardi Junior

Membro Titular

Disciplina de Agronegócios

FATEC – Botucatu - SP

Prof. Dr. Rogério Giuffrida

Membro Titular

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

UNOESTE – Presidente Prudente - SP

Data da Defesa: 26 de novembro de 2015

*Aos meus pais, José Luiz Bressito Motta e,
Solange Maria Lucarelli Garcia Motta;*

*Aos meus irmãos, Diego Garcia Motta,
Igor Garcia Motta e Vitor Garcia Motta;*

Ao Meu Tio José Fernando Lucarelli Garcia;

Aos professores e amigos Márcio Garcia Ribeiro e Antônio Carlos Paes;

*Ao meu avô Benedito Ribeiro Garcia (in memoriam) e a minha avó,
Maria Aparecida Lucarelli Garcia – Patida - (in memoriam),
minhas rédeas, meu orgulho e, principalmente, meus exemplos de honestidade, trabalho
e respeito, duas estrelas que me guiam por onde vou. SAUDADE ETERNA...*

Despedida ou talvez agradecimento...

E no meio dessa confusão alguém partiu sem se despedir; foi triste. Se houvesse uma despedida talvez fosse mais triste, talvez tenha sido melhor assim, uma separação como às vezes acontece em um baile de carnaval — uma pessoa se perde da outra, procura-a por um instante e depois adere a qualquer cordão.

Creio que será permitido guardar uma leve tristeza, e também uma lembrança boa; que não será proibido confessar que às vezes se tem saudade; nem será odioso dizer que a separação ao mesmo tempo nos traz um inexplicável sentimento de vazio, afinal como imaginar a casa da Vó Patida sem a personagem principal.

Já dizia Charles Chaplin ... “Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso”... É Vó, tenho certeza que nosso encontro não foi por acaso, um modelo de Mulher, Mãe, Amiga, Professora, a Avó perfeita, a nossa Dona Patida !!!!

Prefiro pensar assim ... “Cada um oferece aquilo que tem e transborda de dentro de si.

Uma parreira oferece doce fruto, uma orquídea nos oferece bela flor. Um vulcão só oferece desolamento, calor, mau cheiro, e não é segredo que uma cobra peçonhenta não te oferecerá mais que mortífero veneno. É bem verdade que podemos reunir tudo isso dentro de nós, mas lembre-se: as pessoas oferecem o que transborda de dentro de si. Quando fizeres o bem a uma serpente, não espere que ela te retribua com uma rosa, por que não é o que transborda de dentro dela. Quando fizeres bem a uma serpente, faça-o porque é este bem que transborda de dentro de ti, e é justo que compartilhemos o que de bom nós temos em excesso. Esse deve ser teu único pensamento e expectativa: Dê a quem precisa, não espere de quem não tem. Isto te dará felicidade e te privará de decepções. E não te eximas de fazer o bem à serpente, por que algumas coisas não nos cabe reprovar ou punir, apenas compreender”... Mas como aceitar que a casa da Vó esta vazia, até suas rosas secaram, e as orquídeas que tanto gostava, também, resolveram ser solidárias a nossa tristeza, recolheram sua flor perderam sua cor e perfume.

Quantos momentos maravilhosos foram vividos na Casa da Vó Patida, mas não se perderam, porque ficaram em nossa vida, guardados no nosso coração para sempre. E, essas lembranças, mesmo que solitárias, deixarão a saudade um pouco menos infeliz: que importa que uma estrela já esteja morta se ela ainda brilha no fundo de nossa noite e

de nosso confuso sonho? Vó Patida... como queria que tudo isso fosse só um sonho estranho, onde ao acordar tudo permanecesse no seu devido lugar, e a Senhora estivesse aqui nos dando a sua benção....

Ah... talvez valesse a pena dizer que houve um telefonema que não pôde haver; entretanto, é possível que não adiantasse nada. Para que explicações? Esqueçamos as pequenas coisas mortificantes; o silêncio torna tudo menos penoso; lembremos apenas as coisas douradas e digamos apenas a pequena palavra: Adeus...

Como é difícil processar essa pequena palavra que se alonga como um canto de cigarra perdido numa tarde de domingo. Vó Patida, quanta falta, a casa vazia, quanta saudade ficou para traz... “Saudade é não saber. Não saber o que fazer com os dias que ficaram mais compridos, não saber como encontrar tarefas que lhe cessem o pensamento, não saber como frear as lágrimas diante de uma música, não saber como vencer a dor de um silêncio que nada preenche”...

Vó Patida, não está sendo fácil conviver com o sentimento da perda, mas temos que aceitar, as pessoas especiais, ao partirem deixam um vazio enorme em nossos corações, mas para sempre carregaremos em nossos sonhos as boas lembranças, os momentos de alegria e os ensinamentos sobre a importância da família... O amor nunca morre, ele é forte o bastante, e mesmo que não estejamos mais ao seu lado, esteja fora do alcance dos seus olhos, você vai sentir esse amor da mesma forma e intensidade a nossa gratidão por compartilharmos a sua presença ...

O amor vai além da vida!

Vó vai com Deus....

Mas tenho certeza que sua missão foi cumprida da melhor forma possível...

Um exemplo de mulher. Mãe e avó...

Um modelo de vida...

Obrigado

A Professora de todos,

A nossa avó querida,

A única Vó Partida....

06/07/1935 - 27/04/2015

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradecer pode parecer fácil, entretanto, lembrar o nome de todas as pessoas que direta ou indiretamente nos deram a mão nessa jornada, é impossível, então peço desculpas aos esquecidos.

Agradeço à Deus, por conceder-me o dom de adorar os animais, pois com este encontrei na Medicina Veterinária minha satisfação. Além de iluminar e proteger o meu caminho, me fortalecer nas dificuldades, permitir a felicidade das minhas conquistas e a concretização do doutorado, sonho maior que sempre o imaginei tão distante...

A Nossa Senhora de Aparecida, de quem sou devoto, e em seu colo aconchegante, protegeu-me nos momentos em que me senti sozinho, não deixando que jamais desistisse!

Agradeço em especial aos meus pais, José Luiz Bressito Motta e Solange Maria Lucarelli Garcia Motta, os quais souberam colocar em meu coração um sentimento nobre chamado respeito. Esses dois anjos estiveram sempre ao meu lado, sendo os alicerces da minha vida. Meus espelhos! Meus amores! Minhas rédeas!

Obrigado aos meus avós maternos (“Ditão” e “Patida” in memoriam), que com muito carinho demonstraram-me a importância da “FAMÍLIA”, doando o colo amigo nas horas onde mais precisei. “Ditão”, agradeço pela paciência e por mostrar-me que só com muito trabalho honesto que se consegue vencer. Quantas vezes levou-me ao sítio, ainda criança, fazendo com que eu adquirisse o gosto pela terra, pelos animais, especialmente por vacas de leite!

Agradeço aos meus avós paternos, Vô Motta e Vó “Tutti”, in memoriam, que com muito carinho souberam compreender-me, demonstrando-me como é bom ser um neto querido. Infelizmente, não puderam ver o neto formado e agora doutor como sempre sonharam. Mas são anjos divinos e posso senti-los ao meu lado. “Zé Motta”, quantas festas, cavalgadas, bailes passamos juntos, dois meninos, entre nós não existia diferença de idade!

Ao meu melhor e verdadeiro amigo, “Gordo”, com certeza já formamos uma parceria em outra encarnação, hoje somos uma dupla perfeita. Valeu meu “mano”! Diego, quantas vezes olhávamos ao redor e não víamos ninguém, obrigado por você estar ao meu lado sempre, meu irmão! Hoje, iguais até na profissão!

Igão, companheiro, amigo, irmão para todas as horas, meu braço direito. Minha maior motivação profissional é tê-lo como primeiro aluno orientado de iniciação científica. Em breve, parceiros de profissão.

Obrigado, ao meu irmão caçula Vitor, mesmo não podendo acompanhá-lo dia-a-dia, ocupa lugar especial em meu coração, afinal, você alegria minha vida mantendo sempre acesa a chama da infância, muitas vezes assume as responsabilidades de um adulto, toma decisões importantes, menino com coração de homem.

Ao “Zezão”, que nunca vou chamar de tio, pois sempre lhe considerei como meu segundo pai. Adotou-nos com tanto carinho e atenção, dedica-se mais aos sobrinhos do que a si próprio.

Aos meus padrinhos Odorico Tucunduva e Maria Cecília Lucarelli Tucunduva pela paciência, carinho e orientação, estiveram sempre ao meu

lado nos momentos mais importantes e decisivos, e me adotaram como neto mais velho

A minha aluna e orientada Lorryne, que não mediu esforços para me ajudar no desenvolvimento deste projeto.

Aos amigos da Unisep, vocês são pessoas especiais que nos passam, com experiência e grande força, nossa amizade vai além da relação professor aluno, Angélica Link e Viviane Aparecida Bussolaro.

Ao técnico de laboratório Fernando José Paganini Listoni, pela amizade desde a residência, por ser sempre prestativo e auxiliar de forma incondicional em todas as atividades do laboratório de microbiologia do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP. Obrigado pelos conselhos, apoio e incentivo.

Aos professores José Paes de Almeida N. Pinto, Helio Langoni, Paulo Francisco Domingues, Jane Megid e Cassiano Victória, pelas discussões e sugestões nos corredores do MI, decisivas no meu desenvolvimento profissional, que se iniciaram ainda na residência.

As professoras Noeme Sousa Rocha e Juliana Olivêncio Nunes pela amizade, carinho e apoio no desenvolvimento desta tese.

Aos pós-graduandos Marília, Amanda, Carmen e Gustavo pela amizade e companheirismo, pelas discussões construtivas, que muito acrescentaram na minha formação pessoal.

A pós-graduação pela forma como nos conduz, respeito, carinho e agilidade.

Ao Prof. Rogério Giuffrida pela realização de análise estatística e pelo auxílio na delimitação do projeto.

Ao Amigo Geraldo de Nardi Junior por ser tão prestativo nos momentos finais do meu trabalho, aceitando o convite para a banca.

Ao Professor, mestre e amigo, Antônio Carlos Paes, com quem tive a honra de conviver nestes nove anos de formado, grato pelas discussões, sugestões e incentivo ao desenvolvimento intelectual. Obrigado por me ensinar a clínica médica.

Ao meu orientador Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro, por permitir essa oportunidade, confiando em mim, acompanhando meu desenvolvimento pessoal e profissional a cada dia, sempre com muita paciência e dedicação. Ao seu lado, aprendi a gostar da pesquisa, com certeza, ser seu orientado me transformou numa pessoa melhor. Nas horas de desespero e desânimo não me deixou desistir, sempre encontrando a melhor solução, inúmeros e-mails, cartas, mensagens e ofícios, obrigado pela sua paciência e amizade.

A CAPES, pela bolsa concedida.

GRATIDÃO.

Você deixou seus sonhos para que eu sonhasse.
Derramou lágrimas para que eu fosse feliz.
Você perdeu noites de sono para que eu dormisse tranquilo.
Acreditou em mim, apesar dos meus erros.
Ser educador é ser um poeta do amor.
Jamais esqueça que eu levarei para sempre
Um pedaço do seu ser dentro do meu próprio ser...

(Augusto Cury)

MOTTA, R.G. **Eficácia do ceftiofur no tratamento estendido intramamário da mastite subclínica por estafilococos em primíparas bovinas.** Botucatu, 2015. 114p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2015.

RESUMO

O presente estudo investigou a eficácia do ceftiofur intramamário no tratamento estendido com dez aplicações, a cada 12 horas, na mastite subclínica por estafilococos em primíparas bovinas. Foram utilizados 60 animais da raça holandesa, divididos em quatro grupos: G1 = Grupo negativo ou sem infecção estafilocócica, CMT negativo e CCS < 200.000 células/mL; G2 = Grupo com infecção estafilocócica não tratado, CMT positivo (2+ ou 3+) e CCS > 200.000 células/mL; G3 = Grupo com infecção tratado no início da lactação (entre 15 e 100 dias de lactação), CMT positivo (2+ ou 3+) e CCS > 200.000 células/mL e G4 = Grupo tratado final da lactação (entre 101 e 200 dias de lactação), CMT positivo (2+ ou 3+) e CCS > 200.000 células/mL. As amostras de leite foram coletadas em cinco momentos: M0 ou dia zero (diagnóstico da mastite subclínica), M1 = 7 dias após o diagnóstico da mastite subclínica e início da terapia estendida, M2 = 2 dias após o término do tratamento estendido (dia 14 após o diagnóstico da mastite subclínica), M3 = 7 dias após M2 (dia 21 após o diagnóstico da mastite ou 9 dias após o final do tratamento), M4 = 7 dias após M3 (dia 28 após o diagnóstico da mastite ou 16 dias após o final do tratamento). Nos grupos tratados com ceftiofur intramamário, foi evidenciada a cura microbiológica com redução na CCS em 73,34% no G3 e 46,66% no G4. Assim, nos grupos tratados (G3 + G4) e não tratado (G2), as taxas de cura foram, respectivamente, 60,00% e 26,66% ($p < 0,05$). Foram isoladas 45 linhagens de *Staphylococcus* spp., das quais foram identificados principalmente *S. aureus* (51,12%), *S. intermedius* (40,0%) e *S. epidermidis* (8,88%). O perfil de sensibilidade microbiana “in vitro” dos isolados apresentou maiores índices de sensibilidade para oxacilina (80,00%), ceftiofur (77,78%) e cefalexina (77,78%), seguidos do ciprofloxacino (66,66%) e gentamicina (60,00%). Em contraste, cloxacilina (24,44%), penicilina (35,56%) e tetraciclina (44,46%) foram os antimicrobianos menos efetivos diante dos estafilococos isolados. Dentre as amostras de leite colhidas no momento M0 e M1, 13,33% foram positivas para o teste de detecção de substâncias inibidoras/resíduos de antimicrobianos na prova de Delvotest™ e todas negativas no Snap test™. No M2, 55,00% foram positivas no Delvotest™ e 46,66% no Snap test™, enquanto no M3 16,66% acusaram positivas no Delvotest™ e 11,66% no Snap test™. No M4, 11,66% foram positivas no Delvotest™ e 8,33% no Snap test™. Após 16 dias do final do tratamento (M4), 6,66% dos animais ainda acusavam reações positivas no Delvotest™ e 10% para o Snap test™, considerando somente os grupos tratados (G3 e G4), indicando persistência de resíduos no leite. Ocorreu redução na CCS e dos escores de CMT em todos os animais curados, embora nenhum grupo atingiu o limite considerado normal (<200.000CS/mL) ao longo do período de acompanhamento do estudo. O grupo G1 (não infectado)

produziu mais leite se comparado aos outros três grupos com infecção estafilocócica (G2, G3 e G4). Infere-se a eficácia do tratamento estendido em primíparas bovinas infectadas por estafilococos, com redução da CCS, escores de CMT e restabelecimento da produção de leite. No entanto, deve-se restringir o uso do tratamento estendido com ceftiofur para animais com histórico de mastite crônica, causadas por micro-organismos não responsivos - como os estafilococos -, em virtude da persistência de resíduos após o tratamento por período prolongado.

Palavras-chave: tratamento por período prolongado; cefalosporinas, *Staphylococcus aureus*; infecção mamária crônica; CCS, CMT, produção de leite; resíduos de antimicrobianos.

MOTTA, R. G. **Efficacy of extended ceftiofur intramammary therapy for treatment of staphylococcal subclinical mastitis in lactating primiparous heifers**. 2015. 114p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2015.

ABSTRACT

This study investigated the efficacy of extended ceftiofur intramammary therapy using 10 applications by five days in primiparous heifers infected by staphylococcal subclinical mastitis. Sixty Holstein cows were divided in four groups: G1 = negative group or without staphylococcal infection, CMT-negative and $SCC < 200.000$ cells/mL; G2 = untreated group with staphylococcal infection, CMT-positive and $SCC > 200.000$ cells/mL; G3 = treated early lactation group (15-100 days of lactation) with staphylococcal infection, CMT-positive and $SCC > 200.000$ cells/mL, G4 = treated late of lactation group (101-200 days of lactation) with staphylococcal infection, CMT-positive and $SCC > 200.000$ cells/mL. The milk samples were collected at five moments: M0 or day zero (diagnosis of subclinical mastitis), M1 = 7 days after diagnosis of subclinical mastitis and early extended therapy, M2 = 2 days after the end of the extended treatment (day 14 after the diagnosis of subclinical mastitis), M3 = 21 days after diagnosis of mastitis (9 days after the end of treatment), M4 = 28 days after diagnosis of mastitis (16 days after the end of treatment). In the groups treated with intramammary ceftiofur, microbiological cure was observed with reduction in SCC in 73.34% and 46.66% of animals for G3 and G4, respectively. Thus, in the treated (G3 + G4) and untreated (G2) groups, microbiological cure rates were 60.00% and 26.66% ($p < 0.05$), respectively. Forty-five *Staphylococcus* spp. strains were isolated. From these, *S. aureus* (51.12%), *S. intermedius* (40.0%), and *S. epidermidis* (8.88%) were the most common species. *In vitro* antimicrobial susceptibility profile of isolates showed that the most effective drugs were oxacillin (80.0%), ceftiofur (77.78%), and cephalixin (77.78%), followed by ceftriaxone (69.0%), ciprofloxacin (66.66%) and gentamicin (60.0%). In contrast, high-resistance rates of isolates were founded to cloxacillin (24.44%), penicillin (35.56%), and tetracycline (44.46%). Among the milk samples taken in M0 and M1, 13.33% samples were positive for the inhibiting substances/antimicrobial residues detection test in Delvotest™ and all were negative in the Snap test™. In contrast, 55.00% samples were positive in Delvotest™ at M2, whereas 46.66% samples were positive in the Snap test™. In M3 of study, 16.66% and 11.66% of samples were positive in Delvotest™ and in the Snap test™, respectively. The M4 showed 11.66% positive in Delvotest™ and 8.33% in the Snap test™. Occurred reduction of SCC and CMT scores in all cured animals, although none group showed normal cell count (< 200.000 SC/mL) during period of study. After 16 days the end of treatment (M4), 6.66% and 10.0% of animals yet showed positive reactions in Delvotest™ and Snap test™, respectively, considering only treatment groups

(G3 and G4), indicating long persistence of antimicrobials residues in milk. Group G1 (non infected) showed more milk production than other three groups with staphylococcal infection (G2, G3 and G4). The present study displayed efficacy of extended ceftiofur intramammary therapy for treatment of staphylococcal subclinical mastitis in lactating primiparous heifers, as well as reduction of SCC and CMT scores, as well as return to normal milk yield. However, extended therapy with ceftiofur should be restricted to chronic mastitis caused by refractory pathogens, like *Staphylococcus* spp., because persistence of antimicrobials residues by long-time after treatment.

Keywords: long-time therapy; cephalosporins, *Staphylococcus aureus*; chronic mammary infections; SCC; CMT; milk production; antimicrobial residues.

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Distribuição das espécies de ECP e ECN identificadas no leite de primíparas, bovinas, com mastite subclínica, naturalmente infectadas. Botucatu, SP, 2015.....p.50
- Quadro 2.** Detecção de resíduos de antimicrobianos e/ou substâncias inibidoras do crescimento bacteriano - utilizando testes comerciais no leite de primíparas bovinas, com e sem de mastite subclínica por estafilococos, segundo diferentes momentos após o tratamento estendido com ceftiofur por via intramamária. Botucatu, SP, 2015.....p.50
- Quadro 3.** Valores da CCS* em primíparas bovinas com a reação no CMT, cura microbiológica espontânea e/ou resposta na terapia intramamária estendida com ceftiofur. Botucatu, SP, 2015.....p.52
- Quadro 4.** Valores de produção de leite em litros/animal expressos como média $\pm$ desvio padrão em quatro grupos experimentais avaliados em cinco diferentes momentos em primíparas bovinas, com e sem mastite estafilocócica após terapia estendida com ceftiofur. Botucatu, SP, 2015.....p.56

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Cura microbiológica e redução na contagem de células somáticas, cura microbiológica sem redução na contagem de células somáticas e animais não curados, após o tratamento intramamário estendido com cloridrato de ceftiofur, em primíparas bovinas com mastite subclínica naturalmente infectadas por estafilococos. Botucatu, SP. 2015..... p.48
- Tabela 2.** Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, na prova de difusão com discos, em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de primíparas bovinas com mastite subclínica Botucatu, SP, 2015..... p.51
- Tabela 3.** Valor mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e desvios padrões da contagem de células somáticas no leite de primíparas bovinas, com e sem mastite subclínica por estafilococos, segundo a distribuição por grupos. Botucatu, SP, 2015..... p.54
- Tabela 4.** Valor mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e desvios padrões da contagem de células somáticas no leite de primíparas bovinas, com e sem mastite subclínica por estafilococos, segundo a distribuição por momentos. Botucatu, SP, 2015..... p.55

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fórmula utilizada para definição do universo amostral para o tratamento estendido com ceftiofur de primíparas bovinas. N = tamanho da população (finita); P = prevalência estimada na população; d = margem de erro aceitável. Com base neste cálculo seria necessária a coleta de no mínimo 24 amostras de leite primíparas portadoras de mastite subclínica por estafilococos no local do estudo. Os resultados obtidos foram analisados por estatística descritiva geral no programa estatístico BioStat 5.3®, considerando intervalo de confiança de 95% e nível de significância para valores de $p < 0,05$ p.47
- Figura 2.** Medianas da contagem de células somáticas em primíparas bovinas que obtiveram cura microbiológica espontânea no G2, com diagnóstico e isolamento de estafilococos (Momento 0), que após 28 dias (Momento 4) mostraram isolamento negativo. Botucatu, SP, 2015..... p.57
- Figura 3.** Medianas da contagem de células somáticas em primíparas bovinas que obtiveram cura microbiológica após tratamento intramamário estendido, no início da lactação G3, com diagnóstico e isolamento de estafilococos (Momento 0), que após 28 dias (Momento 4) mostraram isolamento negativo. Botucatu, SP, 2015..... p.57
- Figura 4.** Medianas da contagem de células somáticas em primíparas bovinas que obtiveram cura microbiológica após tratamento intramamário estendido, no meio da lactação G4, com diagnóstico e isolamento de estafilococos (Momento 0), que após 28 dias (Momento 4) mostraram isolamento negativo. Botucatu, SP, 2015..... p.57
- Figura 5.** Valores de produção de leite em litros /vaca expressos como média em quatro grupos experimentais avaliados em cinco diferentes momentos (M0, M1, M2, M3, M4), em primíparas bovinas com e sem mastite estafilocócica tratadas de modo estendido com ceftiofur. Botucatu, SP, 2015.....p.60

LISTA DE ABREVIATÖES

CMT = Califórnia Mastitis Test

CCS = Contagem de Células Somáticas

C° = Graus Celsius

ECP = estafilococos coagulase positivo

ECN = estafilococs coagulase negativo

mL = mililitros

µg = microgramas

mg = miligramas

Kg = quilos

ppb = parte por bilhão

% = porcentagem

n = número amostral

MRSA = *Staphylococcus aureus* metilcilina resistente

S. aureus = *Staphylococcus aureus*

Min = Valor mínimo

p25 = percentil 25%

Med = mediana

p75 = percentil 75 %

Max = Valor máximo obtido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	p.19
2. REVISÃO DE LITERATURA	p.23
2.1 Etiologia da mastite e epidemiologia das infecções mamárias	p.23
2.2 Diagnóstico	p.24
2.3 Contagem de células somáticas (CCS)	p.27
2.4 Tratamento	p.28
2.5 A escolha do antimicrobiano	p.30
2.6 Características específicas do cloridrato de ceftiofur para tratamento da mastite subclínica por estafilococos	p.30
2.7 Tratamento da mastite clínica e subclínica	p.31
2.8 Terapia alternativa para a mastite subclínica por <i>Staphylococcus aureus</i> na lactação	p.34
2.9 Terapia estendida	p.34
2.10 Resíduos de antimicrobianos em terapia estendida	p.35
3. HIPÓTESES DO ESTUDO	p.38
4. OBJETIVO	p.39
3.1 Geral	p.39
3.2 Específicos	p.39
5. MATERIAL E MÉTODOS	p.40
4.1 Delineamento experimental	p.40
4.2 Animais	p.40
4.3 Diagnóstico da mastite clínica e subclínica	p.40
4.4 Colheita de amostras de leite.....	p.41
4.5 Grupos de tratamento.....	p.41
4.6 Protocolo de tratamento intramamário estendido.....	p.41
4.7 Isolamento e caracterização fenotípica dos estafilococos....	p.42
4.8 Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”.....	p.43
4.9 Contagem de células somáticas	p.43
4.10 Avaliação de resíduos de antimicrobianos no leite	p.44
4.11 Acompanhamento dos animais	p.45
4.12 Avaliação da cura bacteriológica.....	p.45
4.13 Critérios de exclusão.....	p.45
4.14 Tratamento estatístico dos resultados.....	p.46
4.15 Comitê de ética e experimentação animal	p.47
6. RESULTADOS	p.48
5.1 Cura microbiológica	p.48
5.2 Cultivo microbiológico	p.49
5.3 Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”.....	p.50
5.4 Detecção de resíduos de antimicrobianos	p.51
5.5 Contagem de células somáticas	p.53
5.6 Produção de leite diária	p.59

7. DISCUSSÃO	p.61
7.1 Cura microbiológica	p.61
7.2 Cultivo microbiológico	p.64
7.3 Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”.....	p.65
7.4 Detecção de resíduos de antimicrobianos	p.70
7.5 Contagem de células somáticas e escores de CMT.....	p.71
7.6 Produção de leite diária	p.73
8. CONCLUSÕES	p.75
9. REFERÊNCIAS	p.76
10. Anexos	p.90
Anexo I (Quadro 4).....	p.90
Anexo I (Quadro 5).....	p.91
Anexo II (Artigo Científico)	p.92

1. INTRODUÇÃO

A mastite - definida classicamente como a inflamação da mama - é a doença que mais onera a criação de animais destinados à produção de leite (PHILPOT e NICKERSON, 2002; SANTOS e FONSECA, 2007). Os processos infecciosos da glândula são determinados, predominantemente, por micro-organismos de origem bacteriana e, secundariamente, por fungos, algas e vírus, muitos dos quais com potencial zoonótico (RIBEIRO, 2008).

Os prejuízos com a mastite bovina incluem a redução na produção de leite, perda da glândula, descarte prematuro de fêmeas com elevado valor zootécnico, óbito ocasional de animais, manejo extra no rebanho, gastos com honorários veterinários e aquisição de medicamentos, descarte de leite com resíduos de antimicrobianos e possíveis prejuízos em lactações futuras, em razão de perda de área funcional do tecido mamário (HUIJPS et al., 2009; PIEPERS et al., 2014).

A crescente demanda global por leite e derivados lácteos com qualidade tem motivado o aumento do tamanho dos rebanhos bovinos, com elevação das médias diárias de produção por animal e paralelamente, faz-se necessário o incremento no número de novilhas para reposição (PIEPERS et al., 2009).

Diferentes autores enfatizam que o potencial futuro de produção leiteira em bovinos será expresso de maneira satisfatória caso não ocorram transtornos graves na glândula no período de novilhas (fêmeas bovinas que nunca pariram) [RUPP e BOICHARD, 2000; VLIEGHER et al., 2012]. Com efeito, a implementação de um plano de metas para controle e profilaxia da mastite em novilhas, pode refletir na vida produtiva da fêmea e em maior rentabilidade para toda cadeia produtiva de lácteos (HUIJPS et al., 2009; PIEPERS et al., 2014).

Os primeiros relatos de mastite em novilhas foram descritos no decorrer das décadas de 1920 a 1930. No entanto, somente a partir dos anos 80 o assunto ganhou notoriedade científica, principalmente no que tange a redução na produção de leite em lactações futuras (MEANEY, 1981; OLIVER e MITCHELL, 1983; LAFFRANCHI et al., 2001; PIEPERS et al., 2009).

Vários pesquisadores têm reafirmado a importância da mastite em novilhas antes do parto e suas implicações diretas no transcorrer da primeira lactação, com destaque na América do Norte (MATTHEWS et al., 1992; OLIVER et al., 1992; MIDDLETON et al., 2005), na Europa (MYLLYS, 1995; AARESTRUP; JENSEN, 1997; PIEPERS et al., 2009),

Nova Zelândia (PANKEY et al., 1996; COMPTON et al., 2007; PARKER et al., 2008) e Japão (SENO; AZUMA, 1983).

No Brasil, os primeiros estudos que abordaram a ocorrência de infecções intramamárias em novilhas foram conduzidos nos Estados de São Paulo e Paraná (COSTA et al., 1995; PARDO et al., 1998). Em contraste, o estudo da mastite em primíparas (fêmeas bovinas que pariram pela primeira vez) está restrito a estudos pontuais em todo mundo (HALLBERG et al., 1995; ARASHIRO et al., 2000). As infecções na mama de novilhas podem afetar a diferenciação das células secretoras (PIEPERS et al., 2014). Hallberg et al. (1995) estudaram o tecido secretor corado por hematoxilina e eosina de primíparas com mastite e observaram menor área de epitélio alveolar, aumento de estroma e infiltração de leucócitos, o que pode resultar na redução da área funcional da mama e da vida produtiva dos animais.

Convencionalmente, a mastite em animais é subdividida em clínica e subclínica baseada na gravidade e exteriorização do processo inflamatório (LANGONI, 1997; COSTA et al., 2003; NUNES et al., 2007). A mastite clínica caracteriza-se por alterações visíveis no leite, na glândula e/ou sistêmicas (LANGONI et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2009). Nestes casos, a mama pode apresentar sinais de edema, dor, calor, rubor e perda momentânea da função, além de alterações visíveis no leite (formação de grumos, presença de pus, dessora, coágulos e sangue) [LANGONI, 1997; COSTA et al., 2000]. Ocasionalmente, os animais podem apresentar sinais sistêmicos secundários a mastite, como febre, taquicardia, dificuldade respiratória, diminuição dos movimentos ruminais e inapetência (RADOSTITS et al., 2007).

Na forma subclínica, somente se observa a redução na produção de leite. Nestes animais, o diagnóstico somente é obtido utilizando métodos que possibilitem a detecção de alterações na composição e nos constituintes celulares do leite ou a presença de patógenos (COSTA et al., 2003; SANTOS e FONSECA, 2007).

A mastite em novilhas caracteriza-se pela maior ocorrência de casos clínicos nos primeiros dias pós-parto. Ao contrário, nas vacas, a mastite clínica pode ser observada ao longo de toda a lactação dependendo do agente causal envolvido (BARKEMA et al., 2006; MCDUGALL et al., 2007). Além disso, constata-se marcante diferença na etiologia da mastite entre essas categorias de animais, pois *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus coagulase negativos* e *Trueperella pyogenes* são mais frequentes nas infecções mamárias em novilhas, enquanto os estafilococos coagulase positivos (*S. aureus*) e *Streptococcus agalactiae* são frequentemente isolados na mastite em vacas. No entanto, estudos recentes identificaram também *S. aureus* no terço médio e final da lactação em

primíparas (MCDOUGALL et al., 2007; ROY et al., 2009). Essas diferenças no perfil da etiologia provavelmente ocorrem em razão de peculiaridades fisiológicas das novilhas em comparação com as vacas com várias lactações, ou após mastites crônicas nessa última categoria animal (RADOSTITS et al., 2007).

Nas novilhas, a glândula mamária foi pouco desafiada aos agentes etiológicos presentes na microbiota dos animais e no ambiente. Paralelamente, as novilhas ainda sofrem influência hormonal para concluir seu crescimento (VLIEGHER et al., 2012). Investigando essas diferenças, Tanaka et al. (2008) avaliaram o perfil dos leucócitos no leite de novilhas e vacas, identificando subtipos distintos de polimorfonucleares para cada categoria animal, fato que poderia justificar, em parte, as diferenças de isolamento microbiológico entre novilhas, primíparas e múltiparas.

Em virtude do maior número de casos subclínicos em ruminantes domésticos, comparado aos casos clínicos, o diagnóstico da mastite bovina baseia-se principalmente em testes indiretos que dependem, fundamentalmente, da elevação dos leucócitos ou alterações na composição do leite. À luz do conhecimento atual, parece prático ou pelo menos razoável, também definir a mastite bovina como uma doença caracterizada pelo aumento do número de leucócitos e presença de micro-organismos no leite das glândulas acometidas (PHILPOT e NICKERSON, 2002; RADOSTITS et al., 2007).

Entre as infecções mamárias em vacas, a mastite subclínica crônica por estafilococos é uma das afecções mais preocupantes e frequentes que acometem animais de produção leiteira em todo mundo (RIBEIRO, 2008; ROY et al., 2009).

A diminuição da duração das infecções intramamárias tem sido objeto de estudo dos programas de controle de qualidade do leite em todo mundo, meta que pode ser atingida com ações específicas de profilaxia e controle direcionadas a agentes contagiosos, como estafilococos, incluindo avanços na terapia da vaca seca, novos produtos para o *pós-dipping*, vacinação e no tratamento de casos específicos de mastite subclínica durante a lactação com o uso de antimicrobianos por período estendido (TAPONEN e PYORALA, 2009; ROY et al., 2009).

Os estafilococos, particularmente *S. aureus*, causam infecções de longa duração, com tendência a cronicidade, alta celularidade, com baixas taxas de cura e grande perda na produção de leite (SABOUR et al., 2004; SWINKELS et al., 2012). Na mastite bovina, por estafilococos, vários fatores podem interferir na cura bacteriológica com o uso de antimicrobianos, incluindo o estágio de ocorrência da infecção, a presença intracelular da bactéria, a virulência do isolado, a formação de microabscessos e a baixa resposta imune dos animais (ROY et al., 2009; ZAFALON et al., 2010).

A dificuldade de tratamento das mastites estafilocócicas, somadas a alta ocorrência deste grupo de agentes na mastite bovina, a multirresistência aos antimicrobianos convencionais, o grande número de fatores de virulência e mecanismos de evasão do sistema imune do patógeno, têm motivado programas de descarte precoce de fêmeas bovinas portadoras de mastite por *S. aureus*, que geram grande impacto negativo nos rebanhos (SANTOS e FONSECA, 2007; RADOSTITS et al., 2007).

Na última década, foi preconizada a terapia estendida como alternativa de tratamento, particularmente para rebanhos com alta prevalência de mastite subclínica por estafilococos - principalmente *S. aureus* – em rebanhos com animais de alto valor zootécnico (ROY et al., 2009). A terapia estendida consiste em 6 a 10 aplicações de antimastíticos pela via intramamária, com intuito de aumentar as taxas de cura clínica e bacteriológica, reduzir a contagem de células somáticas e restabelecer a qualidade e a produção diária do leite dos animais (SANTOS e FONSECA, 2007; SWINKELS et al., 2012). No entanto, esta modalidade alternativa de terapia apresenta maior custo ao produtor, em razão do maior número de tratamentos intramamários requeridos, por animal, somado ao maior tempo de descarte de leite com resíduos de antimicrobianos, fator que tem limitado a adoção deste protocolo terapêutico ou restringido a terapia estendida para micro-organismos refratários aos tratamentos convencionais, notadamente por estafilococos (SANTOS e FONSECA, 2007; RIBEIRO, 2008; MAIOLINO et al., 2014).

Estudos envolvendo o tratamento estendido de vacas em lactação com mastite subclínica por *S. aureus* ou outros micro-organismos utilizando cefalosporinas de terceira geração, têm sido descritos de modo pontual em todo mundo (TAPONEN e PYORALA 2009; ROY et al., 2009; SWINKELS et al., 2012; MAIOLINO et al., 2014).

Apesar da perspectiva desta nova modalidade de tratamento, os estudos conduzidos com o assunto, até o momento, possuem como limitações a ausência de resultados referentes às taxas de cura microbiológica, o uso de pequeno número de vacas e/ou novilhas, a ausência do monitoramento da contagem de células somáticas, ou mesmo da produção de leite antes e após o tratamento (TAPONEN e PYORALA, 2009; ROY et al., 2009; SWINKELS et al., 2012).

Considerando a alta frequência de mastite estafilocócica bovina no Brasil, a baixa resposta terapêutica dos tratamentos convencionais ao longo da lactação na mastite por estafilococos em vacas, e a tendência atual de descarte de fêmeas com mastite crônica por estafilococos, o presente estudo investigou a eficácia do ceftiofur no tratamento estendido, por via intramamária, em casos de mastite subclínica por estafilococos em primíparas bovinas naturalmente infectadas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Etiologia da mastite e epidemiologia das infecções mamárias

A mastite bovina é causada por vários agentes infecciosos convencionalmente classificados em dois grandes grupos denominados contagiosos e ambientais. Os contagiosos se disseminam de um quarto infectado para outro quarto ou entre as vacas (vaca dependentes), enquanto os ambientais, na maioria das vezes, estão presentes no próprio meio ambiente de criação dos animais (RADOSTITS et al., 2007).

Os micro-organismos ambientais são representados, principalmente, pelas enterobactérias, fungos, algas, estreptococos ambientais e certos actinomicetos (SANTOS e FONSECA, 2007). Este grupo de micro-organismos está amplamente distribuído no meio ambiente dos animais (QUINN et al., 2011). São veiculados para a glândula mamária a partir do solo, fezes, ar, água, cama dos animais, vetores, utensílios e fômites, geralmente no período das entre as ordenhas (RIBEIRO, 2008).

Entre os contagiosos, merecem destaque os gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, além de *Corynebacterium bovis* e *Mycoplasma bovis* (RADOSTITS et al., 2007). Este grupo, peculiar de patógenos, possui como habitat a microbiota da pele e mucosas dos animais, e são transmitidos fundamentalmente no momento da ordenha, pelas mãos do ordenhador, por fômites, pelo equipamento de ordenha ou pelo bezerro no ato de mamar (COSTA et al., 1995; RIBEIRO, 2008).

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) é bactéria gram-positiva, geralmente encontrada colonizando o canal e pele do teto. No momento da ordenha, a transmissão ocorre principalmente pelas mãos do ordenhador, por panos de uso múltiplo ou pelos insufladores da ordenhadeira mecânica (RADOSTITS et al., 2007; SANTOS e FONSECA 2007; ROY et al., 2009).

As infecções por *S. aureus* são consideradas de difícil tratamento na lactação, como consequência da localização intracelular, da elevada resistência da bactéria aos antimicrobianos convencionais, além da formação de microabscessos no tecido mamário e do conteúdo inflamatório e debris celulares que reduzem a eficácia dos fármacos (NADER FILHO et al., 2007; ROY et al., 2009).

Neste cenário, os estafilococos destacam-se como o grupo de micro-organismos causadores de mastite contagiosa de maior patogenicidade, de elevada ocorrência nos rebanhos, e de tratamento pouco eficaz, devido à alta resistência dos isolados (ZECCONI e HAHN, 2000; MIDDLELTON et al., 2005).

Em investigações sobre a mastite bovina em outros países os estafilococos estão presentes em cerca de 50% das infecções mamárias (MIDDLETON et al., 2005; ROY et al., 2009).

No Brasil, em estudo com 127 amostras de leite de cinco propriedades leiteiras dos estados de São Paulo e Minas Gerais, encontrou-se prevalência de 40,15% para *S. aureus*. Neste mesmo estudo, foi observado predomínio de bactérias do gênero *Staphylococcus* na etiologia da mastite em três propriedades, variando entre 32 e 80%. Entre os estafilococos, 16 isolados foram produtores de enterotoxinas, denotando o risco potencial à saúde humana, associado ao consumo do leite destes rebanhos, uma vez que, a maioria dos casos eram de mastite subclínica (MEDEIROS et al., 2009).

Outra característica de patogenicidade de *S. aureus* é a capacidade de invasão e instalação nos tecidos mais internos da mama. Ademais, geralmente há formação de fibrose e microabscessos no foco da infecção, que limitam a ação dos antimicrobianos no sítio da infecção (ROY et al., 2009). Este mecanismo confere uma das principais características de virulência do agente, que se traduz por infecções de longa duração, com tendência a cronicidade e baixas taxas de cura, tanto espontânea como após o tratamento antimicrobiano (QUINN et al., 2011).

Os prejuízos econômicos decorrentes da inflamação da glândula mamária por estafilococos são atribuídos principalmente a elevação da celularidade do leite, ao custo da assistência veterinária, ao uso de medicamentos, a perda de quartos mamários e ao descarte precoce de fêmeas e morte ocasional de animais (COSTA, 1999; LANGONI et al., 2000; NADER FILHO et al., 2007; RIBEIRO, 2008). No entanto, o fator de maior impacto da mastite estafilocócica é atribuído à redução na produção leiteira (COSTA et al., 2000; NADER FILHO et al., 2007).

Particularmente no Brasil, foi estimado, prejuízo de 1,2 bilhões de litros com a mastite (SANTOS e FONSECA, 2007). Nos EUA, calcula-se prejuízo de aproximadamente 1,8 bilhões de dólares/ano provocado por infecções mamárias em vacas (NMC, 2006).

2.2 Diagnóstico

O diagnóstico da mastite estafilocócica é baseado no isolamento e identificação dos micro-organismos pelo cultivo microbiológico, considerado de referência na identificação da etiologia das mastites, reconhecido como fundamental para qualquer programa de controle da doença (QUINN et al., 2011). Entretanto, cerca de 10 a 20% das culturas de leite com mastite clínica ou subclínica podem resultar negativas, fato que pode

ser devido a casos como cura espontânea do agente (ROY et al., 2009), eliminação intermitente dos micro-organismos nas infecções crônicas ou baixo número de patógenos no leite (NMC, 2006). A presença destes resultados microbiológicos pode ocorrer também pelo uso de protocolos inadequados no isolamento em infecções por agentes que necessitam de meios específicos como os gêneros *Mycoplasma*, *Leptospira* e *Campylobacter* ou, ainda, processos inflamatórios não infecciosos de origem alérgica, metabólica, tóxica e traumática (RADOSTITS et al., 2007; LANGONI et al., 2009; QUINN et al., 2011).

No exame clínico de animais suspeitos de mastite por estafilococos devem ser consideradas as formas clínicas e subclínicas das infecções mamárias (SANTOS e FONSECA, 2007). Na forma clínica, existem sinais evidentes de inflamação, como edema, aumento de temperatura, endurecimento e dor na glândula mamária (RADOSTITS et al., 2007). No leite se observa a presença de grumos, sangue, pus ou alterações na coloração (RIBEIRO, 2008).

A princípio, considera-se que cada quarto da glândula mamária é independente. Assim, o processo infeccioso pode estar instalado numa unidade mamária, permanecendo íntegras as demais mamas. O diagnóstico das afecções clínicas da glândula mamária por *Staphylococcus* sp. envolvem a aferição dos parâmetros fisiológicos dos animais, a inspeção e exame físico do úbere e tetos (palpação) e o exame do leite, pela prova da caneca telada de fundo escuro (Tamis) [RADOSTITS et al., 2007].

O exame físico deve ser realizado, preferencialmente, com a glândula esgotada, imediatamente depois que a vaca foi ordenhada (RADOSTITS et al., 2007). A mama é examinada para se detectar quais são os quartos que estão endurecidos, edemaciados ou quentes, devido à mastite (FONSECA e SANTOS 2007). A glândula mamária também é examinada para se verificar se há alguma mudança na forma ou se os quartos estão atrofiados com áreas de tecido fibroso, o que indica dano permanente nos tecidos secretores de leite, resultante da inflamação crônica pelo patógeno (PHILPOT e NICKERSON, 2002; MAIOLINO et al., 2014).

Para análise do leite é utilizado o “teste da caneca telada de fundo escuro”, “teste da caneca telada” ou “Tamis”. Esse teste consiste na retirada dos 3 ou 4 primeiros jatos de leite no início da ordenha, em caneca ou superfície de fundo preto ou escuro, com a finalidade de observar alterações no leite como a presença de grumos, coágulos, pus, estrias de sangue, dessora e/ou leite aquoso (RADOSTITS et al., 2007).

Recomenda-se que o leite dos quartos com mastite clínica sejam encaminhados para cultivo, identificação de micro-organismos e tratamento imediato dos quartos acometidos (LEE, 2003; RIBEIRO, 2008).

Na mastite subclínica, reconhecida como a infecção mais comum por estafilococos, não ocorrem mudanças visíveis no aspecto do leite ou do úbere (ROY et al., 2009). Caracteriza-se por alterações na composição do leite, tais como aumento na CCS, aumento nos teores de proteínas séricas, diminuição de caseína, lactose, gordura e cálcio do leite (NADER FILHO et al., 2007), resultando em menor rendimento na produção de seus derivados, além de reduzir o tempo de prateleira do produto (NMC, 2006).

O diagnóstico indireto da mastite subclínica é fundamentado no aumento da celularidade (CCS) do leite e, secundariamente, baseado em alterações de outros parâmetros físico-químicos (PIEPERS et al., 2014).

O CMT, “California Mastitis Test”, estima a contagem de células somáticas do leite e pode ser realizado ao “pé da vaca”, individualmente para cada quarto, para detectar a mastite subclínica por estafilococos. Os escores do CMT (1 a 3+) estão diretamente relacionados com o aumento de células somáticas no leite. O fundamento da técnica consiste na ruptura das membranas das células somáticas presentes na amostra de leite, pelo contato com o detergente contido na solução (reagente), resultando na liberação do material presente no núcleo celular (DNA), tornando a mistura altamente viscosa (formação de gel). A coloração púrpura do reagente ficará mais acentuada na homogeneização com o leite mastístico devido ao pH alcalino. É importante enfatizar que os períodos que incluem a primeira semana pós-parto (fase de colostro) e os dias que antecedem o final da lactação (período de secagem), são considerados limitantes para a realização do CMT, devido ao processo de inflamação fisiológica e ao processo de involução da glândula mamária, respectivamente, resultando em reações falso-positivas (DIAS, 2007; RADOSTITS et al., 2007; RIBEIRO, 2008).

O isolamento microbiológico de espécies do gênero *Staphylococcus* e antibiograma são procedimentos imprescindíveis nos programas de controle da mastite bovina por este patógeno, bem como, para nortear os fármacos de eleição para o tratamento na lactação (JARP et al., 1989; LAFFRANCHI et al., 2001; HUIJPS et al., 2009).

O perfil de sensibilidade “in vitro” dos estafilococos aos antimicrobianos, permite instituir o tratamento com bases nos antimicrobianos mais adequados na lactação ou no período seco, apesar de certos estudos observarem certa discrepância entre a sensibilidade “in vitro” do patógeno e as taxas de cura microbiológica “in vivo” em casos de mastite bovina (SANTOS e FONSECA, 2007; RIBEIRO, 2008; ROY et al., 2009).

2.3 Contagem de células somáticas (CCS)

A CCS é considerada um método indireto de diagnóstico utilizado no monitoramento da saúde da mama de ruminantes domésticos em lactação, por identificar o aumento dos leucócitos e células epiteliais no leite (BARBOSA et al., 2002; BANSAL et al., 2005). Os leucócitos ou polimorfonucleados migram do sangue para o interior da glândula mamária, em decorrência de processos inflamatórios locais (BORDOLLA, 2007; CUNHA et al., 2008).

Prejuízos no volume de produção e na qualidade do leite estão diretamente relacionados com a alta CCS em animais de produção leiteira, particularmente nas infecções por estafilococos (MIDDLETON et al., 2013).

A resposta inflamatória da glândula mamária frente aos estafilococos repercute diretamente no aumento do número de leucócitos para o interior do lúmen alveolar (ROY et al., 2009). O termo célula somática é utilizado para designar os leucócitos e as células de descamação do epitélio glandular mamário (NADER FILHO et al., 2007). A elevação da CCS é indicativa de infecção mamária e resulta em prejuízos significativos aos produtores e as indústrias de laticínios e derivados (FREITAS et al., 2005).

É possível que toda e qualquer vaca com CCS >200.000 CCS/mL, independente do número de partos ou do estágio de lactação, apresente mastite subclínica em pelo menos um quarto mamário (NMC, 2006).

A principal causa do aumento da CCS em vacas está relacionada à presença de infecção da glândula mamária, causada predominantemente por bactérias como os estafilococos, ainda que outros fatores como idade do animal, estágio da lactação, momento da ordenha e estações do ano possam influenciar na elevação da contagem de células somáticas (BORDOLLA, 2007).

A redução na produção leiteira em animais com elevada CCS é resultante de lesão causada pelos patógenos e/ou toxinas nas células epiteliais secretoras da glândula, assim como pela alteração da permeabilidade vascular no alvéolo secretor (CUNHA et al., 2008).

Entre os diferentes padrões utilizados para a avaliação da qualidade do leite em âmbito mundial, a CCS tem sido adotada pela grande maioria dos países tradicionalmente envolvidos na produção leiteira (CUNHA et al., 2008). A União Européia, a Nova Zelândia e a Austrália preconizam, atualmente, como limite máximo legal 400.000 cél./mL de CCS para o leite destinado ao consumo humano, enquanto o Canadá utiliza 500.000 cél./mL, e os EUA 750.000 cel./mL (NMC, 2006).

No Brasil, a IN 62 do Ministério da Agricultura e Pecuária limita em 500.000 cél./mL de CCS para o leite cru refrigerado (BRASIL, 2012). A presença de altas contagens de células somáticas afetam a composição do leite e o tempo de vida de prateleira dos derivados, causando prejuízos significativos para a indústria (RADOSTITS et al., 2007). A ocorrência de mastite também causa a redução na síntese de proteínas (caseínas), gordura, lactose e cálcio reduzindo a qualidade do produto e seus derivados (BUENO et al., 2005). Em contraste, ocorre aumento da concentração de sódio e cloro, resultando no sabor salgado do leite dos animais com mastite (CUNHA et al., 2008).

Outros métodos de diagnóstico como contagem bacteriana total (CBT), *Whiteside*, eletro-condutibilidade do leite também são utilizados no diagnóstico e na avaliação da qualidade do leite (SANTOS e FONSECA, 2007).

2.4 Tratamento

A adoção do tratamento com antimicrobianos é um dos principais procedimentos na abordagem da mastite em animais domésticos (MCDOUGALL et al., 2007). Na prática da Medicina Veterinária, diversos protocolos terapêuticos são utilizados no tratamento da mastite em vacas na lactação e no período de secagem (REIS et al., 2003; PYORALA, 2009).

O tratamento imediato dos casos clínicos e a terapia/profilaxia da vaca seca com o uso de antimicrobianos em todos os quartos mamários, no momento da secagem, constituem as medidas mais frequentemente recomendadas na abordagem terapêutica da mastite em vacas e novilhas (LANGONI, 1997; COSTA et al., 2003; LANGONI et al., 2009).

Os maiores índices de cura no tratamento por via intramamária da mastite bacteriana em vacas são obtidos com 3 a 5 aplicações, em intervalos de 8, 12 a 24 h (dependendo das características e vida média de cada antimicrobiano). Nos casos de mastite subclínica, não existe consenso sobre o tratamento no decorrer da lactação (RIBEIRO, 2008; SWINKELS et al., 2012). Em geral, esses animais são tratados na terapia da vaca seca, devido a necessidade de descarte do leite com resíduos de antimicrobianos, somado aos baixos índices de cura no tratamento convencional, ao longo da lactação (SANTOS e FONSECA, 2007), particularmente nas infecções por estafilococos (ROY et al., 2009). No entanto, em animais de alto valor zootécnico, por vezes, é realizado o tratamento para mastite subclínica no decorrer da lactação (RIBEIRO, 2008; SWINKELS et al., 2012).

Diferentes antimicrobianos estão disponíveis comercialmente para o tratamento intramamário da mastite em vacas no Brasil (COSTA, 1999; SANTOS e FOSNECA, 2007; MAIOLINO et al., 2014). Segundo Ribeiro (2008), os princípios ativos de antimicrobianos mais utilizados pertencem ao grupo das penicilinas e análogos, cefalosporinas, aminoglicosídeos, fluorquinolonas, tetraciclinas e sulfas potencializadas pelo trimetoprim.

O uso indevido ou não racional de antimicrobianos (dose reduzida, interrupção do tratamento) no tratamento da mastite, pode aumentar a pressão seletiva para linhagens com resistência múltipla (COSTA, 1999; RADOSTITS et al., 2007; GUIGUERE et al., 2010).

Idealmente, toda e qualquer indicação do tratamento da mastite em animais deveria ser respaldada em testes “in vitro” de sensibilidade microbiana por antibiograma. Entretanto, na prática, por questões econômicas, por desconhecimento, dificuldade de acesso aos laboratórios e pessoal capacitados, ou em casos graves de mastite clínica com sinais sistêmicos que necessitam de terapia emergencial; os testes de sensibilidade microbiana “in vitro” não são realizados previamente a instituição do tratamento (RIBEIRO, 2008). Nestes casos, a escolha do fármaco, na grande maioria das vezes, na experiência acumulada dos profissionais em tratamentos anteriores, ou mesmo no apelo comercial de determinados produtos. Ademais, apesar da notória diferença entre a eficácia “in vitro” ou “in vivo” dos antimicrobianos utilizados no tratamento da mastite subclínica, são escassos os estudos conduzidos no intuito de confrontar o resultado “in vitro” de determinada linhagem frente a um dado fármaco, com a eficácia “in vivo” deste mesmo antimicrobiano por via intramamária (RIBEIRO, 2008; MAIOLINO et al., 2014).

Após o estabelecimento dos estafilococos no úbere, são possíveis quatro formas para controle da situação: (1) recuperação espontânea, (2) descarte de vacas cronicamente afetadas, (3) tratamento durante a lactação e (4) terapia da vaca seca (SANTOS e FONSECA, 2007; ROY e KEEFE, 2012).

Para a instituição do tratamento da mastite por estafilococos, diferentes fatores devem ser levados em consideração, incluindo a virulência do agente causal, a escolha do antimicrobiano, a via de aplicação (intramamária e/ou parenteral), o perfil de sensibilidade “in vitro” do micro-organismo, a opção pela terapia na lactação ou no período seco, as diferenças entre o tratamento dos casos clínicos e subclínicos, e a persistência de resíduos de antimicrobianos (ROY et al., 2009; SWINKELS et al., 2012).

O antimicrobiano ideal deveria apresentar várias características desejáveis como: amplo espectro de ação, atingir altas concentrações terapêuticas no tecido glandular ou similares à concentração inibitória mínima (MIC), estabilidade, boa efetividade na

presença de material purulento, atóxico para o tecido glandular e neonatos, ausência ou baixo nível de resíduo no leite, pH levemente alcalino (base fraca), boa relação custo-benefício e fácil aquisição no mercado (COSTA, 1999; NMC, 2006; RIBEIRO, 2008). Com efeito, poucos antimicrobianos disponíveis comercialmente reúnem a maioria destas características consideradas desejáveis para o tratamento de animais com mastite (ROY et al., 2009; RUEGG, 2010).

2.5 A escolha do antimicrobiano

Na prática, a escolha do antimicrobiano recai, geralmente, na experiência dos profissionais ou produtores, no custo, ou mesmo no apelo comercial dos fármacos (RADOSTITS et al., 2007). Apesar da divergência entre pesquisadores, os testes de sensibilidade microbiana “in vitro” possibilitam eleger antimicrobianos com melhor ação frente à microbiota mamária dos animais de determinada propriedade (vigilância contínua), facilitando a escolha de fármacos para o uso no tratamento na lactação e/ou no período seco (GUIGUERE et al., 2010). Ademais, permite monitorar a ocorrência de multirresistência aos antimicrobianos em isolados de mastite nos plantéis (RIBEIRO, 2008).

A resposta ao tratamento nos casos de mastite não se relaciona somente com o resultado dos testes de sensibilidade em “in vitro”, posto que vários fatores intrínsecos aos fármacos, agentes causais e ao processo inflamatório na glândula mamária influenciam nas taxas de cura (DINGWELL et al., 2004; RADOSTITS et al., 2007; RIBEIRO, 2008).

No Brasil, os principais grupos de antimicrobianos disponíveis para o tratamento intramamário na lactação e no período da vaca seca para a mastite por estafilococos são representados pelas cefalosporinas (cefalexina, ceftiofur, cefoperazona, cefoquimona) penicilinas naturais e sintéticas, aminoglicosídeos (neomicina, gentamicina) e fluorquinolonas [ciprofloxacina] (RIBEIRO, 2008).

2.6 Características específicas do cloridrato de ceftiofur para tratamento da mastite subclínica por estafilococos

Ceftiofur é um antimicrobiano pertencente aos beta-lactâmicos (TAVARES, 1996). É uma cefalosporina de terceira geração, de uso exclusivo em medicina veterinária, com amplo espectro de ação e farmacodinâmica baseada na inibição da síntese da parede da célula bacteriana (RIBEIRO, 2008; SWINKELS et al., 2012). As cefalosporinas inibem a síntese da parede das células pela interferência com as enzimas essenciais

(carboxipeptidases) na síntese de peptidoglicanos, este efeito resulta em lise osmótica da célula bacteriana confirmando a atividade bactericida deste agente (GUIGUERE et al., 2010).

A administração intramamária do ceftiofur é indicada para o tratamento da mastite clínica e subclínica em vacas leiteiras lactantes, causadas principalmente por estafilococos, estreptococos e corinebactérias. Vacas com sinais clínicos sistêmicos causados pela mastite devem receber terapia suporte complementar, não sendo indicado somente o tratamento intramamário convencional (RIBEIRO, 2008).

Estudo que avaliou o tratamento intramamário de 352 vacas com mastite utilizando o ceftiofur subdividiu os animais em três grupos de tratamento: grupo controle não tratado, grupo tratado com 62,5 mg e grupo tratado com 125 mg de ceftiofur. Cada grupo de tratamento recebeu duas infusões intramamárias no quarto afetado, com intervalo de 24 horas. Três definições diferentes para a cura foram usadas com propósito de análise: 1) cura clínica definida quando o leite e o úbere voltaram ao normal 14 dias após a última aplicação e permanecendo normal aos 21 dias, 2) cura bacteriana definida como a ausência do patógeno do pré-tratamento aos 14 e 21 dias pós-tratamento e 3) cura definida como ausência do patógeno do pré-tratamento aos 14 e 21 dias pós-tratamento e retorno do leite e do úbere ao normal, 14 dias após a última aplicação e permanecendo normal aos 21 dias. Entre 337 vacas analisadas para taxas de cura clínica, obteve-se cura de 54,7% (64/117) para o grupo controle não tratado, 69,4% (75/108) para o grupo tratado com 62,5 mg e 78,6% (88/112) para o grupo tratado com 125 mg (ROY et al., 2009).

2.7 Tratamento da mastite clínica e subclínica

Para otimizar o estado de saúde da glândula mamária é essencial manter registros dos casos clínicos e subclínicos de mastites (MIDDLETON, 2013), assim como utilizar racionalmente os antimicrobianos, com o intuito de evitar o aumento da pressão seletiva para bactérias multirresistentes (GUIGUERE et al., 2010).

A administração intramamária de antimicrobianos é o método mais prático de tratamento da mastite bovina (COSTA, 1999; SALAT et al., 2008). De maneira geral, o tratamento durante a lactação tem baixos índices de cura, para a maioria das bactérias, a destacar os estafilococos (SANTOS e FONSECA, 2007), se comparado ao tratamento no período seco, principalmente para casos de mastite subclínica (RIBEIRO, 2008).

O tratamento na lactação pressupõe o descarte do leite, no mínimo, nas próximas 72 horas após o término da última aplicação do fármaco, em virtude da presença – neste período – de resíduos de antimicrobianos, que são potencialmente prejudiciais aos

humanos e a industrialização do leite (LANGONI, 1997; SALAT et al., 2008). No entanto, os prejuízos com as mastites clínicas, justificam a intervenção terapêutica em casos específicos no decorrer da lactação (COSTA, 1999; MAIOLINO et al., 2014). O tratamento precoce da mastite constitui-se também em importante medida preventiva, pois elimina uma das fontes de infecção em potencial, para as demais vacas (MIDDLETON et al., 2013).

No Brasil, ao contrário de outros países, mais de 20 princípios ativos estão disponíveis comercialmente para tratamento da mastite. Entretanto, muitas vezes, pode ocorrer o insucesso terapêutico. As razões mais comuns para justificar as falhas da antibioticoterapia na mastite são: (1) distribuição inadequada do fármaco pelos fluidos e tecidos da mama, (2) baixo grau de ionização no leite com pH normal ou alterado, (3) ação reduzida no foco infeccioso (4) baixa sensibilidade do micro-organismo frente ao antimicrobiano (5) produção de enzimas pelos micro-organismos que inativam os antimicrobianos (SANTOS e FONSECA, 2007; RIBEIRO, 2008).

Outro aspecto fundamental no tratamento é a exata identificação do animal tratado e o registro de informações de relevância clínica e laboratorial, histórico de tratamentos anteriores e monitorização da resposta. Informações como a identificação da vaca, os quartos acometidos, a data do evento da mastite, o número de lactações, a data do parto, a identificação do(s) patógeno(s), o tratamento empregado (incluindo dose, via e duração), a duração do período de suspensão do uso do leite e nível mais recente de produção de leite, também devem ser considerados na abordagem terapêutica (RADOSTITS et al., 2007; SANTOS e FONSECA, 2007; MAIOLINO et al., 2014).

Nos casos em que será iniciado o tratamento, sem suporte do resultado do antibiograma, recomenda-se colher assepticamente amostra de leite do quarto mamário afetado e manter congelada (-20°C) em freezer convencional (RIBEIRO, 2008). Este procedimento resguarda o profissional para a necessidade de encaminhamento do leite do animal para a realização do diagnóstico microbiológico e antibiograma, na eventualidade do tratamento em curso não surtir o efeito desejável (RIBEIRO, 2008).

A infusão intramamária de antimicrobiano é o método mais comum de tratamento da mastite bovina durante a lactação e na terapia da vaca seca (MIDDLETON et al., 2013). Os produtos comercializados na forma de antimastíticos descartáveis, que contêm uma dose de antimicrobiano, são ideais para o tratamento individual das vacas (SANTOS e FONSECA, 2007). Os frascos com antimicrobianos, em grande quantidade, suficiente para várias aplicações, apresentam a desvantagem do aumento do risco de contaminação (RIBEIRO, 2008). Ambas as apresentações têm o mesmo grau de difusão no interior do

tecido glandular. O amplo espectro de ação, o uso de veículos carreadores e a associação sinérgica entre fármacos, tendem a contornar as limitações de difusão mamária de certos antimastíticos (SANTOS e FONSECA, 2007).

A maioria dos tratamentos intramamários da mastite bacteriana em animais são recomendados, em geral, entre 3 a 5 aplicações, em intervalos de 8, 12 a 24 horas, dependendo das características e meia vida de cada antimicrobiano (COSTA, 1999; PHILPOT e NICKERSON, 2002). Em situações específicas, como em infecções crônicas por estafilococos ou outros agentes refratários, é recomendada a “terapia estendida”, que consiste entre 6 a 10 aplicações intramamárias do antimicrobiano, com incremento significativo nas taxas de cura (SALAT et al., 2008; ROY et al., 2009; MAIOLINO et al., 2014).

O procedimento utilizado para realizar o tratamento intramamário é fundamental para se alcançar os resultados desejados. Recomenda-se realizar a antissepsia da extremidade do teto antes da infusão do antimicrobiano, para reduzir o número de bactérias presentes na região, as quais podem ser conduzidas para dentro do canal com a cânula intramamária (SANTOS e FONSECA, 2007).

A associação das vias intramamária (local) e parenteral (sistêmica), denominada terapia combinada, é indicada basicamente nos casos clínicos agudos ou hiper-agudos de mastite (MAIOLINO et al., 2014). Recomenda-se a utilização do mesmo princípio ativo pelas duas vias ou o uso de fármacos com reconhecido efeito sinérgico, tais como: aminoglicosídeos + penicilinas; sulfonamidas + trimetoprim e aminoglicosídeos + cefalosporinas (RIBEIRO, 2008).

Poucos antimicrobianos atingem concentrações terapêuticas efetivas na glândula mamária quando administrados exclusivamente por via parenteral (COSTA, 1999; GUIGUERRE et al., 2010). Em geral, devido à menor eficácia do tratamento parenteral comparado ao intramamário, não se recomenda o tratamento de animais de produção com mastite exclusivamente por via parenteral (RIBEIRO, 2008).

O período mais eficaz para o tratamento da mastite subclínica por estafilococos é na secagem. A terapia da vaca seca possui vantagens em relação à terapia na lactação. A taxa de cura dos estafilococos na terapia da vaca seca é mais elevada do que durante a lactação (SALAT et al., 2008; ROY et al., 2009). Nos anti-mastíticos de vaca seca, concentrações mais altas de antimicrobianos de longa duração podem ser usadas, além de diminuir os riscos de resíduos no leite (SANTOS e FONSECA, 2007). A incidência de novas infecções durante o período seco é reduzida e as lesões teciduais consequentes à mastite são resolvidas antes do parto (SALAT et al., 2008). Ocorre, também, redução do

número de mastites clínicas no momento do parto e todos os quartos infectados são tratados e nos quartos saudáveis será realizada profilaxia de mastite para a próxima lactação (COSTA, 1999; PHILPOT e NICKERSON, 2002).

2.8 Terapia alternativa para a mastite subclínica por estafilococos na lactação

As baixas taxas de cura dos tratamentos convencionais durante a lactação, em especial para tratamento de infecções crônicas causadas por *S. aureus*, têm estimulado a busca de novas estratégias de tratamento, entre as quais destacam-se a terapia combinada, a terapia estendida e o uso combinado de vacinação e tratamento intramamário (SALAT et al., 2008; ROY et al., 2009; MAIOLINO, 2014). Essas estratégias incrementam o custo do tratamento, embora possam ser aplicadas em situações individualizadas, onde a prevalência de infecções crônicas é elevada ou para animais de alto valor zootécnico como novilhas com mastite (SHIPIGEL et al., 2006).

Para a implantação de protocolos terapêuticos alternativos, fatores relacionados ao histórico de cada animal devem ser avaliados como: idade, estágio de lactação, volume de produção diária e CCS antes do tratamento (SALAT et al., 2008; ROY et al., 2009).

2.9 Terapia estendida

O tempo de aplicação do antimicrobiano no tratamento é um fator que influencia a cura bacteriológica resultante do tratamento (BARKEMA et al., 2006; SALAT et al., 2008; ROY et al., 2009; MIDDLENTON, 2013). O estágio de lactação é outro fator que determina a relação custo/benefício do tratamento, pois mesmo em casos com elevada probabilidade de cura clínica, vacas em final de lactação apresentam menor potencial de retorno econômico quando comparadas com animais em início de lactação (DINGWELL et al., 2004; GILLESPIE et al., 2009).

A terapia estendida consiste no aumento da duração do tratamento intramamário (6 a 10 dias), em relação ao tratamento convencional de 3 a 5 dias de duração (PYORALA, 2009; KASRAVI et al., 2011). Roy et al, (2009) avaliaram a cura bacteriológica da mastite, no tratamento convencional e estendido por via intramamária, segundo o tipo de agente causal. As vacas multíparas com mastite por *S. aureus* apresentaram taxas de cura de 10%, 20% e 35%, respectivamente, com 2, 5 ou 8 dias de tratamento. Em contraste, as primíparas apresentaram incremento nas taxas de cura 15%, 25% e 40%, nas mesmas condições. Para os ECN, as taxas de cura foram 55% em animais sem tratamento, 70% com dois dias, 75% com cinco dias e 80% com oito dias de tratamento.

Entre os potenciais benefícios da terapia estendida, pode-se citar a redução na contagem de células somáticas, o restabelecimento da qualidade e da produção leiteira em animais infectados cronicamente ou com agentes refratários a terapia convencional (DINGWELL et al., 2004; PYORALA, 2009). No entanto, esses benefícios devem ser analisados, também, em relação ao custo do antimicrobiano, no maior tempo de descarte do leite e prováveis riscos de novas infecções pelo uso de infusões repetidas no mesmo quarto (RIBEIRO, 2008).

O aumento da duração em dias do tratamento intramamário incrementa a cura bacteriológica da mastite causada por estafilococos principalmente por *S. aureus* e estreptococos ambientais. Contudo, o uso da terapia estendida como rotina, sem o prévio conhecimento do agente causal não é economicamente viável (ROY et al., 2009; MIDDLENTON, 2013; MAIOLINO et al., 2014).

A terapia estendida da mastite bovina tem se mostrado uma alternativa viável para o tratamento de agentes refratários – como os estafilococos - durante a lactação de vacas com mastite subclínica (PYORALA, 2009). No entanto, são escassos os estudos com essa modalidade de tratamento em primíparas, bem como, o restabelecimento da produção de leite, a redução na CCS e a avaliação dos resíduos dos antimicrobianos após tratamento.

2.10 Resíduos de antimicrobianos em terapia estendida

O controle da mastite é fundamental no sistema produção de leiteira (RUEG, 2010). Os produtores têm buscado, de modo continuado tecnologias que tornem as indústrias mais eficientes, gerando produtos de alta qualidade, com baixo custo e maior rendimento industrial (VILLA, 2009). Paralelamente, incluem no cotidiano o uso de produtos que garantam saúde e maior produção animal, como os antimicrobianos (MIDDLENTON, 2013). O uso indiscriminado destes fármacos aumenta a pressão seletiva para linhagens de micro-organismos resistentes, além do risco de resíduos no leite e derivados lácteos (RIBEIRO, 2008; GUIGUERE et al., 2010).

A presença de resíduos de antimicrobianos ou inibidores do crescimento de micro-organismos causa prejuízos para a indústria, pela diminuição ou inibição da quantidade de bactérias responsáveis pela fermentação, processo rotineiramente utilizado na produção de queijos e iogurtes (SANTOS e FONSECA, 2007; MOTTA et al., 2015), bem como a possibilidade de reações orgânicas indesejáveis nos humanos (GUIGUERE et al., 2010).

No Brasil, diversos estudos têm-se preocupado em monitorar a presença de resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema convencional. Villa (2009) ao avaliarem a ocorrência de resíduos de antimicrobianos em 96 amostras de leite comercializado em Brotas, SP, encontraram 50% de positividade, das quais 34,8% das amostras foram positivas para antimicrobianos do grupo beta-lactâmicos. Martin et al. (2011) encontraram 38,5% das amostras de leite pasteurizado tipo C em Salvador, BA, contendo resíduos de antimicrobianos. Em contraste, Almeida et al. (2003) ao investigarem o leite de 158 propriedades rurais de Uberlândia, MG, detectaram resíduos de beta-lactâmicos em somente 1,89% das amostras.

O consumo de leite e derivados contendo resíduos de antimicrobianos pode desencadear distúrbios alérgicos em indivíduos sensíveis, efeitos tóxicos e carcinogênicos, alterações no equilíbrio da microbiota intestinal, assim como favorecer a pressão seletiva para linhagens de bactérias resistentes no trato gastrointestinal dos humanos (ALMEIDA et al., 2003).

Atualmente, existem vários métodos de detecção de resíduos de antimicrobianos ou inibidores do crescimento de micro-organismos no leite, incluindo testes inibidores de multiplicação bacteriana, métodos imunológicos, testes receptores e enzimáticos (ALMEIDA et al., 2003; SALAT et al., 2008; MIDDLETON, 2013).

Para a avaliação da presença de antimicrobianos tem sido amplamente utilizado o “kit” comercial de inibição da multiplicação bacteriana em meio de cultivo específico (DelvotestTM - Food Specialties Dairy Ingredients – Holanda) em virtude da praticidade e capacidade de identificar grande quantidade de princípios ativos. Este tipo de teste consiste na observação da capacidade de multiplicação “in vitro” do *Bacillus stearothermophilus* na presença de resíduos de antimicrobianos no leite (KUKUROVA e HOZOVA, 2003).

Ao contrário dos testes imunológicos, que empregam anticorpos específicos para detectar um antimicrobiano particular, alguns testes usam receptores específicos que detectam várias classes de substâncias antimicrobianas (MOTTA et al., 2015). Como exemplo, pode ser citado SNAP (Idexx Laboratories, EUA), que é um teste enzimático, com receptor específico no qual beta-lactâmicos são capturados por uma proteína em um suporte plástico (FONSECA e SANTOS, 2007). Dentre os principais antimicrobianos administrados ao rebanho leiteiro, encontram-se os beta-lactâmicos, os quais são representados principalmente pelas penicilinas e cefalosporinas, os aminoglicosídeos, o florfenicol, as tetraciclinas e os macrolídeos (RADOSTITS et al., 2007; RIBEIRO, 2008; MARTIN, 2011).

Estudo realizado no Brasil aponta o grupo dos beta-lactâmicos como o mais difundido entre os antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções em vacas leiteiras na região Sul do País, representando 38,22% do total de fármacos, seguido de aminoglicosídeos (25,19%), tetraciclina (15,41%), macrolídeos (7,59%) e cefalosporinas (4,19%) [NETO et al. 2015]. Estudos acerca das classes de antimicrobianos mais frequentemente utilizados pelos produtores de leite são importantes à medida que poderiam auxiliar na sua detecção pelos órgãos fiscalizadores, no intuito de se combater o uso indiscriminado desses princípios ativos (MARTIN et al., 2011).

A Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2012) exige o monitoramento mensal da presença de resíduos de antimicrobianos no leite bovino, cuja responsabilidade é das indústrias. As análises devem ser realizadas somente por laboratórios oficiais ou credenciados do MAPA (BRASIL, 2012). O conhecimento da exposição da população a esses compostos é de fundamental importância para nortear as ações de controle visando à proteção do consumidor (MARTIN, 2011).

Em virtude da baixa eficácia terapêutica da mastite subclínica bovina por estafilococos na lactação e de reduzido número de estudos nesta modalidade de tratamento com o ceftiofur por período estendido, particularmente, em primíparas o presente estudo pretende investigar a eficácia da cura bacteriológica do ceftiofur no tratamento intramamário estendido de primíparas bovinas com mastite subclínica, naturalmente infectadas por estafilococos, bem como avaliar o restabelecimento da produção do leite e a redução da CCS após o tratamento.

3. HIPÓTESES DE ESTUDO

Na a literatura científica consultada, não foram encontrados estudos comparando o perfil de sensibilidade “in vitro” de estafilococos isolados de mastite em primíparas bovinas e a terapia estendida “in vivo”, no mesmo animal, utilizando o ceftiofur.

Ainda, a maioria dos estudos com tratamento estendido têm envolvido novilhas ou vacas adultas. Assim, é praticamente incipiente o conhecimento sobre a dinâmica da infecção mamária em primíparas bovinas, tratadas por período estendido.

Apesar do maior gasto com infusões intramamárias e tempo de proibição superior para o uso do leite - em razão dos resíduos do ceftiofur - espera-se que a terapia estendida restabeleça a qualidade e a produção de leite, reduza a CCS e apresente maiores taxas de cura bacteriológica da mastite subclínica por estafilococos em primíparas bovinas, quando comparada a animais não tratados ou com tratamento convencional.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar a eficácia do ceftiofur no tratamento intramamário estendido de primíparas bovinas com mastite subclínica por estafilococos.

4.2 Específicos

- ✓ Comparar o perfil de sensibilidade “in vitro” dos isolados diante do ceftiofur e de outros princípios ativos de antimicrobianos indicados no tratamento da mastite bovina;
- ✓ Comparar a cura microbiológica da mastite subclínica estafilocócica entre primíparas, não tratadas e tratadas, de forma estendida com o ceftiofur;
- ✓ Avaliar a redução na contagem de células somáticas e escores do CMT nos animais tratados de forma estendida;
- ✓ Detectar a presença de resíduos de antimicrobianos no leite dos animais com mastite subclínica em diferentes tempos (em dias) após a terapia estendida;
- ✓ Investigar a influência da redução do leite entre primíparas, com e sem mastite subclínica por estafilococos, tratadas ou não de modo estendido com o ceftiofur.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Delineamento experimental

Foi investigada a cura bacteriológica, a contagem de células somáticas (CCS), a presença de resíduos de antimicrobianos e o restabelecimento da produção do leite após o tratamento intramamário estendido, em primíparas bovinas com mastite subclínica naturalmente infectadas, utilizando o cloridrato de ceftiofur¹.

5.2 Animais

Foram utilizadas 60 primíparas, da raça holandesa, entre 3 a 5 anos de idade, com lactação entre 15 e 200 dias, provenientes de rebanhos com média diária igual ou superior a 15 litros/dia, criados em sistema de pastejo rotacionado, diagnosticadas com mastite subclínica naturalmente infectadas por estafilococos e que não receberam tratamento prévio no decorrer da lactação com outros antimicrobianos. Os animais foram provenientes de criatórios com ordenha mecânica, as quais foram selecionadas entre cerca de 880 primíparas em lactação, procedentes de 15 propriedades leiteiras do município de Dois Vizinhos, região Sudoeste do Estado do Paraná.

5.3 Diagnóstico da mastite subclínica e clínica

A mastite subclínica foi diagnosticada pelo teste de CMT (*California Mastitis Test*), conforme metodologia descrita por Schalm e Noorlander. (1957). Os quartos mamários que apresentaram reação positiva nos escores 2+ ou 3+ foram submetidos à colheita de leite para o diagnóstico microbiológico.

O diagnóstico da mastite clínica foi procedido ao longo do acompanhamento dos animais do estudo. A mastite clínica foi diagnosticada utilizando o teste da caneca telada de fundo escuro (teste de Tamis), que possibilita a visualização de alterações macroscópicas no leite (grumos, pus, sangue, dessora).

Animais com alterações na glândula (nódulos, edema, fístulas, congestão, abscessos) e/ou sinais sistêmicos (febre, taquicardia, dificuldade respiratória, inapetência, anorexia, diminuição dos movimentos ruminais) foram considerados acometidos por mastite clínica com sinais sistêmicos e excluídos do estudo.

¹SpectramastTM – 125mg/10ml - Pfizer Saúde Animal, São Paulo, SP

5.4 Colheita de amostras de leite

Amostras de leite obtidas exclusivamente das primíparas com mastite subclínica foram colhidas após desinfecção do canal do teto com solução de iodopovidona (2%), secagem com papel toalha descartável e eliminação dos primeiros jatos de leite. O leite (5mL) foi colhido em tubos estéreis com tampa de rosca, imediatamente refrigerado (4-8C°) e encaminhado para o cultivo microbiológico. As amostras foram colhidas entre janeiro de 2013 a junho de 2015.

5.5 Grupos de tratamento

Foram constituídos quatro grupos (G1, G2, G3 e G4) de fêmeas bovinas para a avaliação do tratamento da mastite subclínica, como segue:

G1 (grupo negativo): 15 primíparas com CMT negativo, isolamento microbiológico negativo e CCS < 200.000 células/mL;

G2 (grupo positivo não tratado): 15 primíparas com CMT positivo (2+ ou 3+), isolamento positivo de estafilococos e CSS > 200.000 células/mL, não tratados com ceftiofur;

G3 (grupo positivo tratado no início da lactação): 15 primíparas com CMT positivo (2+ ou 3+), isolamento positivo de estafilococos e CCS > 200.000 células/mL, com lactação entre 15 a 100 dias, submetidas ao tratamento intramamário estendido com ceftiofur por cinco dias, com aplicação a cada 12 horas;

G4 (grupo positivo tratado no meio da lactação): 15 primíparas com CMT positivo (2+ ou 3+), isolamento positivo de estafilococos e CCS > 200.000 células/mL, com lactação entre 101 a 200 dias, submetidas ao tratamento intramamário estendido com ceftiofur por cinco dias, com aplicação a cada 12 horas.

Foi considerado para a constituição dos grupos somente um quarto mamário por animal. Com efeito, cada quarto mamário foi considerado uma unidade animal, perfazendo 60 animais para a formação dos quatro grupos.

5.6. Protocolo de tratamento intramamário estendido

O tratamento intramamário foi realizado respeitando condições adequadas de antissepsia. Foi instituído 7 dias após o isolamento de estafilococos nas amostras de leite das primíparas com mastite subclínica, após comprovada a sensibilidade “in vitro” do

isolado diante do ceftiofur. Todos os animais tratados que permanecerem na composição dos grupos de tratamento (G3 e G4) apresentaram, obrigatoriamente, isolados de estafilococos sensíveis “in vitro” ao ceftiofur.

Os animais dos grupos G3 e G4 receberam o tratamento intramamário a cada 12 horas, por cinco dias consecutivos, totalizando dez aplicações do antimastítico a base de ceftiofur.

O estudo foi dividido em cinco momentos (M) denominados M0, M1, M2, M3 e M4, a saber:

M0 ou dia zero = diagnóstico da mastite subclínica e isolamento de estafilococos sensíveis “in vitro” ao ceftiofur;

M1 = 7 dias após o diagnóstico da mastite subclínica e início da terapia estendida;

M2 = 2 dias após o término do tratamento estendido (correspondendo ao dia 14 após o da mastite subclínica);

M3 = 7 dias após M2 (correspondendo ao dia 21 após o diagnóstico da mastite ou 9 dias após o final do tratamento);

M4 = 7 dias após M3 correspondendo ao dia 28 após o diagnóstico da mastite ou 16 dias após o final do tratamento.

Em todos os momentos os animais foram submetidos à mensuração do volume de leite produzido, avaliação do CMT, teste da caneca telada de fundo escuro, isolamento microbiológico e identificação de micro-organismos, presença de substâncias inibidoras do crescimento microbiano (resíduos de antimicrobianos) e a quantificação da CCS. A aferição do volume de leite produzido foi realizada a partir de mensurador acoplado ao conjunto de ordenha. Assim, não foi possível avaliar a produção individual por quarto mamário, sendo considerada a produção total do animal, somada a produção da primeira e segunda ordenha do dia em estudo.

5.7 Isolamento e caracterização fenotípica dos estafilococos

As amostras de leite dos animais com mastite subclínica foram colhidas assepticamente de todos os animais, nos quatro grupos, ao longo de todos os momentos do estudo (M0, M1, M2, M3 e M4). Todas as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Diagnóstico Microbiológico da União de Ensino do Sudoeste do Paraná, UNISEP/Campus Dois Vizinhos, PR. Em seguida, foram semeadas nos meios de ágar suplementado com sangue bovino desfibrinado (5%) e ágar MacConkey, mantidos a

37°C, em condições de aerobiose. As culturas foram avaliadas com 24, 48 e 72 horas de incubação e os micro-organismos identificados segundo as características morfotintoriais, bioquímicas e de cultivo (QUINN et al., 2011).

As colônias bacterianas sugestivas do gênero *Staphylococcus* foram coradas pelo método de Gram com o objetivo de visualizar a morfologia e características tintoriais. Colônias com cocos gram positivos, agrupados em forma de “cachode-uva”, foram submetidos às provas de catalase, coagulase, *manitol salt agar* e prova da Dnase (TRABULSI et al., 2002; QUINN et al., 2011). Para diferenciação de estafilococos coagulase positiva (ECP) e coagulase negativa (ECN) foi realizada a prova da coagulase em tubos (WINN JUNIOR et al., 2008; QUINN et al., 2011).

5.8 Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”

Todos os estafilococos isolados dos animais com mastite subclínica nos grupos positivos (G2, G3 e G4), especialmente no M0, foram submetidos ao teste de sensibilidade microbiana “in vitro” (antibiograma) pelo método de difusão com discos (BAUER et al., 1966). Os resultados do perfil de sensibilidade microbiana “in vitro” foram avaliados segundo o *Clinical Laboratory Standard Institute* - CLSI (CLSI, 2013).

A sensibilidade “in vitro”, da totalidade dos isolados foi avaliada diante do cloridrato de cefitiofur (30µg), cefoperazona sódica (75µg), gentamicina (10µg), ciprofloxacino (5µg), cloxacilina (25µg), tetraciclina (15µg), penicilina (40µg), cefalexina (25µg) e oxacilina (1µg).

Foram utilizados no estudo princípios ativos de antimicrobianos frequentemente recomendados para o tratamento intramamário da mastite em vacas em lactação no Brasil e/ou disponíveis comercialmente no país, com especial interesse de ação contra estafilococos (COSTA, 1999; SANTOS e FONSECA, 2007; RIBEIRO, 2008; LANGONI et al., 2009).

5.9 Contagem eletrônica de células somáticas

Todas as amostras de leite das primíparas bovinas colhidas nos diferentes momentos do estudo (M0, M1, M2, M3 e M4) foram acondicionadas em tubos apropriados de plástico e homogeneizadas com conservante celular de leite (bromopol), visando a CCS.

O material foi disposto em caixas apropriadas e enviado para o Laboratório de análises de alimentos da União de Ensino do Sudoeste do Paraná - UNISEP/Campus

Dois Vizinhos, PR, com a finalidade de quantificar o número de células somáticas, de acordo com as recomendações técnicas do equipamento (Somacount 500¹).

5.10 Avaliação de inibidores do crescimento de micro-organismos / resíduos de antimicrobianos no leite

A presença de resíduos de antimicrobianos foi investigada em todas as amostras de leite referentes aos momentos M0, M1, M2, M3 e M4 utilizando o *kit* comercial Delvotest^{TM2}. Paralelamente, as mesmas amostras também foram submetidas ao Snap-test^{TM3}, visando à detecção de resíduos de antimicrobianos pertencentes à classe dos beta-lactâmicos conforme as recomendações do fabricante - realizado no Laboratório de análises de alimentos da União de Ensino do Sudoeste do Paraná – UNISEP/Campus Dois Vizinhos, PR. As amostras foram mantidas congeladas (-20°C) até o processamento.

O DelvotestTM tem como princípio de ação a inibição da multiplicação do micro-organismo *Bacillus stearothermophilus* variedade *calidolactis* C953, sensível aos principais grupamentos de antimicrobianos de uso veterinário e humano. O micro-organismo está disposto em ágar, no qual 0,1mL da amostra de leite é inoculada. Em seguida, o *kit* é incubado a 64°C por três horas. Após esse período, a presença de resíduos de antimicrobianos ou inibidores do crescimento bacteriano na amostra de leite impedirá ou reduzirá a multiplicação do micro-organismo e o meio com indicador de pH permanecerá com coloração inalterada (azul), caracterizado como positivo. Na ausência de antimicrobianos detectáveis pelo teste, o micro-organismo se multiplicará acidificando o meio, alterando sua cor para amarelo, resultado considerado negativo.

Para a pesquisa específica dos antimicrobianos beta-lactâmicos no leite, preconiza-se o uso do Snap-testTM, os quais são disponibilizados em *kits* descartáveis. Os *kits* são individualizados em envelopes de alumínio lacrados e compostos por um suporte plástico, uma pipeta plástica descartável com uma linha indicadora para alíquota da amostra (45µL) e um tubo plástico com tampa, contendo um “pelet” liofilizado do conjugado com as proteínas que ligam os beta-lactâmicos. Para incubação das amostras a 45°C ± 5,0°C, um bloco aquecedor duplo (Idexx Laboratories, EEUU) foi utilizado. Os *kits* foram mantidos em temperatura de refrigeração a ±5°C, até o uso, conforme recomendações do fabricante.

¹ Somacount 500. Bentley, USA

² DelvotestTM: DSM Food Specialties Dairy Ingredients – The Netherlands.

³ Snap-testTM: Idexx Laboratories, EEUU -EUA

De acordo com a sensibilidade dos testes de triagem aprovados pelo “Food and Drug Administration” (FDA) para a pesquisa de resíduos do grupo beta-lactâmicos, a menor concentração detectada para o “Delvotest” é de 3 ppb (partes por bilhão) para penicilina, 10 ppb para ampicilina, 8 ppb para amoxicilina, 30 ppb para cloxacilina, 8 ppb para cefapirina e 50 ppb para ceftiofur, enquanto que para “ β L Snap Test” as concentrações mínimas detectadas são, respectivamente, 5 ppb, 10 ppb, 10 ppb, 50 ppb, 8 ppb e 50 ppb, respectivamente, para os antimicrobianos citados anteriormente (NMC, 2006).

5.11 Acompanhamento dos animais

Ao longo dos 28 dias de estudo, a partir do diagnóstico da infecção mamária subclínica, os animais foram monitorados quanto aos parâmetros fisiológicos, exame da glândula mamária, teste de Tamis e CMT. Os animais que apresentaram mastite clínica e/ou outras condições descritas no subitem 5.13, a destacar infecções sistêmicas, foram excluídos do estudo e outro animal foi incluído, a fim de manter o número de 15 animais/grupo.

5.12 Avaliação da cura bacteriológica

A cura bacteriológica foi considerada nos quartos mamários que não apresentaram o reisolamento dos mesmos micro-organismos identificados no M0 com 28 dias após tratamento (M4).

5.13 Critérios de exclusão de animais

Foram excluídos animais que, ao longo do estudo, apresentaram qualquer uma das seguintes condições: (1) desenvolveram sinais clínicos de mastite no leite, na glândula mamária e/ou sistêmicos descritos no subitem 5.3, (2) o isolado de estafilococos não foi sensível “*in vitro*” ao ceftiofur (parcialmente sensíveis ou resistentes), (3) animais acometidos por outras infecções que necessitaram do uso de antimicrobianos diferentes do ceftiofur e/ou uso de outros fármacos pela via parenteral, (4) impossibilidade de tratamento em qualquer momento do estudo, (5) impossibilidade de colheita de material em qualquer momento do estudo e (6) presença de resíduos de antimicrobianos no *Snap test* nos momentos M0 e M1 e (7) isolamento de qualquer agente no Grupo negativo. Com efeito, para a constituição e manutenção dos quatro grupos (G1, G2, G3 e G4), contendo

15 / animais / grupo, perfazendo 60 animais em estudo, adotando os critérios de exclusão supra citados, foi necessário o diagnóstico e o acompanhamento de 327 primíparas.

5.14 Tratamento estatístico dos resultados

Foram comparados os diferentes momentos (M0, M1, M2, M3 e M4), segundo a efetividade de cura bacteriológica do ceftiofur no tratamento estendido e a redução na CCS, utilizando o teste de Qui-quadrado (Teste de McNemar), com nível de significância $P < 0,05$ (TRIOLA, 1999; DANIEL, 2009; FIELD, 2012).

Preliminarmente, as variáveis contínuas e ordinais foram submetidas ao teste de Shapiro-Wilk para comprovação do pressuposto de normalidade dos dados, pelo qual se constatou que somente a produção de Leite em Kg/vaca/dia apresentou distribuição paramétrica. Para determinar se as médias de produção de leite diferiram entre os grupos utilizou-se, inicialmente, o teste de Levene para validação da homogeneidade de variâncias. Uma vez que o pressuposto foi negado, empregou-se a análise de variância em uma via (ANOVA *one-way*) com correção de Welch e contrastes pelo método de Games-Howell. Para determinar se as médias de produção de leite diferiram entre momentos, dentro de cada grupo, recorreu-se ao teste de análise de variância para medidas repetidas, com validação do pressuposto de esfericidade de dados pelo método de Mauchly e contrastes pelo método Sidak. Nos casos em que o pressuposto de esfericidade de dados foi violado, aplicou-se a correção de Greenhouse-Geisser. Para determinar se as contagens de células somáticas e escores de CMT diferiram entre grupos, recorreu-se ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com contrastes pelo método de Student-Newman-Keuls. Para comparar estes parâmetros entre momentos, dentro de cada grupo, empregou-se o teste não paramétrico de Friedman, com contrastes pelo método de Dunn. Todas as comparações foram conduzidas nos softwares SPSS, versão 16.0 e Biostat 5.3, adotando-se valor de 5% de significância (FIELD, 2012).

O cálculo do tamanho amostral foi realizado de acordo com Daniel (2009), determinado pela fórmula apresentada na Figura 1:

$$N = \frac{NP(1 - P)}{d^2} \times (N - 1) + P \times (1 - P) \times Z_{1-\alpha/2}^2$$

Figura 1. Fórmula utilizada para definição do universo amostral. N = tamanho da população (finita); P = prevalência estimada na população; d = margem de erro aceitável. Com base neste cálculo foi necessária a colheita de, no mínimo, 24 amostras de leite de primíparas acometidas por mastite subclínica estafilocócica no local do estudo. Os resultados obtidos foram analisados por estatística descritiva geral no programa estatístico BioStat 5.3[®], considerando intervalo de confiança de 95% e nível de significância $P < 0,05$.

5.15. Comitê de Ética e Experimentação Animal

O estudo foi executado com a aprovação no Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) da FMVZ–UNESP/Botucatu, SP (protocolo nº 37-2015), posto que não fere nenhum preceito de bem estar e experimentação animal.

6. RESULTADOS

6.1 Cura microbiológica

Os resultados referentes à cura microbiológica estão sumariados na Tabela 1. Foram evidenciadas três situações: (1) cura microbiológica com redução na CCS, (2) cura microbiológica sem redução na CCS e (3) animais não curados.

Tabela 1. Cura microbiológica e redução na contagem de células somáticas (CCS), cura microbiológica sem redução na contagem de células somáticas e animais não curados, após o tratamento intramamário estendido com cloridrato de ceftiofur, em primíparas bovinas com mastite subclínica naturalmente infectadas por estafilococos. Botucatu, SP. 2015.

Grupos de Estudo	Cura microbiológica e redução na CCS	Cura microbiológica sem redução na CCS	Animais não curados
	nº animais / total grupo (%)	nº animais / total grupo (%)	nº animais / total grupo (%)
G1	NA	NA	NA
G2	3 / 15 (20,00%) ^a	1 / 15 (6,66%)	11 / 15 (73,34%) ^a
G3	11 / 15 (73,34%) ^b	0 (%)	4 / 15 (26,66%) ^b
G4	7 / 15 (46,66%) ^c	0 (%)	8 / 15 (53,34%) ^c

p = Valores de significância para comparação entre grupos pelo teste de análise de variância, na mesma coluna, seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente. G1= Grupo negativo, G2= Grupo positivo não tratado, G3= Grupo tratado no início da lactação, G4= Grupo tratado no meio da lactação, NA = não avaliado.

A cura microbiológica com redução na CCS espontânea para a mastite subclínica causada por estafilococos pôde ser evidenciada em três animais (20%). Somente em um animal (6,66%) houve a cura microbiológica sem a redução na CCS, no grupo positivo (G2), que não recebeu nenhum tratamento antimicrobiano durante o estudo. Nos grupos submetidos ao tratamento intramamário com cloridrato de ceftiofur foi evidenciada cura microbiológica com redução na CCS em 11 animais (73,34%) no grupo tratado no início da lactação (G3) e em sete animais (46,66%) no grupo tratado no final da lactação (G4) [Tabela 1]. Assim, nos grupos tratados (G3+G4) e não tratado (G2) a taxa de cura microbiológica foi, respectivamente, 60,00% (n= 18/30) e 26,66% (n= 4/15), mostrando

resultado significativo ($P < 0,05$) entre essas variáveis. Na mesma Tabela, é possível evidenciar insucesso “*in vivo*” do ceftiofur que no presente estudo, foi de 26,66% ($n = 4/15$) para o grupo tratado no início da lactação e 53,34% ($n = 8/15$) no grupo tratado no meio da lactação, mesmo com o tratamento sendo respaldado na sensibilidade “*in vitro*” obrigatória dos isolados (antibiograma).

6.2 Cultivo Microbiológico

Foram isoladas 45 linhagens de *Staphylococcus* spp. das 300 amostras de leite colhidas de novilhas saudáveis (G1) e portadoras de mastite subclínica (G2, G3, G4) [Quadro 1]. Destas 45 linhagens de estafilococos isoladas, 41 (91,12%) foram classificadas como coagulase positivas e 4 (8,88%) coagulase negativas no teste da coagulase em tubos. Nos grupos G2, G3 e G4 foram identificados, respectivamente, 15, 12 e 14 estafilococos coagulase positivos. No grupo G3 foram identificados três isolados coagulase negativos e no G4 somente um coagulase negativo. As espécies de estafilococos coagulase positivos (ECP) e negativos (ECN) identificadas, segundo os grupos, estão sumariadas no Quadro 1.

Entre o grupo dos ECN identificou-se nas primíparas amostradas exclusivamente *S. epidermidis* em 8,88% ($n = 4/58$) amostras de leite dos animais com mastite subclínica.

Quadro 1: Distribuição das espécies de ECP e ECN identificadas no leite de primíparas bovinas, com mastite subclínica, naturalmente infectadas. Botucatu, SP, 2015.

Espécies de estafilococos	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Total de linhagens
	nº linhagens / total de linhagens (%)	nº linhagens / total de linhagens (%)	nº linhagens / total de linhagens (%)	
ECP	15/15 (100,0%)	12/15 (80,0%)	14/15 (93,33%)	41/45(91,12%)
<i>S. intermedius</i>	8/15 (53,33%)	8/15 (53,33%)	2/15 (13,33)	18/45 (40,0%) ^a
<i>S. aureus</i>	7/15 (46,67%)	4/15 (26,66%)	12/15 (80,0%)	23/45 (51,11%) ^a
ECN	(0/15) -	3/15 (20,0%)	1/15 (6,66%)	4/45 (8,88%)
<i>S. epidermidis</i>	(0/15) -	3/15 (20,0%)	1/15 (6,66%)	4/45 (8,88%) ^b
TOTAL DE LINHAGENS	15/15 (100,0%)	15/15 (100,0%)	15/15 (100,0%)	45/45 (100,0%)

ECP = Estafilococos coagulase positivo; ECN = Estafilococos coagulase negativo; nº = número; S. = *Staphylococcus*. Grupo 1 não incluso por se tratar do controle negativo (animais com isolamento microbiológico negativo). Valores de significância para comparação entre grupos pelo teste de análise de variância na mesma coluna, seguidas de letras minúsculas diferentes, diferem estatisticamente.

6.3 Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”

No perfil de sensibilidade microbiana - na prova de difusão com discos - as linhagens de estafilococos isoladas das primíparas com mastite subclínica apresentaram maior sensibilidade para oxacilina (80,0%), ceftiofur (77,78%) e cefalexina (77,78%), seguidas por ciprofloxacino (66,66%), cefoperazona (60,00%) e gentamicina (60,0%) [Tabela 2].

Em contraste, cloxacilina (24,44%), penicilina (35,56%) e tetraciclina (44,46) foram os antimicrobianos menos efetivos frente aos estafilococos isolados no presente estudo (Tabela 2).

Tabela 2. Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, na prova de difusão com discos, em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de primíparas bovinas com mastite subclínica Botucatu, SP, 2015.

Antimicrobiano	Sensível	Parcialmente Sensível	Resistente
	nº isolados/nº de sensíveis (%)	nº isolados/nº de parcialmente sensíveis (%)	nº isolados/nº de resistentes (%)
Oxacilina	36/45 (80,0%) ^a	7/45 (15,55%) ^a	2/45 (4,45%) ^a
Ceftiofur*	35/45 (77,78%) ^a	5/45 (11,11%) ^a	3/45 (6,65%) ^a
Cefalexina	35/45 (77,78%) ^a	7/45 (15,55%) ^a	3/45 (6,65%) ^a
Ciprofloxacino	30/45 (66,66%) ^b	10/45 (22,22%) ^a	5/45 (11,12%) ^b
Cefoperazona	27/45 (60,0%) ^b	12/45 (26,67%) ^b	6/45 (13,33%) ^b
Gentamicina	27/45 (60,0%) ^b	11/45 (24,44%) ^b	7/45 (15,56%) ^b
Tetraciclina	20/45 (44,46%) ^c	11/45 (24,44%) ^b	14/45 (31,10%) ^c
Penicilina	16/45 (35,56%) ^d	10/45 (22,22%) ^b	19/45 (42,22%) ^c
Cloxacilina	11/45 (24,44%) ^e	14/45 (31,11%) ^c	20/45 (44,45%) ^c

*As linhagens parcialmente sensíveis e resistentes nesta tabela fazem parte do G2 (controle positivo sem tratamento), posto que, para serem incluídas nos grupos G3 (tratamento no início da lactação) e G4 (tratamento no meio da lactação), a sensibilidade diante do ceftiofur era pré-requisito. p = Valores de significância para comparação entre grupos pelo teste de análise de variância na mesma coluna, seguidas de letras minúsculas diferentes, diferem estatisticamente.

No presente estudo, os isolados foram pouco resistentes aos antimicrobianos pertencentes à classe das cefalosporinas. Particularmente para o ceftiofur foi identificado somente 11,11% de isolados parcialmente sensíveis e 6,65% resistentes (Tabela 2).

Foi observada multirresistência para três ou mais antimicrobianos em 5/15 (33,33%), 3/15 (20,0%), 3/15 (20,0%) linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas, respectivamente, nos grupos G2, G3 e G4, o que representa 28,88% (n= 13/45) de todos os isolados estudados. Também foi possível observar que nenhum isolado foi sensível a todos antimicrobianos testados, ainda que o estudo tenha sido conduzido em primíparas.

6.4 Detecção de resíduos e/ou substâncias inibidoras do crescimento microbiano

Do total de 60 amostras de leite colhidas no momento 0 (M0), 8 (13,33%) foram positivas para o teste de detecção de substâncias inibidoras do crescimento bacteriano na prova de Delvotest™, das quais 2/15 (13,33%) no grupo G1, 2/15 (13,33%) no G2, 2/15 (13,33%) no G3 e 2/15 (13,33%) no G4. Em contrapartida, todas as amostras mostraram-se negativas para substâncias inibidoras ao Snap test™. Esse mesmo resultado também foi observado no M1 (Quadro 2).

Quadro 2. Detecção de resíduos de antimicrobianos e/ou substâncias inibidoras do crescimento bacteriano - utilizando testes comerciais - no leite de primíparas bovinas com e sem de mastite subclínica por estafilococos, segundo diferentes momentos, após o tratamento estendido com ceftiofur por via intramamária. Botucatu, SP, 2015.

	G1*		G2		G3		G4		Total de positivos	
	Delvo test™	Snap test™	Delvo test™	Snap test™	Delvo test™	Snap test™	Delvo test™	Snap test™	Delvo test™	Snap test™
M0**	13,33% (2/15)	- (0/15)	13,33% (2/15)	- (0/15)	13,33% (2/15)	- (0/15)	13,33% (2/15)	- (0/15)	13,33% (8/60)	- (0/60)
M1	13,33% (2/15)	- (0/15)	13,33% (2/15)	- (0/15)	13,33% (2/15)	- (0/15)	13,33% (2/15)	- (0/15)	13,33% (8/60)	- (0/60)
M2	13,33% (2/15)	- (0/15)	13,33% (2/15)	6,66% (1/15)	93,33% (14/15)	93,33% (14/15)	100,0% (15/15)	86,66% (13/15)	55,00% (33/60)	46,66% (28/60)
M3	13,33% (2/15)	6,66% (1/15)	20,0% (3/15)	6,66% (1/15)	20,0% (3/15)	13,33% (2/15)	13,33% (2/15)	20,0% (3/15)	16,66% (10/60)	11,66% (7/60)
M4	13,33% (2/15)	6,66% (1/15)	20,0% (3/15)	13,33% (2/15)	6,66% (1/15)	13,33% (2/15)	6,66% (1/15)	6,66% (1/15)	11,66% (7/60)	10,00% (6/60)

*G1= Grupo negativo, G2= Grupo positivo não tratado, G3= Grupo tratado no início da lactação, G4= Grupo tratado no meio da lactação, **M0 ou dia zero = diagnóstico da mastite subclínica e isolamento de estafilococos, M1= 7 dias após o diagnóstico da mastite subclínica e início da terapia expandida, M2= 2 dias após o término do tratamento estendido (correspondendo ao dia 14 após o diagnóstico da mastite subclínica), M3= 7 dias após M2 (correspondendo ao dia 21 após o diagnóstico da mastite ou 9 dias após o final do tratamento), M4= 7 dias após M3 (correspondendo ao dia 28 após o diagnóstico da mastite ou 16 dias após o final do tratamento).

Das 60 amostras de leite colhidas no M2 (2 dias após o final do tratamento), 33 (55,0%) foram positivas no Delvotest™, das quais 2/15 (13,33%) no G1, 2/15 (13,33%) no G2, 14/15 (93,33%) no G3 e 15/15 (100,0%) no G4. Neste mesmo momento (M2) o Snap test™ detectou 28 (46,66%) amostras positivas, das quais 1/15 (6,66%) no G2, 14/15 (93,33%) no G3 e 13/15 (86,66%) no G4. Todas as amostras do G1 mostraram-se negativas.

No M3 (9 dias após final do tratamento), entre as 60 amostras 10 (16,66%) foram positivas no Delvotest™, das quais 2/15 (13,33%) no G1, 3/15 (20,0%) no G2, 3/15 (20,0%) no G3 e 2/15 (13,33%) no G4. Paralelamente, no mesmo momento (M3), o Snap test™ identificou 7 (11,66%) amostras positivas, das quais 1/15 (6,66%) no G1, 1/15 (6,66%) no G2, 2/15 (13,33%) no G3 e 3/15 (20,0%) no G4.

Do total de 60 amostras de leite colhidas no momento M4 (16 dias após o final do tratamento), 7 (11,66%) acusaram reações positivas no Delvotest™, das quais 2/15 (13,33%) no G1, 3/15 (20,0%) no G2, 1/15 (6,66%) no G3 e 1/15 (6,66%) no G4. No mesmo momento (M4), o Snap test™ acusou 6 (10,00%) amostras positivas, das quais 1/15 (6,66%) no G1, 2/15 (13,33%) no G2, 2/15 (13,33%) no G3 e 1/15 (6,66%) no G4.

O uso destas duas técnicas em paralelo revelou que o ceftiofur, quando administrado pela via intramamária, ainda apresenta resíduos do produto na maioria dos animais dois dias após o término do tratamento (M2), visto que nos grupos G3 e G4 foram detectadas a presença de animais positivos em, respectivamente, 96,66% para o Delvotest™ e 90,0% para o Snap test™.

No M3 (transcorridos sete dias do final do tratamento) foi observado que 16,66% dos animais acusavam resultados positivos em ambos os testes de detecção de substâncias inibidoras da multiplicação bacteriana. No M4 (16 dias após o final do tratamento), 6,66% dos animais ainda foram positivos no Delvotest™ e 10% no Snap test™, considerando somente os 30 animais que foram submetidos ao tratamento intramamário.

6.5 Contagem de células somáticas (CCS) e Escores de CMT

Os resultados de CCS e os escores de CMT dos animais do presente estudo que tiveram cura microbiológica estão resumidos nas Tabelas 3 e 4, Quadros 3 e 4 (Anexos) e Figuras 2, 3 e 4.

Tabela 3. Valor mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e desvios padrões da contagem de células somáticas* no leite de primíparas bovinas, com e sem mastite subclínica por estafilococos, segundo a distribuição por grupos. Botucatu, SP, 2015.

CCS x10 ³ cél/mL	Mín.	P25	Med.	Média	P75	Máx.	Desvio Padrão
G1	5,0	38,0	66,0 ^a	74,4 ^a	98,0	199,0	48,5
G2	543,0	1.249,0	1987,0 ^b	2.235,0 ^b	2.987,0	5.647,0	1.219,3
G3	241,0	777,0	1320,0 ^c	1,620,0 ^c	2.200,0	5.210,0	1107,1
G4	211,0	875,0	1234,0 ^c	1,659,0 ^c	2.237,0	5.832,0	1197,0

Mín = mínimo, P25 = percentil 25, P75 = percentil 75, Med. = mediana, Max = máximo, CCS = contagem de células somática, cél/mL = células/mL, p = Valores de significância para comparação entre grupos pelo teste de análise de variância em uma mesma coluna, seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente. G1 = Grupo negativo, G2 = Grupo positivo não tratado, G3 = Grupo tratado início da lactação, G4 = Grupo tratado no meio da lactação.

*Valor de referência da CCS do leite para fêmeas bovinas saudáveis = 200.000 cél/mL.

Foi observada associação estatisticamente significativa para as medianas da CCS entre os grupos G1 (negativo), e os grupos G2, G3 e G4 (positivos para estafilococos), visto que o G1 apresentou valores considerados normais de celularidade do leite (66.000 células/mL), enquanto os animais dos grupos G2 (1.987.000 células/mL), G3 (1.320.000 células/mL) e G4 (1.234.000 células/mL), acusaram valores elevados, considerando 200.000 células somáticas/mL como valor de referência de fêmeas bovinas saudáveis (Tabela 3).

As medianas observadas para a CCS (células/mL) segundo os diferentes momentos das colheitas estão sumariadas na Tabela 4. Foi possível observar redução significativa na CCS comparando os animais tratados com ceftiofur (G3 e G4) e os não tratados (G1 e G2).

Tabela 4. Valor mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e desvios padrões da contagem de células somáticas no leite* de primíparas bovinas, com e sem mastite subclínica por estafilococos, segundo a distribuição por momentos. Botucatu, SP, 2015.

CCS x 10 ³ células /mL	Mín.	P25	Med.	Média	P75	Máx.	Desvio Padrão
M0	11,0	266,0	1.288,0 ^a	1.568,3 ^a	2.178,0	5.832,0	1.395,7
M1	5,0	261,7	1.386,0 ^a	1.577,4 ^a	2.177,0	5.132,0	1.336,9
M2	17,0	273,7	987,0 ^b	1.336,7 ^a	2.002,0	4.123,0	1.155,7
M3	17,0	258,7	839,0 ^b	1.301,6 ^a	1.964,0	5.647,0	1.295,1
M4	32,0	202,0	605,0 ^c	1.198,6 ^a	2070,2	4.678,0	1.273,9

Mín = mínimo, P25 = percentil 25, P75 = percentil 75, Med. = mediana, Max = máximo, CCS = Contagem de Células Somáticas, células/mL = células/mililitro. p = Valores de significância para comparação entre grupos pelo teste de análise de variância em uma via a mesma coluna, seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente.*M0 ou dia zero = diagnóstico da mastite subclínica e isolamento de estafilococos, M1= 7 dias após o diagnóstico da mastite subclínica e início da terapia estendida, M2= 2 dias após o término do tratamento estendido (correspondendo ao dia 14 após o diagnóstico da mastite subclínica), M3= 7 dias após M2 (correspondendo ao dia 21 após o diagnóstico da mastite ou 9 dias após o final do tratamento), M4= 7 dias após M3 (correspondendo ao dia 28 após o diagnóstico da mastite ou 16 dias após o final do tratamento). A avaliação dos momentos correspondeu a soma de todos os grupos.

* Valor de referência da CCS do leite para fêmeas bovinas saudáveis = 200.000 células/mL

O Quadro 3 e Figuras 2, 3 e 4 resumiam os resultados de variação nas medianas da CCS, antes e pós-tratamento estendido.

Quadro 3. Valores da CCS* em primíparas bovinas com mastite subclínica estafilocócica segundo reação no CMT, cura microbiológica espontânea e resposta na terapia intramamária estendida com ceftiofur. Botucatu, SP, 2015.

Animal	G2 CCS x 10 ³ células/mL		G2 Escore CMT		G3 CCS x 10 ³ células/mL		G3 Escore CMT		G4 CCS x 10 ³ células/mL		G4 Escore CMT	
	M0	M4	M0	M4	M0	M4	M0	M4	M0	M4	M0	M4
1	2345	987	3+	3+	1666	543	3+	2+	4312	888	3+	3+
2	1765	765	3+	2+	5210	9873	3+	3+	900	421	2+	2+
3	1654	655	3+	2+	1111	342	3+	1+	1345	521	3+	2+
4	899	543	2+	2+	2981	1010	3+	3+	1341	277	3+	1+
5	-	-	-	-	1234	301	3+	1+	987	211	2+	1+
6	-	-	-	-	777	265	2+	1+	787	376	2+	1+
7	-	-	-	-	1890	287	3+	1+	698	555	2+	2+
8	-	-	-	-	2109	543	3+	2+	-	-	-	-
9	-	-	-	-	2870	657	3+	1+	-	-	-	-
10	-	-	-	-	909	241	2+	2+	-	-	-	-
11	-	-	-	-	1008	241	3+	2+	-	-	-	-
Mediana CCS x10 ³ células/mL (exclusiva para os animais curados)	1709 ^a	710 ^b			1666 ^a	417 ^c			987 ^b	398 ^c		

CCS = Contagem de Células Somáticas, células/mL = células/mililitro, G1 = Grupo negativo, G2 = Grupo positivo não tratado, G3 = Grupo tratado no início da lactação, G4 = Grupo tratado no final da lactação, M0 ou dia zero = diagnóstico da mastite subclínica e isolamento de estafilococos, M4 = 7 dias após M3 (correspondendo ao dia 28 após o diagnóstico da mastite ou 16 dias após o final do tratamento). Mediana CCSx10³ células/mL exclusivamente para os animais que obtiveram cura microbiológica espontânea no grupo (G2) e/ou cura após terapia estendida nos grupos G3 e G4. p = Valores de significância para comparação entre grupos pelo teste de análise de variância em uma via a mesma coluna, seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente.

*Valor de referência da CCS do leite para fêmeas bovinas saudáveis = 200.000 células/mL

No presente estudo foi observada redução dos escores de CMT nos animais curados da mastite por estafilococos utilizando a terapia estendida (Quadro 3).

No Quadro 3 e Figura 3 é possível observar que, nos grupos tratados (G3 e G4), houve redução significativa da celularidade, bem como do escore do CMT, quando comparados os momentos M0 e M4. De maneira similar, no grupo não tratado (G2), também se observou redução da celularidade e dos escores do CMT nos animais que obtiveram cura microbiológica espontânea, conforme a comparação entre os momentos M0 e M4. No presente estudo foi observada redução nos escores de CMT nos animais curados de mastite por estafilococos utilizando a terapia estendida (Quadro 3)

A Figura 2 ilustra a queda gradual da celularidade no leite das vacas com mastite subclínica por estafilococos, não tratadas com ceftiofur, ao longo de 28 dias após o diagnóstico do patógeno.

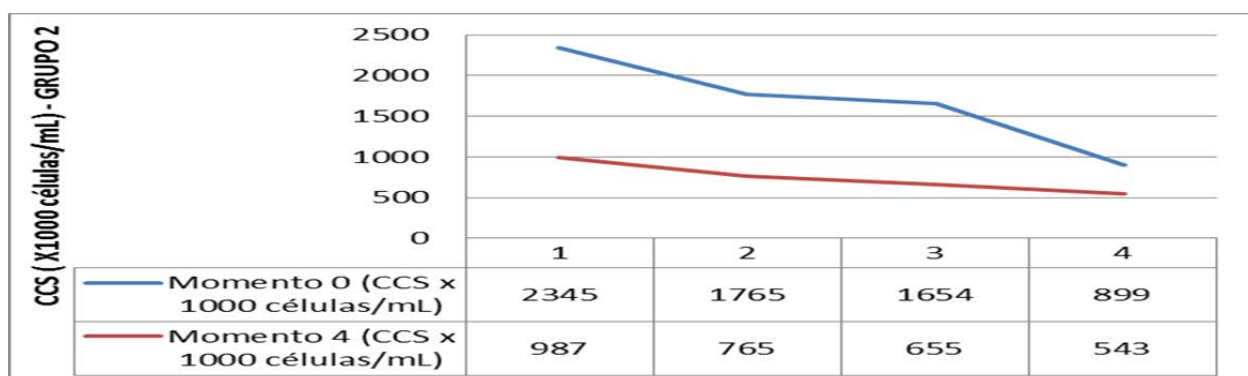


Figura 2. Medianas da contagem de células somáticas em primíparas bovinas que obtiveram cura microbiológica espontânea no G2, com diagnóstico e isolamento de estafilococos (Momento 0) e após 28 dias (Momento 4) mostraram-se com isolamento negativo. Botucatu, SP, 2015.

G2 = animais com mastite subclínica por estafilococos sem tratamento estendido

1, 2, 3 e 4 correspondem a identificação numérica dos animais que obtiveram cura espontânea dentre todos os animais amostrados no G2

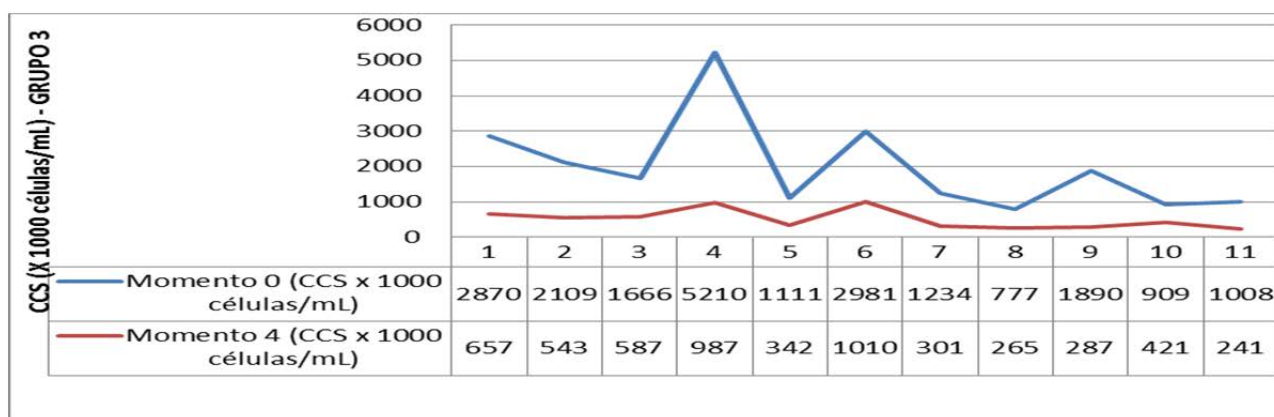


Figura 3. Medianas da contagem de células somáticas em primíparas bovinas que obtiveram cura microbiológica após tratamento intramamário estendido, no início da lactação G3, com diagnóstico e isolamento de estafilococos (Momento 0) e após 28 dias (Momento 4) mostraram-se com isolamento negativo. Botucatu, SP, 2015.

G3 = animais com mastite subclínica por estafilococos com tratamento intramamário estendido com ceftiofur no início da lactação.

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 correspondem a identificação numérica dos animais que obtiveram cura microbiológica pós o tratamento dentre todos os animais amostrados no G3.

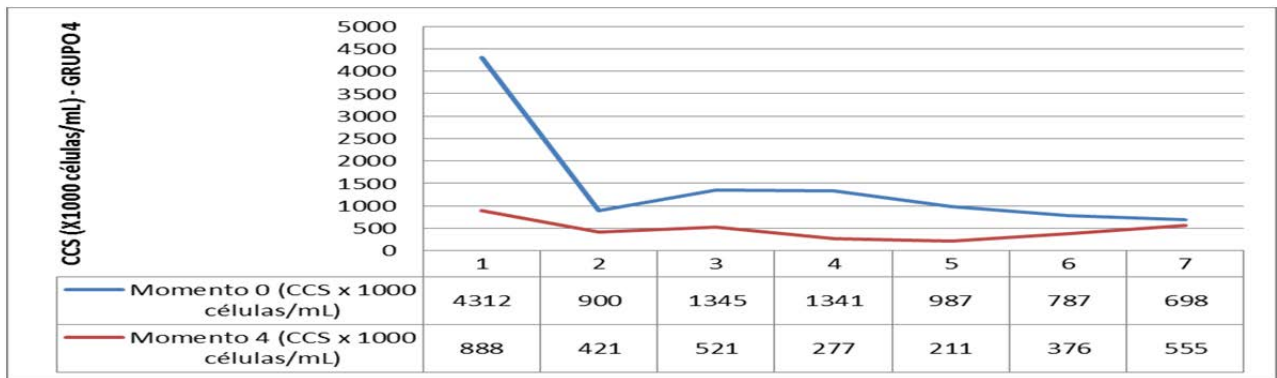


Figura 4. Medianas da contagem de células somáticas em primíparas bovinas que obtiveram cura microbiológica após o tratamento intramamário estendido, no meio da lactação G4, com diagnóstico e isolamento de estafilococos (Momento 0) e após 28 dias (Momento 4) mostraram-se com isolamento negativo. Botucatu, SP, 2015.

G4 = animais com mastite subclínica por estafilococos com tratamento intramamário estendido com ceftiofur no meio da lactação.

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 correspondem a identificação numérica dos animais que obtiveram cura microbiológica pós tratamento dentre todos os animais amostrados no G4.

6.6 Produção de leite

Os dados referentes à produção de leite (Kg/animal/dia) estão agrupados no Quadro 4 e Figura 5.

Quadro 4. Valores de produção de leite em litros/animal expressos como média $\pm$ desvio padrão em quatro grupos experimentais avaliados em cinco diferentes momentos em primíparas bovinas, com e sem mastite estafilocócica após terapia estendida com ceftiofur. Botucatu, SP, 2015.

Grupo	Momentos					P*
	M0	M1	M2	M3	M4	
Negativo (não infectado)	15,6 $\pm$ 0,61 (Aa)	16,35 $\pm$ 0,66 (Ab)	15,58 $\pm$ 0,59 (Aa)	15,76 $\pm$ 0,67 (Aac)	14,8 $\pm$ 0,96 (Aa)	<0,001
Positivo (infectado) não tratado	14,41 $\pm$ 1,63 (Aba)	14,51 $\pm$ 1,78 (Ba)	13,27 $\pm$ 1,67 (Bbc)	12,70 $\pm$ 1,95 (Bc)	12,12 $\pm$ 2,14 (Bc)	<0,001
Tratado no início da lactação	13,45 $\pm$ 1,47 (Ba)	15,66 $\pm$ 0,45 (Bb)	13,27 $\pm$ 1,68 (Ba)	14,16 $\pm$ 1,77 (Bab)	14,46 $\pm$ 2,15 (Aab)	<0,001
Tratado no meio da lactação	13,74 $\pm$ 1,23 (Ba)	15,46 $\pm$ 0,78 (Bb)	12,79 $\pm$ 1,19 (Ba)	13,2 $\pm$ 1,35 (Ba)	13,10 $\pm$ 2,23 (Aba)	<0,001
p**	< 0,001	0,001	< 0,001	< 0,001	0,001	-

p* = Valores de significância para comparação entre momentos pelo teste de análise de variância para medidas repetidas; p** = Valores de significância para comparação entre grupos pelo teste de análise de variância em uma via; Médias na mesma coluna, seguidas de letras maiúsculas diferentes diferem estatisticamente; Médias na mesma linha, seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente. M0 ou dia zero = diagnóstico da mastite subclínica e isolamento de estafilococos, M1 = 7 dias após o diagnóstico da mastite subclínica e início da terapia expandida, M2 = 2 dias após o término do tratamento estendido (correspondendo ao dia 14 após o diagnóstico da mastite subclínica), M3 = 7 dias após M2 (correspondendo ao dia 21 após o diagnóstico da mastite ou 9 dias após o final do tratamento), M4 = 7 dias após M3 (correspondendo ao dia 28 após o diagnóstico da mastite ou 16 dias após o final do tratamento).

A avaliação na produção de leite em primíparas bovinas com mastite subclínica tratadas por período estendido, no presente estudo, necessitou do desenvolvimento de modelo matemático estatístico, disposto de maneira sintética no Quadro (4). Estes valores revelaram associação significativa na comparação entre todos os grupos e entre todos os momentos. Esses resultados mostraram que o volume de leite diário reduziu nos animais com mastite subclínica por estafilococos.

Foi possível identificar resultados significativos para a produção de leite no M0, confirmando que o grupo1 (G1) constituído por animais não infectados por estafilococos ou primíparas bovinas saudáveis (negativo), produziu a maior média 15,6 (Kg/leite/dia). Em contraste, os demais grupos produziram menores volumes diários, visto que, o grupo 2 (G2) constituído por animais infectados não tratados produziu 14,41 (Kg/leite/dia), o grupo 3 (G3) formado por animais infectados e tratados no início da lactação produziu 13,45 (Kg/leite/dia) e o grupo 4 (G4) infectados e tratados no meio do período de lactação produziu (G4) 13,74 (Kg/leite/dia).

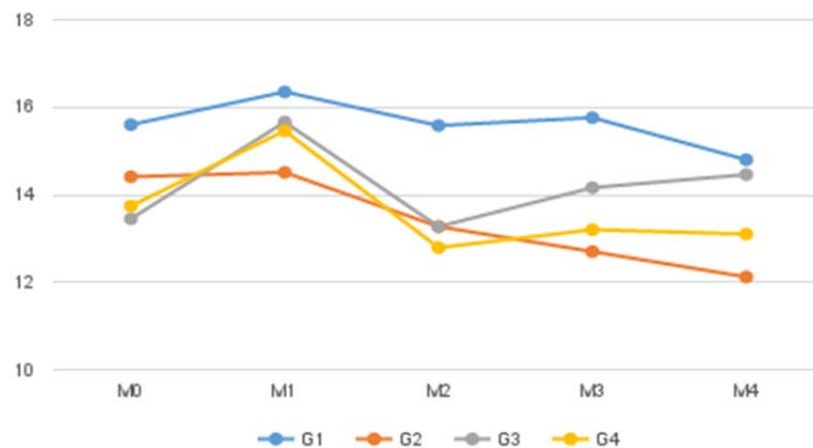


Figura 5. Produção de leite em litros/animal expressos como média em quatro grupos experimentais avaliados em cinco diferentes momentos (M0, M1, M2, M3, M4), em primíparas bovinas com e sem mastite estafilocócica tratadas de modo estendido com ceftiofur. Botucatu, SP, 2015.

G1 = Grupo negativo, G2 = Grupo positivo não tratado, G3 = Grupo tratado no início da lactação, G4 = Grupo tratado no meio da lactação. M0 ou dia zero = diagnóstico da mastite subclínica e isolamento de estafilococos, M1 = 7 dias após o diagnóstico da mastite subclínica e início da terapia expandida, M2 = 2 dias após o término do tratamento estendido (correspondendo ao dia 14 após o diagnóstico da mastite subclínica), M3 = 7 dias após M2 (correspondendo ao dia 21 após o diagnóstico da mastite ou 9 dias após o final do tratamento), M4 = 7 dias após M3 (correspondendo ao dia 28 após o diagnóstico da mastite ou 16 dias após o final do tratamento).

7. DISCUSSÃO

7.1 Cura microbiológica

O tratamento da mastite subclínica por *Staphylococcus* sp. tem sido objeto de vários estudos iniciados na década de 1980 (NADER FILHO et al., 2002; BARKEMA et al., 2006; ROY et al., 2009). Assim, várias alternativas terapêuticas com base no uso de antimicrobianos foram recomendadas, incluindo terapia intramamária convencional, terapia estendida, terapia sistêmica e terapia sistêmica ou intramamária associada à vacinação (COSTA, 1999; SANTOS e FONSECA, 2007; ROY et al., 2009).

Entretanto, as taxas de cura microbiológica da mastite estafilocócica bovina têm oscilado entre 13 a 74 % dos casos, dependendo de vários fatores, que incluem a multirresistência do isolado, o princípio ativo e via de administração, período de lactação ou vaca seca, e modalidade ou tipo de tratamento (LANGONI, 1997; COSTA et al., 2000; NADER FILHO et al., 2002; PIEPERS et al., 2009). No presente estudo, os resultados de cura microbiológica reafirmam a importância da realização do cultivo e do antibiograma para avaliação do tratamento de casos de mastite bovina (RIBEIRO, 2008) incluindo em primíparas durante a lactação, pois permite atestar a ausência de isolamento do agente causal no leite depois de encerrado o tratamento, que caracteriza a cura bacteriológica (MAIOLINO et al., 2014).

A terapia estendida intramamária na lactação, utilizando 6 a 10 aplicações do antimicrobiano, tem se mostrado nos últimos anos como uma alternativa de tratamento para agentes multirresistentes aos protocolos convencionais (RIBEIRO, 2008; MAIOLINO et al., 2014), indicada particularmente para casos de mastite subclínica crônica por *S. aureus* (ROY et al., 2009) em animais de alto valor econômico. Neste estudo, em razão dos fatores de exclusão impostos - a fim de controlar o maior número de variáveis possíveis - os grupos foram constituídos por animais infectados por estafilococos incluindo *S. aureus* - posto que o isolamento exclusivamente de *S. aureus* dificultaria, sobremaneira, a formação dos grupos para a execução do estudo.

Estudos na última década têm observado também que a duração do tratamento intramamário, bem como a fase de lactação da vaca (início, meio ou final) são fatores que influenciam nas taxas de cura microbiológica da mastite subclínica por estafilococos em vacas e novilhas (BARKEMA et al., 2006; ROY et al., 2009; MIDDLETON, 2013; MAIOLINO et al., 2014). A opção pela terapia intramamária estendida em novilhas de alto valor zootécnico, no início da lactação, tem sido recentemente recomendada, quando o tratamento tem respaldo do antibiograma, em especial nas mastites causadas por

S.aureus, já que tem possibilitado a retomada da produção de leite diária, a redução na CCS e cura significativa na lactação (DINGWELL et al., 2004; PYORALA, 2009).

De maneira similar, resultados equivalentes foram obtidos no presente estudo, posto que a taxa de cura microbiológica da mastite subclínica nos animais amostrados no início da lactação foi 73,34%, com restabelecimento da produção láctea e redução da CCS após 5 dias de tratamento. Esses resultados concordam com os obtidos por Middleton (2013) nos EUA que obteve 80% de taxa de cura na mastite subclínica por estafilococos no quarto dia após o tratamento estendido com cefalosporinas de terceira geração, embora tenha relatado recidiva em 30% dos casos após 28 dias do término da terapia. Em contraste, Roy e Keefe (2012) referiram que a utilização da terapia intramamária estendida com cefalosporinas por 8 dias, nas mastites por estafilococos em vacas, foi o protocolo mais efetivo, com taxas de cura de 64%, apesar do incremento nos custos referentes ao tratamento e com o descarte do leite.

No presente estudo foram detectadas diferenças significativas na eficácia entre todos os regimes de tratamento utilizando o ceftiofur (G3 e G4) quando comparados com o grupo positivo não tratado (G2) (Tabela 1). Na análise estatística, quando comparados o grupo tratado no início da lactação (G3) diante o grupo tratado no meio lactação (G4), foi observado que os dois tipos de tratamento foram diferentes, mostrando significância estatística na cura bacteriana, que foi mais elevada em primíparas entre 15 e 100 dias pós-parto (G3), em detrimento dos animais com lactação entre 101 e 200 dias (G4).

Estes resultados indicam que, à semelhança do tratamento convencional no decorrer da lactação, as maiores taxas de cura são obtidas em animais no início da lactação (SANTOS e FONSECA 2007; RADOSTITS et al., 2007), posto que a recorrência dos casos - na mesma lactação - decorre, aparentemente, da cronicidade da infecção, relacionada à formação de microabscessos no parênquima e manutenção intracelular do agente, que dificultam a resolução terapêutica dos casos (RUEGG, 2010; QUINN et al., 2011).

Deluyker et al. (2000), Oliver et al. (2003), Gillespie et al. (2009), Roy et al. (2009) e Maiolino et al. (2014), em diferentes países, referiram que a terapia estendida é significativamente mais eficaz no tratamento da mastite subclínica bovina se comparada ao tratamento intramamário convencional. Oliver et al. (2004) investigaram a eficácia da terapia estendida com ceftiofur em 166 quartos mamários de vacas Holandesas com mastite subclínica por *S. aureus* e consideraram a cura microbiológica quando não houve a recuperação do mesmo micro-organismo 14 e 28 dias após o término do tratamento. Nesse estudo foi observada eficácia de 7%, 17% e 36% para 2, 5, e 8 dias de tratamento

com ceftiofur e 10,55% de taxa de cura espontânea no grupo controle sem tratamento. Em contraste, no presente estudo foram encontrados 26,66% de cura espontânea para primíparas bovinas. Este resultado revela que a taxa de cura espontânea em primíparas é similar às taxas de cura com tratamento estendido com cefalosporinas na mastite subclínica em vacas por *S. aureus* obtidos por Jarp et al. (1989), Pyorala e Pyorala (1998), Sol et al. (2000) e Bradley e Green (2009) que obtiveram, respectivamente, 29,0%, 38,8%, 38,8% e 31,9% de taxas de cura espontânea.

Roy et al. (2009) avaliaram o tratamento intamamário com ceftiofur por 8 dias em 337 vacas com mastite clínica, obtendo cura clínica em 78,6%. De modo similar, Truchetti et al. (2014) investigaram a eficácia da terapia intramamária com ceftiofur por período estendido (com 8 dias de duração), e o tratamento convencional por somente 2 dias em casos de mastite clínica por *Staphylococcus* spp. e observaram aumento estatisticamente significativo (47%) nas taxas de cura no tratamento estendido.

São escassos os estudos desenvolvidos para avaliação do tratamento estendido de mastite subclínica por estafilococos em primíparas bovinas (ROY et al., 2009). Tal limitação ocorre, provavelmente, pela dificuldade de obtenção de número de animais suficientes para comparação entre grupos, quando se adotam critérios rígidos de exclusão de animais, de diferenças entre critérios de definição de cura e protocolos de coleta de amostras, dependência de ocorrência natural de casos em propriedades leiteiras, ausência de grupos controle (sem tratamento) em fazendas comerciais, bem como diferenças de patogenicidade e resistência aos antimicrobianos dos isolados bacterianos, particularmente do grupo dos estafilococos (PIEPERS et al., 2009; MIDDLETON, 2013; MAIOLINO et al., 2014). No entanto, os achados do presente estudo mostraram a eficácia do tratamento estendido utilizando ceftiofur na mastite subclínica em primíparas bovinas, que podem contribuir na tomada técnica de decisão sobre a viabilidade do tratamento de animais com mastite subclínica por estafilococos ao longo da lactação, visando o aumento das taxas de cura com o tratamento estendido. Ainda, tal modalidade de tratamento pode ser uma opção técnica para o controle da mastite estafilocócica crônica, em propriedades que não possuem condições de propor o descarte de animais infectados por *S. aureus*.

Apesar da evidente eficácia da terapia estendida em relação aos protocolos convencionais, esta modalidade não deve ser adotada como regra nos criatórios de bovinos de leite, devendo ser restringida a animais de alto valor zootécnico, com histórico de mastite recorrente, causadas por agentes refratários (principalmente estafilococos), em razão dos maiores custos com o tratamento, incremento no manejo de animais tratados e

maior carência para a utilização do leite (MAIOLINO et al., 2014), fomentando o uso racional dos antimicrobianos na mastite em animais, preceito fundamental no novo conceito de “Uma Saúde” (*One Health*) (RIBEIRO et al., 2015).

7.2 Cultivo Microbiológico

S. aureus e *S. intermedius* figuram entre os ECP mais prevalentes na casuística da mastite em bovinos (BARKEMA, 2006; ROY et al., 2009; SWINKELS et al., 2013). *S. intermedius* foi constituído em 40% (n= 18/45) das espécies de estafilococs isoladas no presente estudo. Este grupo de micro-organismos possui como habitat a microbiota da pele e mucosas de diversas espécies de animais domésticos. Porém, em razão do comportamento oportunista, são descritos em diversas infecções acometendo animais de produção, particularmente na mama de ruminantes domésticos (WINN JUNIOR et al., 2008).

Estima-se que *S. aureus* cause entre 30 e 40% das infecções mamárias em ruminantes produtores de leite (ASPERGER e ZANGERL, 2003; NADER FILHO et al., 2007; SANTOS et al., 2011), além de representar o principal agente causal de infecções nosocomiais em humanos (AARESTRUP et al., 2001).

Na Turquia, *S. aureus* foi isolado em 21,9% das amostras de leite colhidas de vacas com mastite (KIRKAN et al., 2005) e em 28,33% no Paquistão (MONIRI et al., 2007). Ferguson et al. (2007), na Itália, descreveram *S. aureus* em 20,6% das amostras de leite de vacas com mastite. *S. aureus* é citado como o micro-organismo mais patogênico relacionado com a mastite em vacas e novilhas no Canadá e nos Estados Unidos (Roy et al., 2009). Esse agente causa frequentemente mastite subclínica, de evolução crônica, refratária ao tratamento convencional, bem como provoca o aumento da CCS, diminuição da produção de leite, aumento das taxas de descarte precoce de animais jovens, considerado patógeno de elevado impacto econômico negativo para a cadeia produtiva de lácteos em todo mundo (APPARAO et al., 2009; ROY et al., 2009; PIEPERS et al., 2014).

No Brasil, em propriedades no estado do Sergipe, Oliveira et al. (2009) isolaram *S. aureus* em 21,95% das amostras de leite de vacas com mastite. No presente estudo, 51,11% (n= 23/45) das linhagens de estafilococos foram classificadas como *S. aureus* (Quadro 1), ressaltando a relevância das infecções por este micro-organismo em primíparas bovinas.

Ainda, no presente estudo, não foi observada diferença significativa entre a ocorrência de linhagens de *S. aureus* e *S. intermedius* isolados no leite de primíparas

bovinas com mastite subclínica, indicando a importância dessas espécies de estafilococos na etiologia da mastite subclínica, nessa categoria animal, na região estudada.

O grupo dos ECN é constituído por mais de 45 diferentes espécies e subespécies (PIEPERS et al., 2014). A patogenidade desse grupo de bactérias na etiologia da mastite bovina é objeto de discussão entre os pesquisadores, posto que estas espécies de estafilococos são consideradas habitantes normais da pele e membranas mucosas de animais e de humanos (QUINN et al., 2011; VLIEGHER et al., 2012). No entanto, os ECN têm sido frequentemente recuperados de amostras de leite de novilhas saudáveis ou portadoras de mastite no período pré-parto (PIEPERS et al., 2014). Certas linhagens têm sido referidas como agentes de mastite subclínica e, ocasionalmente, causando infecções clínicas, levando a danos no tecido secretor de leite, principalmente em novilhas (KASRAVI et al., 2011; QUINN et al., 2011; VLIEGHER et al., 2012). Bal et al. (2010) encontraram 2,0% (n= 2/100) de isolados de *S. epidermidis* em amostras de leite de vacas com mastite subclínica. Gillespie et al. (2009) identificaram 38 (10%) ECN entre 383 isolados de estafilococos em três rebanhos leiteiros na região de Napoli na Itália.

Apesar da identificação de ECN, no presente estudo, houve maior frequência (diferença significativa) para a identificação de ECP, recuperados de mastite subclínica em primíparas bovinas, denotando a maior preocupação com esse último grupo como agentes causais de mastite em primíparas.

7.3 Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”

A maior sensibilidade dos isolados para princípios ativos do grupo das cefalosporinas, fluorquinolonas e aminoglicosídeos obtida no presente estudo é condizente com outros autores (PHILPOT e NICKERSON, 2002; SANTOS e FONSECA, 2007; RIBEIRO, 2008), que referiram esses grupos de fármacos como os mais efetivos na atualidade para o tratamento da mastite bovina na lactação ou no período seco, disponíveis comercialmente para aplicações por via intramamária.

Particularmente para o grupo dos beta-lactâmicos, grandes variações quanto aos índices de sensibilidade e resistência à penicilina têm sido observadas entre países. Vintov et al. (2003) verificaram alta frequência de resistência à penicilina na Irlanda (71,4%) e Inglaterra (67,3%). Moroni et al. (2006) enfatizaram que as penicilinas naturais e ou sintéticas (como a cloxacilina) são amplamente utilizados para o tratamento intramamário da mastite bovina na Itália, apesar da resistência de 65% para as linhagens de *S. aureus* identificadas em rebanhos nesse país.

Em revisão sistemática sobre o assunto, Erskine et al. (2002) identificaram entre 38,4 e 60,9% de resistência de *Staphylococcus* spp. para penicilina em vacas e novilhas com mastite em rebanhos americanos. Myllys et al. (1995), na Finlândia, caracterizaram resistência de 50% para a penicilina em estafilococos obtidas de amostras de leite de vacas com mastite.

No Brasil, estudo envolvendo a etiologia das mastites bovinas nas sete principais bacias leiteiras do Estado de São Paulo, utilizando bactérias isoladas de parênquimas mamários de vacas leiteiras abatidas, revelou resistência de 75% dos isolados para penicilina e 55% para cloxaxilina (COSTA et al., 2000).

No presente estudo, a alta resistência dos isolados, para a penicilina (Tabela 2), pode ser creditada a presença de linhagens bacterianas produtores de beta-lactamase ou penicilinasas (LANGONI et al., 2009; COSTA et al., 2013). Ainda, o uso há mais de 40 anos desse grupo de antimicrobianos no tratamento da mastite, aliado ao uso não racional de antimicrobianos em animais pode aumentar a pressão seletiva para linhagens multirresistentes (GUIGUERE et al., 2010), particularmente em animais com mastite, em razão do uso contínuo de antimicrobianos no tratamento por via intramamária, parenteral e/ou na profilaxia da vaca seca (RIBEIRO, 2008).

De modo similar, Medeiros et al. (2009), no Brasil, também constataram reduzida sensibilidade dos estafilococos causadores de mastite subclínica em vacas (51,0%) para tetraciclina. Neres et al. (2015) investigando linhagens de ECP identificados em amostras de leite de vacas com mastite subclínica no Estado de Sergipe, observaram que a tetraciclina foi o antimicrobiano menos eficiente, com resistência de 41,70% (n= 33/79) dos isolados. Silveira-Filho et al. (2005) verificaram resistência superior a 50% para tetraciclina em isolados bacterianos de rebanhos bovinos leiteiros do estado de Pernambuco.

A tetraciclina e derivados de longa ação são rotineiramente utilizados nos tratamentos das mastites, com apelo comercial de amplo espectro de ação sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas. À semelhança da penicilina, o uso da tetraciclina foi introduzido há mais de 4 décadas em Medicina Veterinária (GUIGUERE et al., 2010; MIDDLETON, 2013). A alta resistência dos estafilococos a tetraciclina observados no presente estudo, em primíparas com mastite subclínica por estafilococos (Tabela 2) também poderia encontrar reflexo no uso intensivo, por vezes abusivo, de preparações contendo esses princípios ativos na rotina veterinária de tratamento das mais diversas afecções em rebanhos brasileiros, incluindo o tratamento da mastite em novilhas não paridas e em vacas secas ou lactantes (SALAT et al., 2008).

As cefalosporinas são antimicrobianos quimicamente similares às penicilinas (beta-lactâmicos), com diferentes gerações de fármacos e análogos. Apresentam grande espectro de ação para bactérias gram-positivas (incluindo linhagens de *S. aureus* produtoras de beta-lactamases) e, secundariamente, para gram-negativas (GUIGUERE et al., 2010). Representam, atualmente, o principal grupo de antimicrobianos disponíveis comercialmente para a terapêutica intramamária da mastite na lactação e/ou na secagem em animais de produção, com alta efetividade e baixos índices de resistência bacteriana. Na mastite, são frequentemente utilizadas no tratamento a cefoperazona sódica, cefacetril sódico, cefalexina, cefalônio anidro, cefapirina, cefquimona e cefuroxima, em virtude da boa efetividade diante de estafilococos produtores de β -lactamases (COSTA, 1999; RIBEIRO, 2008; COSTA et al., 2013; MAIOLINO et al., 2014).

A cefalexina e cefoperazona, cefalosporinas de 1^a e 3^a geração, respectivamente, utilizadas no presente estudo (além do ceftiofur), são ativas predominantemente contra estafilococos, tendo atividade também diante dos gêneros *Streptococcus*, *Corynebacterium* e certas enterobactérias (TAVARES, 1996; RIBEIRO, 2008).

As cefalosporinas de 2^a geração são menos ativas contra bactérias gram-positivas, em especial contra *S. intermedius*, mas possuem boa atividade para gram-negativos se comparadas às cefalosporinas de 1^a geração (TAVARES, 1996).

As cefalosporinas de 3^a e 4^a geração são os fármacos mais modernos indicados para o tratamento da mastite bovina (RIBEIRO, 2008). Possuem espectro de ação notadamente maior diante dos gram-negativos (FREITAS et al., 2005). Entretanto, a partir da 2^a geração se observa menor atividade diante de gram-positivos, com exceção do cloridrato de ceftiofur - cefalosporina de 3^a geração - que apresenta boa efetividade contra gram-positivos, especialmente *S. aureus* (TAVARES et al., 1996; FREITAS et al., 2005.; RIBEIRO et al., 2008; GUIGUERE et al., 2010).

A administração intramamária do ceftiofur é indicada para o tratamento da mastite clínica e subclínica em vacas leiteiras lactantes, causada por estafilococos, estreptococos, corinebactérias e enterobactérias (RIBEIRO et al., 2008; ROY et al., 2009; GUIGUERE et al., 2010).

No presente estudo, a oxacilina apresentou eficácia equivalente ao ceftiofur nos isolados de estafilococos (Tabela 2). Apesar de pertencer ao grupo das penicilinas (semissintéticas) que têm demonstrado redução gradativa diante dos estafilococos, a oxacilina ainda apresenta bom espectro de ação contra estafilococos produtores de penicilinase (TAVARES, 1996; GUIGUERE et al., 2010).

A eficácia da oxacilina no presente estudo pode encontrar justificativa no uso reduzido desse fármaco em apresentações comerciais de antimastíticos ou mesmo para uso parenteral, não sofrendo, portanto, pressão de uso na prática de tratamentos em animais de produção. Ao contrário, a cloxacilina, fármaco similar à oxacilina, está disponível no mercado há cerca de duas décadas para o tratamento da mastite (TAVARES, 1996; RIBEIRO, 2008; GUIGUERE et al., 2010), fato que poderia justificar, em parte, a baixa eficácia no presente estudo, provavelmente em razão do uso não racional do antimicrobiano nos tratamentos.

No que tange à resistência aos antimicrobianos em isolados de *S. aureus* envolvidos na etiologia da mastite bovina no Brasil, diferentes pesquisadores (COSTA et al., 2000; RIBEIRO, 2008; LANGONI et al., 2009; ROY et al., 2009; SOARES et al., 2012; COSTA et al., 2013; MAIOLINO et al., 2014) relataram grande variação quanto à eficácia dos antimicrobianos. No entanto, certa tendência de sensibilidade tem sido observada para a maioria dos isolados de *S. aureus* diante das cefalosporinas (COSTA et al., 2013). Nesse contexto, estudo conduzido por Martin (2010) no Chile, com 1.419 estirpes bacterianas isoladas de vacas com mastite durante a lactação identificou 24,7% de resistência à cefquinoma, 6,1% para cefoperazona e 6,1% para ceftiofur nos isolados de *S. aureus*. No mesmo estudo, a resistência de ECN para cefquinoma, cefoperazona e ceftiofur foi, respectivamente, 7,6%, 2,6% e 2,6%.

No Brasil, Ribeiro et al. (2009) identificaram resistência em somente 4,8% para o ceftiofur em isolados de estafilococos obtidos de leite orgânico em vacas com mastite clínica e subclínica no Estado de São Paulo. Medeiros et al. (2009) investigando a sensibilidade antimicrobiana de 291 isolados de *Staphylococcus* spp. recuperados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica, em 15 propriedades rurais localizadas na Região Metropolitana do Recife e Agreste do Estado de Pernambuco, identificaram resistência de somente 3% dos isolados para cefquinoma e cefalônio anidro (cefalosporinas de quarta geração). Salina et al. (2015), no estado de São Paulo, investigando casos de mastites subclínicas em ruminantes por *Staphylococcus* spp. somente 4,7% de resistência dos isolados para a cefalexina.

A década de 1960 marcou os registros de resistência bacteriana para a penicilina a partir da detecção das penicilinases e atualmente destacam-se alterações nas proteínas de ligação para as penicilinas [PBPs] (TAVARES, 1996; GUIGUERE et al., 2010; COSTA et al., 2013). Desde então, os mecanismos de resistência são objeto de estudo e motivo de preocupação para profissionais da saúde, incluindo linhagens de *S. aureus* meticilina-resistentes (MRSA) (ZAFALON et al., 2008), que são frequentemente resistentes à

maioria dos agentes antimicrobianos de forma simultânea, incluindo os aminoglicosídeos, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclina e fluorquinolonas (LEE, 2003).

Evidências apontam também que os isolados de *S. aureus* resistentes à oxacilina não respondem ao tratamento “in vivo” com cefalosporinas (ZAFALON et al., 2008). Assim, a emergência da resistência bacteriana aos antimicrobianos em todo mundo sinaliza para a necessidade de estudos continuados do perfil de sensibilidade “in vitro” de bactérias isoladas de humanos e animais, incluindo os estafilococos (LIVERMORE; PEARSON, 2007; GUIGUERE et al., 2010).

Em especial na mastite bovina, o monitoramento da resistência de estafilococos aos antimicrobianos provavelmente decorre do uso incorreto dos antimicrobianos (subdoses, superdoses, tratamentos por tempo inadequado ou sem respaldo de testes “in vitro”), que influenciam no incremento das taxas de resistência bacteriana e na baixa eficácia terapêutica nas mastites crônicas (COSTA, 1999; RIBEIRO, 2008; SALAT et al., 2008).

Nader Filho et al. (2002), Barkema et al. (2006), Roy et al. (2009), Costa et al. (2013) e Rocha et al. (2014), ressaltaram para a presença de linhagens bacterianas multirresistentes em animais e no ambiente de criação que podem ser veiculadas para a glândula mamária de novilhas pré-parto e primíparas.

A resistência antimicrobiana é um fenômeno no qual um micro-organismo é capaz de sobreviver à exposição aos antimicrobianos, geralmente após sofrer mutações mediadas por cromossomos ou é transportada por elementos móveis - plasmídeos ou transposons - (HOE et al., 2005; GUIGUERE et al., 2010; MIDDELETON, 2013). A emergência de linhagens multirresistentes está intimamente associada aos insucessos no tratamento de diversas infecções em animais e humanos, possibilitando, inclusive, a transmissão de estirpes patogênicas multirresistentes de animais domésticos para humanos (GUIGUERE et al., 2010; NETO et al., 2015).

Com efeito, o uso racional dos antimicrobianos, respaldado - sempre que possível - em testes de sensibilidade microbiana “in vitro”, minimiza a pressão de seleção para linhagens multirresistentes, que tem sido objeto de preocupação para os profissionais de saúde, particularmente, no novo conceito de *One Health* (RIBEIRO et al., 2015).

7.4 Detecção de resíduos e/ou substâncias inibidoras do crescimento microbiano

Posto que no presente estudo foi realizada a terapia estendida com ceftiofur em primíparas bovinas com mastite subclínica por estafilococos, foi monitorada a detecção de substâncias inibidoras do crescimento bacteriano/resíduos de antimicrobianos com dois testes comerciais disponíveis no Brasil, a fim de avaliar o tempo necessário para o descarte do leite em animais submetidos a essa modalidade prolongada de tratamento, de maneira similar a metodologia sugerida por Neto et al. (2015).

No presente estudo, após 16 dias do final do tratamento 6,66% e 10% dos animais ainda acusavam, respectivamente, reação no Delvotest™ e Snap test™ (Quadro 2).

Com efeito, na opção do tratamento intramamário estendido de primíparas e multíparas bovinas, deve-se atentar para a maior eliminação de resíduos no leite nos animais tratados. No entanto, a eliminação desse resíduo pode ser monitorada com testes comerciais, garantindo que o leite só será reincorporado a produção do tanque da propriedade quando os resultados forem negativos nos animais tratados (FAGUNDES et al., 2004; VILLA, 2009). A presença de inibidores do crescimento de microorganismos/resíduos de antimicrobianos é um fator limitante para qualquer modalidade de tratamento, por via intramamária ou parenteral, posto que esses componentes no leite podem causar reações adversas nos humanos, além dos prejuízos que causam na produção de derivados lácteos (TAVARES, 1996; RIBEIRO, 2008; GUIGUERE et al., 2010).

Em tempo, a Instrução Normativa 62, do MAPA, Brasil, proíbe o uso do leite de animais com resíduos de antimicrobianos, fato que reforça a necessidade de cautela no uso do leite bovino após o uso de antimicrobianos nos animais (BRASIL 2012). Como a proposta do presente estudo foi utilizar a terapia estendida em primíparas bovinas infectadas de modo subclínico por estafilococos, foi observado que o leite só poderia ser reaproveitado após duas semanas de encerrado o tratamento, caso não seja realizada a detecção de resíduos com testes comerciais. Com efeito, apesar da maior eficácia do tratamento estendido nas primíparas infectadas por estafilococos, deve-se ponderar a opção por essa modalidade de terapia, devido à presença por período mais prolongado de resíduos de antimicrobianos no leite dos animais tratados, posto que, no tratamento intramamário convencional, o leite não deve ser utilizado para consumo, em geral, após 72 horas da última aplicação do antimastítico (RIBEIRO, 2008).

Os dois testes comerciais utilizados nas primíparas amostradas mostraram-se eficientes no monitoramento do ceftiofur no leite em casos de mastite subclínica. Assim,

recomenda-se que esses testes de detecção de substâncias inibidoras do crescimento de micro-organismos/resíduos de antimicrobianos, sejam utilizados para salvaguardar a segurança dos consumidores após o tratamento de animais com mastite (MARTIN, 2011).

Cabe ressaltar que o ceftiofur é o único antimicrobiano aprovado pelos órgãos internacionais com o apelo de descarte zero do leite de animais tratados. No entanto, essa peculiaridade é válida somente quando esse antimicrobiano é administrado pela via intramuscular ou subcutânea, já que este fármaco tem pouca difusão para a glândula mamária por via parenteral (NMC, 2006). Porém, deve ser rigorosamente descartado por, pelo menos, 72 horas (como segue recomendação de bula) após a última administração por via intramamária, à semelhança dos demais antimicrobianos para o tratamento da mastite bovina, por via intramamária, no decorrer da lactação (RIBEIRO, 2008).

No tratamento estendido com ceftiofur, os resíduos deste fármaco estavam presentes no leite após 16 dias do encerramento do mesmo, indicando que embora, tenha sido eficaz sua adoção deve ser criteriosamente analisada sob o ponto de vista econômico, já que, o protocolo terapêutico, somado ao leite de descarte tiveram seus custos estimados em R\$1200,00 por animal.

7.5 Contagem de células somáticas (CCS) e escores de CMT

Zafalon et al. (2010) descreveram que a presença de flocos, coágulos ou outras alterações macroscópicas no leite indicam mastite clínica e, por definição, é considerado leite anormal, não requerendo análise da CCS. No entanto, certamente esse leite apresentará contagens entre 200.000 e 9.999.999 células/mL em contadores automatizados. No presente estudo, os animais que desenvolveram mastite clínica foram excluídos, embora CCS superiores a 5.000.000 células/mL foram observadas em alguns animais dos grupos G2, G3 e G4, confirmando alta celularidade, mesmo nas infecções subclínicas por estafilococos.

Estudos que investigaram a CCS em animais com mastite subclínica tratados na lactação, aliado a ações de profilaxia/controle da mastite e terapia da vaca seca, referiram a redução da CCS no leite no tanque de expansão ou leite de conjunto (ALLORE et al., 1998). NUNES et al. (2007), em estudo com vacas com mastite em Lisboa, Portugal, afirmaram que a elevação da CCS no leite de uma ou mais vacas influencia na CCS do leite de conjunto, bem como na tomada de decisão sobre o tratamento de casos subclínicos durante a lactação. Contudo, outros fatores - além da CCS - devem ser considerados no tratamento dos animais ao longo da lactação, como descarte do leite, valor zootécnico dos animais, produção diária, custos do tratamento, idade do animal,

estágio da lactação, histórico de recidivas e tipo de patógeno (PHILPOT e NICKERSON, 2002; SANTOS e FONSECA, 2007; RADOSTITS et al., 2007; RIBEIRO, 2008).

Salat et al. (2008) avaliaram a eficácia do tratamento da mastite subclínica em vacas com >300.000 células somáticas/mL, por três meses consecutivos, e concluíram que houve redução significativa na celularidade após o término do tratamento. O NMC (2006) estimou que tanques com CCS entre 200.000 e 300.000 células/mL, apresentam aproximadamente 15% de animais infectados com mastite subclínica. Ainda, referiram que cada aumento de 100.000 células/mL, indicaria incremento na taxa de infecção entre 8 a 10%. Assim, tanques com 600.000 células/mL, indicam que 2/3 do rebanho está infectado, resultando em leite com baixa qualidade.

No Brasil, Zafalon (2008) referiu que vacas com mastite subclínica e CCS ≥ 600.000 células/mL, quando submetidas à terapia intramamária durante a lactação, apresentaram redução da celularidade para 120.000 células/mL somente após dois meses do término tratamento. Zafalon et al. (2010) identificaram valores médios de CCS entre 702.000 células/mL e 397.000 células/mL em amostras de leite de quartos mamários de vacas com mastite subclínica por estafilococos e, após o tratamento intramamário com antimicrobianos beta-lactâmicos (cefalexina), a celularidade média foi reduzida para, respectivamente, 142.000 e 95.000 células/mL.

Os achados do presente estudo reforçam, que, mesmo em animais com cura microbiológica após o tratamento, os valores de CCS não retornam em níveis considerados normais (<200.000 células somáticas/mL) em curto espaço de tempo, pois nas primíparas amostradas, mesmo diante de 73,34% de taxa de cura microbiológica para o grupo tratado no início da lactação, nenhum animal retornou a valores inferiores a 200.000 células/mL após três semanas de acompanhamento (Tabela 4).

Cunha et al. (2008) referiram que a redução na CCS para valores abaixo de 200.000 células/mL ocorre mais rapidamente, após o tratamento de casos leves e moderados de mastite clínica causados principalmente por patógenos menores. De maneira similar, Pinzón Sanchez (2010) afirmou que 63% dos casos de mastite clínica causadas por bactérias gram-negativa em vacas os valores de CCS são restabelecidos entre 21 e 55 dias após o tratamento. Em contraste, no mesmo estudo, referiu que apenas 44% das vacas com mastite subclínica por bactérias gram-positivas (principalmente ECP) apresentaram normalização da celularidade entre 60 e 90 dias após a terapia bem sucedida, sem recidivas. Tal achado é similar ao obtido no presente estudo, posto que nenhum dos animais curados acusou valores < 200.000 células/mL após o

término do tratamento (Tabela 4), reforçando a influência na celularidade - por período prolongado - nas infecções por agentes contagiosos, como estafilococos.

No presente estudo foi observada redução gradual nos escores de CMT, particularmente nos animais tratados, entre os momentos M0 e M4 (Quadro 3). Foi observada também a queda na celularidade do leite em primíparas não tratadas durante a lactação com ceftiofur, ao longo dos 28 dias de acompanhamento dos animais (Figura 2). Este resultado pode ser justificado pela cura espontânea, estimada entre 10 a 30% das infecções mamárias, na qual o próprio sistema imune do animal controla a infecção (RIBEIRO, 2008; MAIOLINO et al., 2014).

A redução dos escores de CMT em vacas e primíparas tratadas durante a lactação também foi observada por Reis et al. (2003). Nesse estudo, 83 quartos mamários com mastite subclínica - principalmente por *S. aureus* e ECN - divididos em dois estádios da lactação (15 a 100 dias e 101 a 200 dias), foram tratados por via intramamária com cefalotina. Os animais tratados e não tratados foram avaliados nos dias 0, 14, 25 e 40 após o tratamento. Após 14 dias de tratamento, houve redução de 61,4% das infecções intramamárias subclínicas e redução nos escores de positividade ao CMT, à semelhança dos resultados obtidos no presente estudo.

Em vacas, Zafalon et al. (2010) observaram a redução dos escores do CMT em vacas com mastite subclínica tratadas com antimicrobianos do grupo dos beta-lactâmicos, em contraste a manutenção dos escores do CMT nos quartos não tratados. De maneira similar a outros estudos em vacas, os resultados do presente estudo sinalizam que a redução dos escores do CMT pode ser um parâmetro prático a campo, na avaliação da cura de primíparas com mastite tratadas por via intramamária ao longo da lactação.

7.6 Produção de leite

A diminuição na produção de leite em animais com mastite subclínica ocorre em razão das lesões causadas às células epiteliais da glândula mamária pelos micro-organismos, que reduzem a capacidade de síntese e a secreção láctea (PHILPOT e NICKERSON, 2002; SANTOS e FONSECA, 2007; RADOSTITS et al., 2007; MOTTA et al., 2015). A obstrução de ductos na glândula mamária por microabscessos, em geral causados por contagiosos como estafilococos, pode aumentar o grau de lesão tecidual e a inatividade do parênquima mamário reduzindo a produção láctea (BANSAL et al., 2005; SALAT et al., 2008). Neste contexto, Mungube et al. (2005) compararam as perdas associadas com mastite subclínica aferidas pelo CMT em vacas leiteiras na Etiópia e

identificaram que a produção de leite foi reduzida proporcionalmente em 1,2% (CMT 1+), 6,3% (CMT 2+) e 33% (CMT 3+), diretamente proporcional ao escore do CMT.

Nos EUA, o NMC (2006) estima perdas na produção diária de 6% em animais com CCS entre 200.000 a 499.000 células/mL (CMT 2+) e 18% com CCS entre 500.000 a 1.000.000 células/mL (CMT 3+). Outros estudos referiram que contagens de 1.000.000 células/mL podem reduzir a secreção de leite em até 45% (LAFFRANCHI et al., 2001; BARBOSA et al., 2002; CUNHA et al., 2008).

Esses resultados concordam com os achados da redução de leite nas primíparas bovinas, amostradas no presente estudo (Quadro 4 e Figura 5) com mastite subclínica por estafilococos, reforçando o impacto negativo das infecções mamárias pelo patógeno em animais no início da vida produtiva, assim como pelos danos provocados no tecido mamário, por vezes irreversíveis, que podem comprometer a produção futura desses animais de reposição no plantel.

8. CONCLUSÕES

✓A terapia intramamária estendida com ceftiofur em primíparas bovinas com mastite subclínica por estafilococos é eficaz principalmente nos casos tratados no início da lactação, mostrando boas taxas de cura microbiológica e redução na CCS, indicando que essa modalidade de terapia pode ser adotada para o tratamento dessa categoria de animais infectados com o patógeno no decorrer da lactação;

✓*S. aureus* e *S. intermedius* foram as principais espécies de estafilococos identificadas nos animais amostrados, sinalizando o envolvimento desses patógenos na mastite subclínica em primíparas bovinas;

✓O perfil de sensibilidade microbiana “in vitro” revelou que os isolados de estafilococos recuperados de primíparas bovinas com mastite subclínica foram sensíveis principalmente para oxacilina, ceftiofur e cefalexina, sinalizando que esses fármacos são opções para o tratamento de primíparas com mastite estafilocócica;

✓A penicilina e a tetraciclina foram os antimicrobianos menos efetivos diante dos isolados de estafilococos isolados de primíparas com mastite subclínica, provavelmente em virtude do uso há décadas desses fármacos, por vezes de modo não racional, aumentando a pressão seletiva para linhagens multirresistentes;

✓A detecção de resíduos de antimicrobianos no leite dos animais tratados com ceftiofur de maneira estendida revelou positividade em alguns animais, ainda após 16 dias de encerrado o tratamento, alertando que, apesar da eficácia, a adoção da terapia estendida deve ser ponderada em virtude dos riscos da presença de resíduos no leite por período prolongado em alguns animais;

✓O uso da CCS e CMT foi efetivo para monitorar a redução da celularidade após o tratamento intramamário estendido com ceftiofur, em primíparas bovinas com mastite estafilocócica, apesar de revelar que a celularidade dos animais tratados não retorna a normalidade (< 200.000 células somáticas/mL ou CMT negativo) após 28 dias do término do tratamento;

✓Foi observada associação estatística entre a redução no volume de leite diário e a produção nos animais com mastite subclínica, denotando prejuízos na produção de leite em primíparas bovinas infectadas na lactação por estafilococos.

9. REFERÊNCIAS*

- AARESTRUP, F. M.; JENSEN, N. E. Prevalence and duration of intramammary infection in Danish heifers during the prepartum period. **J. Dairy Sci.**, v. 80, p. 307-312, 1997.
- AARESTRUP, F. M.; SEYFARTH, A. M.; EMBORG, H. D.; PEDERSEN, K.; HENDRIKSEN, R. S.; BAGER, F. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal *enterococci* from food animals in Denmark. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, p. 2054-2059, 2001.
- ALLORE, H. G.; ERB, H. N.; SCHRUBEN, L. W. A simulation of strategies to lower bulk tank somatic cell count below 500.000 per milliliter. **J. Dairy Sci.**, v. 81, p. 694-702, 1998.
- ALMEIDA, L. P.; VIEIRA, R. L.; ROSSI, D. A.; CARNEIRO, A. L.; ROCHA, M. L. Resíduos de antibióticos no leite de propriedades rurais da região de Uberlândia – MG. **Biosci. J.**, v. 19, n. 3, p. 83-87, 2003.
- APPARAO, D.; OLIVEIRA, L.; RUEGG, P.L. Relationship between results of in vitro susceptibility tests and outcomes following treatment with pirlimycin hydrochloride in cows with subclinical mastitis associated with gram-positive pathogens. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 234, n. 11, p. 1437-1446, 2009.
- ARASHIRO, E. K. N.; TEODORO, V. A. M.; MIGUEL, E. M. **Mastite bovina**: importância econômica e tecnológica. 2000. Disponível em: <www.cienciadoleite.com.br>. Acesso em: 19 fev. 2015.
- ASPERGER, H.; ZANGERL P. *Staphylococcus aureus*. In: ROGINSKI, H.; FUQUAY, J. W.; FOX, P. F. (Ed.). **Encycl. of Dairy Scie**. San Diego: Academic Press, 2003. p. 2563-2569.
- BAL, E. B. B.; BAYAR, S.; BAL, M. A. Antimicrobial susceptibilities of Coagulase Negative *Staphylococci* (CNS) and *Streptococci* from bovine subclinical mastites cases. **J. Microbiol.**, v. 48, n. 3, p. 267-274, 2010.

BANSAL, B. K.; HAMMAN, J.; GRABOWSKI, N. T.; SINGH, K. B. Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis. **J. Dairy Res.**, v. 72, p. 144-152, 2005.

BARBOSA, C. P.; BENEDETTI, E.; RIBEIRO, S. C. A.; GUIMARÃES, E. C. Relação entre contagem de células somáticas (CCS) e os resultados do “California Mastitis Test” (CMT), no diagnóstico de mastite bovina. **Biosci. J.**, v. 18, n. 1, p. 93-102, 2002.

BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. Invited review: the role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **J. Dairy Sci.**, v. 89, p. 1877-1895, 2006.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; STTERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a stadardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BORDOLLA, C. C. Métodos de detecção de las mastitis bovina. **Rev. Eletrón. Vet.**, v. 8, n. 9, p. 1-17, 2007.

BRADLEY, A. J.; GREEN, M. J. Factors affecting cure when treating bovine clinical mastitis with cephalosporin-based intramammary preparations. **J. Dairy. Sci.**, v. 92, n. 5, p. 1941-1953, 2009.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 62. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado, o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 29 dez. 2012. Seção 1, p. 6.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; NICOLAU, E. S.; OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, J. P.; NEVES, R. B. S.; MANSUR, J. R. G.; THOMAZ, L. W. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. **Rev. Ciênc. Rural**, v. 35, n. 4, p. 848-854, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (NCCLS). **Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing**. Twenty third information supplement. Wayne: CLSI, 2013.

COMPTON, C. W. R.; HEUER, C.; PARKER, K. I.; MCDOUGALL, S. Epidemiology of mastitis in pasture-grazed peripartum dairy heifers and its effects on productivity. **J. Dairy Sci.**, v. 90, p. 4157-4170, 2007.

COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. *In*: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap. 42, p. 422-433.

COSTA, E. O.; GARINO, F.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, A. R.; SILVA, J. A. B.; WATANABE, E. T.; VALLE, C. R. Estudo da etiologia das mastites bovinas nas sete principais bacias leiteiras do Estado de São Paulo. **Rev. Núcleo Pesq. Glând. Mam. Prod. Leiteira**, n. 4, p. 6-13, 2000.

COSTA, E. O.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; PARDO, R. B.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 17, n. 4, p.156-158, 1995.

COSTA, E. O.; GARINO JUNIOR, F.; PADOVESE, L.; SANTOS, E. Avaliação da eficácia de tratamentos de mastite clínica em vacas em lactação. **Rev. Núcleo Pesq. Glând. Mam. Prod. Leiteira**, n. 1, p. 3-9, 2003.

COSTA, G. M.; BARROS, R. A.; CUSTÓDIO, D. A. C. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, v. 80, n. 3, p. 297-302, 2013.

CUNHA, R. P. L.; MOLINA, L. R.; CARVALHO, A. U.; FACURY FILHO, E. J.; FERREIRA, P. M.; GENTILI, M. B. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com o número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 60, n. 1, p. 19-24, 2008.

DANIEL, W. W. **Bioestatics: a foundation for analysis in the health sciences**. 9. ed. Philadelphia: Wiley, 2009. 956p.

DELUYKER, H. A.; CHESTER, S. T.; VAN OYE, S. N. A multilocation clinical trial in lactating dairy cows affected with clinical mastitis to compare the efficacy of treatment with intramammary infusions of alincosin/neomycin combination with an ampicillin/cloxacillin combination. **J. Vet. Pharm. Ther.**, v. 22, p. 274-282, 2000.

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

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. **Prev. Vet. Med.**, n. 63, p. 75-89, 2004.

ERSKINE, R. J.; BARLETT, P. C.; VANLENTE, J. L. Efficacy of systemic ceftiofur for severe clinical mastitis in dairy cattle. **J. Dairy Sci.**, v. 85, p. 2571-2575, 2002.

FAGUNDES, H.; GARINO JUNIOR, F.; COSTA, E. O. Primi gravid heifers pré-partum: efficacy and antimicrobial milk residue risk. **Rev. Napgama**, v. 7, p. 6-12, 2004.

FERGUSON, J. D.; AZZARO, G.; GAMBINA, M.; LICITRA, G. Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. **J. Dairy Sci.**, v. 90, n. 12, p. 5798-5813, 2007.

FIELD, A. **Discovering Statistics using IBM SPSS Statistics**. 4. ed. Thousand Oaks: Sage Publications Limited Textbooks, 2012.

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

GILLESPIE, B. E.; HEADRICK, S. I.; BOONYAYATRA, S.; OLIVER, S. P. Prevalence and persistence of coagulase negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. **Vet. Microbiol.**, v. 134, p. 65-72, 2009.

GUIGUERE, S.; PRESCOTT, J. F.; BAGGOT, J. D.; WALKER, R. D.; DOWLING, P. M. **Terapia antimicrobiana em Medicina Veterinária**. 4. ed. São Paulo: Roca, 2010. 683 p.

HALLBERG, J. W.; DAME, K. J.; CHESTER, S. T. The visual appearance and somatic cell count of mammary secretions collected from primigravid heifers during gestation and early postpartum. **J. Dairy Sci.**, v. 78, p. 1629-1636, 1995.

HOE, F. G.; RUEGG, P. L. Relationship between antimicrobial susceptibility of clinical mastitis pathogens and treatment outcome in cows. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 227, n. 9, p. 1461-1468, 2005.

HUIJPS, K.; DE VliegHER, S.; LAM, T.; HOGEEVEN, H. Cost estimation of heifer mastitis in early lactation by stochastic modeling. **Vet. Microbiol.**, v. 134, p. 121-127, 2009.

JARP, J.; BUGGE, H. P.; LARSEN, S. Clinical trial of three therapeutic regimens for bovine mastitis. **Vet. Rec.**, v. 17, p. 630-634, 1989.

KASRAVI, R.; BOLOURCHI, M.; FARZANEH, N.; SEIFI, H. A.; BARIN, A.; HOVARESHTI, P.; GHARAGOZLOU, F. Efficacy of conventional and extended intra-mammary treatment of persistent sub-clinical mastitis with cefquinome in lactating dairy cows. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 43, n. 6, p. 1203-1210, 2011.

KIRKAN, S.; GOKSOY, E. O.; KAYA O. Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococci* from bovine mastitis in the Aydin Region of Turkey. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.**, v. 29, p. 791-796, 2005.

KUKUROVA, I.; HOZOVA, B. Interactions of antimicrobials in milk and their detection by the disk diffusion method and delvotest SP. **Jour. AOAC. Inter.**, v. 86, n. 3, p. 529-533, 2003.

LAFFRANCHI, A.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas ao longo dos primeiros quatro meses de lactação. **Ciênc. Rural**, v. 31, n. 6, p. 1027-1032, 2001.

LANGONI, H. Agentes emergentes na etiologia da mastite. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 19, p. 238-240, 1997.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; SOUZA, L. C.; SHIMABUKURO, F. H.; CAUDURO, R. O. Eficácia da cefapirina benzatina no tratamento da mastite subclínica na interrupção da lactação. **Rev. Núcleo Pesq. Glând. Mam. Prod. Leiteira**, n. 3, p. 7-9, 2000.

LANGONI, H.; LAURINO, F.; FACCIOLI, P. Y.; SILVA, A. V.; MENOZZI, B. D. Cultivo microbiológico e a sensibilidade no isolamento de patógenos nas mastites bovinas. **Vet. Zootec.**, v.16, n. 4, p. 708-715, 2009.

LEE, J. H. Methicillin (oxacillin) – resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 11, p. 6489-6494, 2003.

LIVERMORE, D. M.; PEARSON, A. Antibiotic resistance: location, location, location. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 13, p. 7-16, 2007.

MAIOLINO, S. R.; RIBEIRO, M. G.; MOTTA, R. G.; SILVA, A. S.; MAIOLINO, G. S.; LISTONI, F. J. P. Eficácia “in vitro” e “in vivo” da cefoperazona sódica, gentamicina e ciprofloxacino no tratamento intramamário da mastite clínica bovina. **Rev. Vet. Zootec.**, v. 21, n. 1, p. 160-176, 2014.

MARTIN, J. G. P. Resíduos de antimicrobiano em leite – uma revisão. **Segur. Aliment. Nutr.**, v. 18, n. 2, p. 80-87, 2011.

MARTÍN, S. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from dairy herds in Chile. **Int. J. Appl. Res.**, v. 5, n. 3, p. 123-154, 2010.

MATTHEWS, K. R.; HARMON, R. J.; LANGLOIS, B. E. Prevalence of *Staphylococcus* species during the periparturient period in primiparous and multiparous cows. **J. Dairy Sci.**, v. 75, p. 1835-1839, 1992.

MCDUGALL, S.; ARTHUR, D. G.; BRYAN, M. A.; VERMUNT, J. J.; WEIR, A. M. Clinical and bacteriological response to treatment of clinical mastitis with one of three intramammary antibiotics. **Neo. Zel. Vet. J.**, v. 55, p.161-170, 2007.

MEANEY, W. J. Mastitis levels in spring-calving dairy heifers. **Irish. Vet. J.**, v. 35, p. 205-209, 1981.

MEDEIROS, E. S.; MOTTA, R. A.; SANTOS, M. V.; FREITAS, M. F. L. Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 29, n. 7, p. 569-574, 2009.

MIDDLETON, J. R. *Staphylococcus aureus* mastitis: Have we learned anything in the last 50 years? In: NMC REGIONAL MEETING PROCEEDINGS, 2013, Portland, Maine. **Proceedings...** Columbia: University of Missouri, 2013. Disponível em: <<http://www.nmconline.org/articles/staphaureus50.pdf>>. Acesso em: 29 jul. 2015.

MIDDLETON, J. R.; TIMMS, L. L.; BADER, R.; LAKRITZ, J.; LUBY, C. D.; STEEVENS, B. J. Effect of prepartum intramammary treatment with pirlimycin hydrochloride on prevalence of early first-lactation mastitis in dairy heifers. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 227, p.1969-1974, 2005.

MONIRI, R.; DASTEHGOLI, K.; AKRAMIAN, A. Increasing resistant coagulase negative staphylococci in bovine clinical mastitis. **Pak. J. Biol. Sci.**, v. 10, n. 15, p. 2465-2469, 2007.

MORONI, P.; PISONI, G.; ANTONINI, M.; VILLA, R.; BOETTCHER, P.; CARLI, S. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Italy. **J. Dairy Sci.**, v. 89, n. 28, p. 2973-2976, 2006.

MOTTA, R. G.; SILVA, A. V.; GIUFFRIDA, R.; SIQUEIRA, A. K.; PAES, A. C.; MOTTA, I. G.; LISTONI, F. J. P.; RIBEIRO, M. G. Indicadores de qualidade e composição de leite

informal comercializado na região Sudeste do Estado de São Paulo. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 35, n. 5, p. 417-423, 2015.

MUNGUBE, E. O.; TENHAGEN, B. A.; REGASSA, F.; KYULE, M. N.; SHIFERAW, Y.; KASSA, T.; BAUMANN, M. P. Reduced milk production in udder quarters with subclinical mastitis and associated economic losses in crossbred dairy cows in Ethiopia. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 37, n. 6, p. 503-512, 2005.

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

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; AMARAL, L. A.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; OLIVEIRA, R. P. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. **Arq. Inst. Biol.**, v. 74, n. 1, p. 1-4, 2007.

NADER FILHO, A.; MANGERONA, A. C. S.; MOURA, E. S. Eficácia da associação sinérgica de beta lactâmicos em suspensão oleosa no tratamento intramamário da mastite de vacas em lactação. **Rev. Núcleo Pesq. Glând. Mam. Prod. Leiteira**, n. 1, p. 20-22, 2002.

NERES, W. S.; SANTOS, O. M.; TUÑON, G. I. L.; CARNEIRO, M. R. P. Susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de vacas com mastite em Sergipe. **Sci. Plena**, v. 11, n. 4, p. 2-6, 2015.

NETO, A. E.; JÚNIOR, F. G.; SANTOS, J. C. A. Avaliação de resíduo de antibiótico em amostras de leite de vacas após a terapia de vacas secas. **Arq. Inst. Biol.**, v. 82, p. 1-4, 2015.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Current concepts of bovine mastitis**. 4. ed. Madison: NMC, 2006. v. 29, n. 6.

NUNES, S. F.; BEXIGA, R.; CAVACO, L. M. Technical Note: Antimicrobial susceptibility of portuguese isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in subclinical bovine mastitis. **J. Dairy Sci.**, v. 90, n. 7, p. 3242-3246, 2007.

OLIVEIRA, A. A.; MELO, C. B.; AZEVEDO, H. C. Diagnóstico e determinação microbiológica da mastite em rebanhos bovinos leiteiros nos Tabuleiros Costeiros de Sergipe. **Ciênc. Anim. Bras.**, v. 10, n. 1, p. 226-230, 2009.

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

OLIVER, S.; ALMEIDA, R. A.; GILLESPIE, B. E.; IVEY, S. J.; MOOREHEAD, H.; LUNN, P.; DOWLEN, H. H.; JOHNSON, D. L.; LAMAR, K. C. Efficacy of extended pirlimycin therapy for treatment of experimentally induced *Streptococcus uberis* intramammary infections in lactating dairy cattle. **Vet. Ther.**, v. 4, p. 299-308, 2003.

OLIVER, S. P.; LEWIS, M. J.; GILLESPIE, B. E.; DOWLEN, H. H. Influence of prepartum antibiotic therapy on intramammary infections in primigravid heifers during early lactation. **J. Dairy Sci.**, v. 75, p. 406-414, 1992.

OLIVER, S. P.; MITCHELL, B. A. Intramammary infections in primigravid heifers near parturition. **J. Dairy Sci.**, v. 66, p. 1180-1183, 1983.

PANKEY, J. W.; PANKEY, P. B.; BARKER, R. M.; WILLIAMSON, J. H.; WOOLFORD, M. W. The prevalence of mastitis in primiparous heifers in eleven Waikato dairy herds. **N. Z. Vet. J.**, v. 44, p. 41-44, 1996.

PARDO, P. E.; METTIFOGO, E.; MULLER, E. E. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas no período pós-parto. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 18, n. 3-4, p. 115-118, 1998.

PARKER, K. I.; COMPTON, C. W.; ANNISS, F. M.; HEUER, C.; MCDOUGALL, S. Quarter-level analysis of subclinical and clinical mastitis in primiparous heifers following the use of a teat sealant or an injectable antibiotic, or both, precalving. **J. Dairy Sci.**, v. 91, p. 169-181, 2008.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Vencendo a luta contra a mastite**. São Paulo: Westfalia Surge Milkbuzz, 2002. p. 6 -13.

PIEPERS, S.; OPSOMER, G.; BARKEMA, H. W.; DE KRUIF, A.; DE VLIEGHER, S. Heifers infected with coagulase-negative *Staphylococci* in early lactation have fewer cases of clinical mastitis and higher milk production in their first lactation than non-infected heifers. **J. Dairy Sci.**, v. 93, p. 2018-2024, 2014.

PIEPERS, S.; DE VLIEGHER, S.; DE KRUIF, A.; OPSOMER, G.; BARKEMA, H. W. Impact of intramammary infections in dairy heifers on future udder health, milk production, and culling. **Vet. Microbiol.**, v. 134, p. 113-120, 2009.

PINZÓN-SÁNCHEZ, C.; CABRERA, V. E.; RUEGG, P. L. Decision tree analysis of treatment strategies for mild and moderate cases of clinical mastitis. **J. Dairy Sci.**, v. 54, n. 7, p. 765-878, 2010.

PYORALA, S. Treatment of mastitis during lactation. **Irish. Vet. J.**, v. 62, suppl. 4, p. 40-44, 2009.

PYORALA, S. H.; PYORALA, E. O. Efficacy of parenteral administration of three antimicrobial agents in treatment of clinical mastitis in lactating cows: 487 cases (1989-1995). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 1, p. 407-412, 1998.

QUINN, P. J.; MARKEY, B.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, E. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Artmed: Porto Alegre, 2011. 512p.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. 10. ed. London: W. B. Saunders, 2007.

REIS, S. R.; SILVA, N.; BRESCIA, M. V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 55, n. 6, p. 651-658, 2003.

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

RIBEIRO, M. G.; GERALDO, J. S.; LANGONI, H.; LARA, G. H. B.; SIQUEIRA, A. K.; SALERNO, T.; FERNANDES, M. C. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite produzido no sistema orgânico. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 29, n. 1, p. 52-58, 2009.

RIBEIRO, M. G.; RISSETI, R. M.; BOLANOS, C. A. D.; CAFFARO, K. A.; MORAIS, A. B. C.; LARA, G. H.; ZAMPROGNA, T. O.; PAES, A. C.; LISTONI, F. J. P.; FRANCO, M. M. J. *Trueperella pyogenes* multispecies infections in domestic animals: a retrospective study of 144 cases (2002 a 2012). **Vet. Quart.**, v. 35, n. 2, p. 82-87, 2015.

ROCHA, B.; MENDONÇA, D.; RIBEIRO, J. N. Trends in antibacterial resistance of major bovine mastitis pathogens in Portugal. **RCPV**, v. 109, n. 591-592, p. 79-88, 2014.

ROY, J. P.; KEEFE, G. Evidence-based veterinary in therapeutic management of *Staphylococcus aureus* mastitis in lactation cows: what is the best therapeutic option between intramammary and systemic antibiotic treatment, and between intramammary antibiotics? **Vet. Clin. North Am.**, v. 28, p. 39-50, 2012.

ROY, J. P.; DESCÔTEAUX, L.; DUTREMBLAY, D.; BEAUDRY, F.; ELSENER, J. Efficacy of a 5-day extended therapy program during lactation with cephapirin sodium in dairy cows chronically infected with *Staphylococcus aureus*. **Can. Vet. J.**, v. 50, n. 12, p. 1257-1262, 2009.

RUEGG, P. L. The application of evidence based medicine to mastitis therapy. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 2010, Santiago. **Proceedings...** Santiago, v.4, n.14, p.67-78. 2010.

RUPP, R.; BOICHARD, D. Relationship between milk somatic-cell counts in the first lactation and clinical mastitis occurrence in the second lactation of French Holstein cows. **Prev. Vet. Med.**, v. 46, p. 99-111, 2000.

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

SALAT, O.; SÉRIEYS, F.; POUTREL, B.; DUREL, L.; GOBY, L. Systemic treatment of subclinical mastitis in lactating cows with penethamate hydriodide. **J. Dairy Sci.**, v. 91, n. 2, p. 632-640, 2008.

SALINA, A.; MACHADO, G. P.; GUIMARÃES, F. F.; LANGONI, H. Sensibilidade microbiana de *Staphylococcus spp.* isolados de leite de cabras com mastite subclínica. **Vet. Zootec.**, v. 22, n. 2, p. 288-294, 2015.

SANTOS, L. L.; COSTA, G. M.; PEREIRA, U. P. P.; SILVA, M. A. Dairy cattle with clinical and subclinical mastitis caused by coagulase negative *Staphylococcus*. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 70, n. 1, p. 1-7, 2011.

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

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. D. Experiments and observations leading to development of California Mastitis Test. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 130, p. 199-204, 1957.

SENO, N.; AZUMA, R. A study on heifer mastitis in Japan and its causative microorganisms. **Natl. Inst. Anim. Health Q. (Tokyo)**, v. 23, p. 82-91, 1983.

SHIPIGEL, N. Y.; KASS, P. H.; SARAN, A. A comparative randomized field trial on intramammary and intramuscular dry cow antibiotic treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows. **J. Vet. Med.**, v. 53, n. 2, p. 418-422, 2006.

SILVEIRA-FILHO, V. M.; SANTOS, F. G. B.; FREITAS, M. L. F.; LUZ, I. S.; ALMEIDA, A. M. P.; LELA, N. C.; SENA, M. J.; MOTA, R. A.; LEAL BALBINO, T. C. Molecular epidemiologic study of *Staphylococcus aureus* associated to bovine mastitis from Pernambuco State, Brazil. **Rev. Nucl. Pesq. Gland.**, v. 8, n. 1, p. 12-17, 2005.

SOARES, L. C.; PEREIRA, I. A.; PRIBUL, B. R.; OLIVEIRA, M. S. Antimicrobial resistance and detection of *mecA* and *blaZ* genes in coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. **Pesqui. Vet. Bras.**, v. 32, n. 8, p. 692-696, 2012.

SOL, J.; SAMPIMON, O. C.; BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H. Factors associated with cure after therapy of clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. **J. Dairy Sci.**, v. 83, p. 278-284, 2000.

SWINKELS, J. M.; HOGVEEN, H.; ZADOKS, R. N. A partial budget model to estimate economic benefits of lactational treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis. **J. Dairy Sci.**, v. 88, p. 4273-4287, 2012.

TANAKA, S.; MIYAZAWA, K.; KUWANO, A.; WATANABE, K.; OHWADA, S.; ASO, H.; NISHIDA, S.; YAMAGUCHI, T. Age-related changes in leukocytes and T cell subsets in peripheral blood of Japanese Black cattle. **Anim. Sci. J.**, v. 79, p. 368-374, 2008.

TAPONEM, S.; PYORALA, S. Coagulase negative *Staphylococci* as cause of bovine mastitis – Not so different from *Staphylococcus aureus*? **Vet. Microbiol.**, v. 134, p. 29-36, 2009.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 792 p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

TRIOLA, M. F. **Introdução à estatística**. 9. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 682 p.

TRUCHETTI, G.; BOUCHARD, É.; DESCÔTEAUX, L.; SCHOLL, D.; ROY, J. P. Efficacy of extended intramammary ceftiofur therapy against mild to moderate clinical mastitis in Holstein dairy cows: A randomized clinical trial. **Can. J. Vet. Res.**, v. 78, n. 1, p. 31-37, 2014.

VILLA, F. B. **Qualidade físico-química, microbiológica e resíduos de antimicrobianos em leite in natura comercializados informalmente em Brotas, SP**. 2009. Dissertação

(Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

VINTOV, J.; AARESTRUP, F. M.; ZINN, C. E.; OLSEN, J. E. Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. **Vet. Microbiol.**, v. 95, n. 1-2, p. 133-147, 2003.

VLIEGHER, L.; FOX, K.; PIEPERS, S.; MCDOUGALL, S.; BARKEMA, H. W. Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **J. Dairy Sci.**, v. 95, p. 1025-1040, 2012.

WIN JUNIOR, C. W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P. **Diagnóstico microbiológico**: texto e atlas colorido: Koneman. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 1565.

ZAFALON, L. F.; ARCARO, J. R. P.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; BENVENUTTO, F. Investigação de perfis de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lactação. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 67, n. 2, p. 118-125, 2008.

ZAFALON, L. F.; ARCARO, J. R. P.; NADER FILHO, A.; VESCHI, J. L. A. Contagem de células somáticas no leite de vacas de diferentes raças em distintas lactações e condições climáticas. **Vet. Zootec.**, v. 17, n. 3, p. 378-385, 2010.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bull. IDF**, v. 345, p. 15-18, 2000.

Anexos I – Quadros (4 e 5)

Quadro 4. Relação entre as medianas da CCS (células/mL) e os escores de CMT no leite de primíparas, com e sem mastite subclínica por estafilococos, tratadas de modo estendido com ceftiofur. Botucatu, SP, 2015.

M0	G1 Escore CMT*				G2 Escore CMT				G3 Escore CMT				G4 Escore CMT				Total/ Final
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	
	11/15 73,3 %	4/15 26,7 %	-	-	-	-	4/15 26,7 %	11/15 73,3 %	-	-	2/15 13,3 %	13/15 86,7 %	-	-	4/15 26,7 %	11/15 73,3 %	
CCS x 10 ³ células/mL	65 ^a Mediana				1.800 ^{bB} Mediana				1.890 ^b Mediana				1.345 ^c Mediana				1.288 M0
M1	7/15 46,7 %	8/15 53,3 %	-	-	-	-	-	15/15 100,0 %	-	-	2/15 13,3 %	13/15 86,7 %	-	-	4/15 26,7 %	11/15 73,3 %	60 100,0 %
CCS x 10 ³ células/mL	66 ^a Mediana				1.850 ^b Mediana				1.800 ^b Mediana				1.564 ^c Mediana				1.386 M1
M2	6/15 40,0 %	9/15 60,0 %	-	-	-	-	-	15/15 100,0 %	-	-	3/15 20,0 %	12/15 80,0 %	-	-	5/15 33,3 %	10/15 66,7 %	60 100,0 %
CCS x 10 ³ células/mL	65 ^a Mediana				1.998 ^b Mediana				987 ^c Mediana				1.232 ^b Mediana				987 M2
M3	9/15 60,0 %	6/15 40,0 %	-	-	-	-	2/15 13,3 %	13/15 86,7 %	-	-	8/15 53,3 %	7/15 46,7 %	-	-	6/15 40,0 %	9/15 60,0 %	60 100,0 %
CCS x 10 ³ células/mL	65 ^a Mediana				1.789 ^a Mediana				888 ^b Mediana				987 ^b Mediana				839 M3
M4	8/15 53,3 %	7/15 46,7 %	-	-	-	-	3/15 20,0 %	12/15 80,0 %	-	4/15 26,7 %	5/15 33,3 %	6/15 40,0 %	-	3/15 20,0 %	3/15 20,0 %	9/15 60,0 %	60 100,0 %
CCS x 10 ³ células/mL	75 ^a Mediana				2.098 ^b Mediana				543 ^c Mediana				987 ^d Mediana				605 M4
Total geral por grupos	41/75 54,7 %	34/75 45,3 %	-	-	-	-	9/75 12,0 %	66/75 88,0 %	-	4/75 5,3 %	20/75 26,6 %	51/75 68,1 %	-	3/75 4,0 %	22/75 29,3 %	50/75 66,7 %	75/100 100,0 %

* Escores de CMT (California Mastitis Tests) adotados neste estudo 0 (negativo), 1 (uma cruz), 2 (duas cruzes), 3 (três cruzes). p = Valores de significância para comparação entre grupos pelo teste de análise de variância em uma via a mesma coluna, seguidas de letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente. **G1** (grupo negativo), **G2** (grupo positivo não tratado), **G3** (grupo positivo tratado no início da lactação), **G4** (grupo positivo tratado no meio da lactação). **M0** ou dia zero = diagnóstico da mastite subclínica e isolamento de estafilococos, **M1** = 7 dias após o diagnóstico da mastite subclínica e início da terapia expandida, **M2** = 2 dias após o término do tratamento expandido da mastite subclínica, **M3** = 7 dias após M2, **M4** = 7 dias após M3.

Quadro 5: Avaliação da produção de leite pela comparação entre grupos a partir das medianas, desvios padrões estimados ponto a ponto e intervalo de confiança 95% em amostras de leite de primíparas com mastite subclínica por estafilococos, tratadas com ceftiofur de modo estendido. Botucatu, SP, 2015.

		Número de Amostras	Média produção (Kg/dia)	Desvio padrão	Margem Padrão	Intervalo de confiança 95%	Máximo	Mínimo
M0	G1	15	15,66	0,61	0,15	15,31	16,70	11,00
	G2	15	14,41	1,63	0,42	13,50	16,10	11,30
	G3	15	13,45	1,47	0,38	12,63	15,60	12,10
	G4	15	13,74	1,23	0,31	13,06	16,70	11,00
	Total	60	14,31	1,52	0,19	13,92	17,60	15,00
M1	G1	15	16,35	0,66	0,17	15,98	16,50	11,20
	G2	15	14,51	1,78	0,46	13,52	16,20	14,70
	G3	15	15,66	0,45	0,11	15,41	16,20	13,50
	G4	15	15,46	0,78	0,20	15,02	17,60	11,20
	Total	60	15,49	1,22	0,15	15,18	16,90	14,70
M2	G1	15	15,58	0,59	0,15	15,25	16,00	10,90
	G2	15	13,27	1,67	0,43	12,34	15,90	11,10
	G3	15	13,28	1,68	0,43	12,34	15,10	10,60
	G4	15	12,79	1,19	0,30	12,13	16,90	10,60
	Total	60	13,73	1,72	0,22	13,28	16,90	14,80
M3	G1	15	15,76	0,67	0,17	15,39	15,60	9,20
	G2	15	12,70	1,95	0,50	11,62	16,90	11,80
	G3	15	14,16	1,77	0,45	13,18	15,30	10,70
	G4	15	13,20	1,35	0,35	12,44	16,90	9,20
	Total	60	13,96	1,89	0,24	13,47	16,20	12,90
M4	G1	15	14,80	0,96	0,25	14,26	15,20	9,00
	G2	15	12,12	2,14	0,55	10,93	17,10	10,40
	G3	15	14,46	2,15	0,55	13,27	15,40	9,30
	G4	15	13,10	2,23	0,57	11,87	17,10	9,00
	Total	60	13,62	2,18	0,28	13,06	16,70	15

G1 (grupo negativo), **G2** (grupo positivo não tratado), **G3** (grupo positivo tratado no início da lactação), **G4** (grupo positivo tratado no meio da lactação). **M0** ou dia zero = diagnóstico da mastite subclínica e isolamento de estafilococos, **M1** = 7 dias após o diagnóstico da mastite subclínica e início da terapia expandida, **M2** = 2 dias após o término do tratamento expandido da mastite subclínica, **M3** = 7 dias após M2, **M4** = 7 dias após M3.

Indicadores de qualidade e composição de leite informal comercializado na região Sudeste do Estado de São Paulo¹

Rodrigo G. Motta^{2*}, Aristeu V. Silva³, Rogerio Giuffrida⁴, Amanda K. Siqueira⁵, Antônio C. Paes²,
Igor G. Motta⁶, Fernando J.P. Listoni² e Márcio G. Ribeiro²

ABSTRACT.- Motta R.G., Silva A.V., Giuffrida R., Siqueira A.K., Paes A.C., Motta I.G., Listoni F.J.P. & Ribeiro M.G. 2015. [Indicators of quality and composition of informal milk marketed in the in the Southeast region of São Paulo, Brazil.] Indicadores de qualidade e composição de leite informal comercializado na região Sudeste do Estado de São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 35(5):417-423. Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Cx. Postal 560, Botucatu, SP 18618-970, Brazil. E-mail: farturavetufpr@hotmail.com

The informal milk is recognized as the product marketed without inspection. We evaluated the microbiological quality, nutritional ingredients and substances inhibiting bacterial growth in 100 informal samples from cows milk, marketed in the southwest region of the state of São Paulo, Brazil. It was found that 77% (SCC) and 86% (TBC) of the samples were at odds with the maximum values required by IN 62 MAP. It was identified to solids contents in disagreement (36%), protein (23%), fat (38%), nonfat dry extract (43%) and 73% urea nitrogen. In 59% of the samples was detected residues of the bacterial growth inhibitors. Were isolated 240 strains of micro-organisms with a prevalence of enterobacteria, streptococci, staphylococci and fungi. The informal milk is marketed in the region without the minimum hygienic conditions and present risks to public health, and represents serious socio-economic problem for the region.

INDEX TERMS: Cow, mastitis, IN 62, inhibitory, CBT, cellularity, informal milk

¹ Recebido em 13 de janeiro de 2015.

Aceito para publicação em 12 de abril de 2015.

² Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Cx. Postal 560, Botucatu, SP 18618-970, Brasil. *Autor para correspondência: farturavetufpr@hotmail.com

³ Departamento de Ciências Biológicas (DCBIO), Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Av. Transnordestina s/n, Bairro Novo Horizonte, Feira de Santana, BA 44036-900, Brasil. E-mail: aristeuvsilva@gmail.com

⁴ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade do Oeste Paulista (Unoeste), Rodovia Raposo Tavares Km 572, Bairro dos Limoeiros, Presidente Prudente, SP 19067-175, Brasil. E-mail: rgiuffrida@unoeste.br

⁵ Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia (IB), Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Cidade Universitária, Rua Zeferino Vaz, Distrito de Barão Geraldo, Campinas, SP 13083-970, Brasil. E-mail: kellersiqueira@hotmail.com

⁶ Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Centro Oeste do Paraná (Unicentro), Rua Simeão Varela de Sá, Cx. Postal 3010, Guarapuava, PR 85040-080, Brasil. E-mail: igorgmotta@gmail.com

RESUMO.- O leite informal é reconhecido como o produto comercializado sem inspeção. Avaliou-se a qualidade microbiológica, constituintes nutricionais e presença de substâncias inibidoras do crescimento bacteriano em 100 amostras informais de leite de vacas, comercializadas na região sudoeste do estado de São Paulo, Brasil. Verificou-se que 77% (CCS) e 86% (CBT) das amostras estavam em desacordo com os valores máximos exigidos pela IN 62 do MAPA. Identificou-se teores em desacordo para sólidos (36%), proteína (23%), gordura (38%), extrato seco desengordurado (43%) e nitrogênio uréico 73%. Em 59% das amostras detectou-se a presença de resíduos de inibidores do crescimento bacteriano. Isolou-se 240 linhagens de micro-organismos com predomínio de enterobactérias, estreptococos, estafilococos e fungos. O leite informal é comercializado na região sem as mínimas condições de higiene e oferece riscos a saúde pública, além de representar sério problema sócio-econômico para região. **TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Vaca, leite, mastite, IN 62, inibidores , CBT, celularidade, leite informal

INTRODUÇÃO

A exploração leiteira é praticada em todo o Brasil, em cerca de 1,5 milhões de propriedades rurais. Somente na produção primária, a atividade gera acima de três milhões de empregos e agrega mais de seis bilhões ao valor da

produção agropecuária nacional (IBGE 2014). Com efeito, tem-se observado no país grande preocupação em avaliar os principais indicadores de qualidade do leite (CCS, CBT, presença de resíduos) e dos constituintes do produto (gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado, sólidos totais), balizados pela Instrução Normativa no. 62 do MAPA (IN-62) com o intuito de salvaguardar a qualidade final do leite e derivados oferecidos ao consumidor, assim como aumentar a competitividade do país no cenário de produção láctea (Brasil 2012).

Estima-se que cerca de 20 a 30% da produção de leite bovino no Brasil seja comercializada sem inspeção sanitária, ou tratamento térmico adequado (Almeida et al. 1999, Freitas Filho et al. 2009, Vianna, 2009). Este produto é denominado “leite informal” e é comercializado em utensílios plásticos ou de vidro elaborados para outros produtos, como refrigerantes (Vianna 2009, Vidal-Martins et al., 2013). Apesar da irregularidade na comercialização deste tipo de leite, são escassas as informações sobre a presença de micro-organismos, toxinas, resíduos de antimicrobianos, contagens bacterianas totais e de células somáticas, bem como dos constituintes nutricionais e físico-químicos (Langoni et al., 2011, Vidal-Martins et al. 2013). A ausência de informações de qualidade deste produto expõe a população ao consumo de leite com baixa qualidade, aos riscos de reações orgânicas indesejáveis, além de veicularem toxinas e micro-organismos com potencial zoonótico (Almeida et al. 1999, Vasconcelos & Itto 2011).

O consumo de leite “in natura”, sem qualquer tratamento térmico é comum no interior do estado de São Paulo e em outras regiões do país, devido à crença popular que este tipo de leite seja “mais rico” em nutrientes e vitaminas e, principalmente, pelo baixo custo, pois é consumido principalmente pela população de menor poder aquisitivo (Freitas Filho et al. 2009). Não há garantia de que os padrões físico-químicos e microbiológicos do leite estabelecidos pela IN 62 (Brasil 2012) sejam mantidos pelos produtores e comerciantes informais, visto que a fiscalização sobre este tipo de produto é incipiente. Especula-se ainda que o consumo do leite informal ou clandestino tem crescido também na parcela da população de maior poder aquisitivo, cuja justificativa estaria relacionada ao consumo de produto natural, íntegro, com seus constituintes em proporções brutas preservadas e sem a presença de produtos químicos ou conservantes (Montanhini & Hein, 2013). Entretanto, a marginalização desta produção, do comércio e a ausência de inspeção e tratamento térmico do leite informal, favorecem condições para fraudes e adulterações do produto, posto que este leite não é submetido a qualquer exigência de análise da qualidade organoléptica, composicional e microbiológica (Vidal-Martins et al. 2013)

O presente estudo investigou os principais indicadores de qualidade, constituintes nutricionais, presença de micro-organismos e detecção de substâncias inibidoras do crescimento bacteriano em amostras de leite de vacas, comercializados informalmente na região sudeste do estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de leite informal foram obtidas na bacia leiteira do sudoeste do estado de São Paulo, contemplando os municípios de: Angatuba, Arandu, Avaré, Bernardino de Campos, Buri, Capão Bonito, Cerqueira Cesar, Coronel Macedo, Fartura, Itaberá, Itatinga, Itaí, Itapeva, Itaporanga, Itapetininga, Itararé, Pardinho, Pirajú, Riversul, Sarutaiá, Taguaí, Taquarituba, Tejupá e Timburi.

Foram adquiridas 100 amostras de leite informal entre junho de 2013 a julho de 2014. Do total de amostras, 72 foram adquiridas em bares, mercearias, padarias e supermercados na região do estudo. As outras 28 foram obtidas em propriedades que realizavam a venda de leite diretamente no local, sem fiscalização. Nas 28 propriedades que comercializavam leite informalmente, foram obtidos também os dados gerais de produção, como tipo de assistência técnica, volume de leite produzido ao dia e número de vacas em lactação. No momento da aquisição do leite também foi avaliada a temperatura de conservação (ambiente ou refrigerada).

As amostras foram previamente homogeneizadas, na sequência, coletadas somente uma vez, em frascos esterilizados tipo Falcon (15ml), visando o diagnóstico microbiológico e a detecção de inibidores da multiplicação de micro-organismos; e em recipientes plásticos adequados (50ml) para a contagem de células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT), composição química do leite (gordura, proteína, extrato seco desengordurado, sólidos totais e lactose), avaliação do nitrogênio uréico de acordo com as normas da Rede Brasileira de Qualidade do Leite, as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável (4°C), e encaminhadas aos laboratórios para o respectivo processamento.

Contagem eletrônica de células somáticas (CCS). Todas as amostras de leite informal foram repassadas das garrafas de refrigerante recicladas, para os tubos apropriados de plástico, homogeneizadas com conservante celular de leite Bronopol® (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol) e dispostas em caixas apropriadas, congeladas a -20°C (Barkema et al. 1997), visando à contagem eletrônica de células somáticas por citometria de fluxo, de acordo com as recomendações técnicas do equipamento (Somacount 300®)⁷. As análises de CCS foram realizadas na Clínica do Leite, ESALQ-USP/Piracicaba, SP. Foi considerado normal o leite com ≤ 200.000 CS/mL (Ribeiro, 2008, Langoni et al., 2011). Os resultados do presente estudo foram comparados com a IN - 62 do Brasil (Brasil 2012), vigente para o período de julho de 2013 a julho de 2014, que preconizava valor máximo de 600.000 céls/mL.

Contagem bacteriana total (CBT). Para avaliação da CBT, o material colhido foi adicionado em frasco apropriado contendo o Azidiol® (azida sódica e cloranfenicol) e imediatamente congelado até o processamento na Clínica do Leite, ESALQ-USP/Piracicaba, SP, pelo método de citometria de fluxo. Os resultados do presente

estudo foram comparados com a IN - 62 do Brasil (Brasil 2012), vigente para o período de julho de 2013 a julho de 2014, considerando valor máximo de 600.000 UFC/mL.

Avaliação de resíduos de substâncias inibidoras da multiplicação de micro-organismos.

Estátécnicafoi realizada em todas as amostras de leite informal, utilizando “kit” comercial, conforme as recomendações do fabricante (Delvotest SP-NT®)⁸, indicado para o diagnóstico dos principais grupamentos de antimicrobianos disponíveis em medicina veterinária a destacar: penicilinas, cefalosprinas, tetraciclina, macrolídeos, aminoglicosídeos, sulfas, florfenicol bem como, a identificação dos antissépticos e desinfetantes os quais atrasam ou inibem a multiplicação de bactérias (Ribeiro, 2008, Langoni et al., 2011). As amostras foram colhidas e acondicionadas em frascos esterilizados e congeladas (-20°C) até o processamento. A detecção de resíduos por este método utiliza ampolas de meio de cultura contendo *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. O micro-organismo está disposto em ágar com indicador de pH, em áreas individuais, onde serão inoculadas as amostras de leite(0,1mL), e mantidos em temperatura de 64°C ±0,5 durante 3 horas, em banho-maria. Na ausência de substâncias inibidoras ocorre a multiplicação bacteriana, produção de ácido e alteração da cor original do indicador (de púrpura para amarelo). Após esse período, a presença de resíduos de substâncias inibidoras impedirá ou reduzirá a multiplicação do micro-organismo e o meio com indicador de pH permanecerá com coloraçãoinalterada (azul), caracterizado como positivo. Na ausência de inibidoresdetectáveis pelo teste, o micro-organismo se multiplicará acidificando o meio,alterando sua cor para amarelo, resultado considerado negativo.

Análise da composição do leite. A análise dos constituintes do leite (gordura, proteína total, lactose, extrato seco, extrato seco desengordurado e nitrogênio uréico) foi realizada na Clínica do Leite, ESALQ-USP/Piracicaba, SP, pelo método de infravermelho.

Isolamento e identificação dos micro-organismos. Todas as amostras de leite foram semeadas (0,1mL) nos meios de ágar suplementado com sangue bovino (5%) desfibrinado e ágar MacConkey, em condições de aerobiose a 37°C, mantidas por 72 horas. Os micro-organismos foram classificados fenotipicamente segundo as características morfo-tintoriais, bioquímicas e de cultivo (Nero et al. 2005; Martinez & Trábulssi, 2008; Quinn et al. 2011).

Análise estatística e universo amostral. O cálculo do tamanho amostral foi realizado de acordo com Daniel , (2009), determinado pela fórmula:

$$N = \frac{NP(1 - P)}{\frac{d^2}{Z_{1-\alpha/2}^2} \times (N - 1) + P \times (1 - P)}$$

N = tamanho da população (finita); P = prevalência estimada na população; d = margem de erro aceitável. Com base neste cálculo seria necessária a coleta de no mínimo 82 amostras de leite na região de estudo. Os resultados obtidos foram analisados por estatística descritiva geral no programa estatístico InfoStat®, considerando intervalo de confiança de 95% e nível de significância para valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Características de produção dos criatórios

Das propriedades que comercializavam leite informal na região do estudo 82,2% não possuíam nenhum tipo de assistência médico veterinária. Nos criatórios com assistência foi observada diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) para a mediana de produção de leite 6,1 Litros de leite/animal/dia e 4,2 Litros de leite/animal/dia sem assistência. Esses dados demonstram a importância da assistência veterinária no aumento da produção de leite, mediante a implantação de medidas, visando à nutrição, sanidade, reprodução, manejo geral e de ordenha dos animais (Fonseca & Santos, 2007). A produção média de 6,1 Litros de leite/vaca/dia encontrada neste estudo (Quadro1), não assemelha-se aos resultados obtidos por Faccioli (2010) em estudo realizado na bacia leiteira da região de Botucatu com tanques de expansão, onde encontrou média de produção 8,42 Litros de leite/vaca/dia. Estes resultados confirmam a baixa produção de leite da região estudada, cerca de 4 a 6 vezes menor que a de outros países como EUA, Holanda e Nova Zelândia, indicando a necessidade de controle da mastite e adoção de outras medidas para o aumento da produção média de leite de vacas na região estudada (Langoni et al., 2011). Foi observado que 45% do leite informal amostrado, encontrava-se armazenado em temperatura ambiente no momento da comercialização. Esses resultados são semelhantes aos apresentados por Liro et al. (2011) que afirmaram que 38% (59/155) de seus entrevistados no município de Petrolina - PE adquiriram leite por meios informais e que estas amostras quando adquiridas em feiras livres estavam armazenadas em caixas de isopor e ou a temperatura ambiente.

Contagem de Células Somáticas (CCS) e Contagem Bacterina Total (CBT)

Foi verificado que 77% das amostras de leite informal na região estudada estavam em desacordo com os valores máximos de CCS exigidos pela IN 62 (Quadro2), limitados em 600.000 céls/mL na época do estudo. Os valores da CCS oscilaram, entre 145.000 e 9.315.000 céls/mL. A alta celularidade do leite de vacas também foi reportado por Nero et al. (2005) em diferentes estados, como Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo.

Dentre os parâmetros utilizados na avaliação da qualidade do leite de vacas, destaca-se a contagem de células somáticas. A alta celularidade no leite é ocasionada, principalmente, por deficiências no manejo higiênico

da ordenha que resultam na ocorrência de mastite e, secundariamente, relacionada a outros fatores como: à fase da lactação, idade e raça do animal (Fonseca & Santos 2007, Langoni et al., 2011).

A CCS do tanque é um indicativo da ocorrência de mastite subclínica no rebanho (Arcuri et al., 2006, Liro et al., 2011). Além disso, está ligada também às condições higiênicas de produção de leite e a qualidade/rendimento industrial da fabricação dos derivados lácteos (Vidal-Martins et al., 2013). Desta forma, a CCS está intimamente associada com a qualidade do leite, determinando prejuízos aos produtores e a indústria processadora, além de impor restrições à comercialização do produto e derivados no mercado internacional (Arcuri et al., 2006, Vidal-Martins et al. 2013). Segundo estudos de Langoni et al. (2011) a CCS é aceita internacionalmente como medida padrão para determinar a qualidade do leite. No presente estudo, o elevado número de amostras forados limites máximos de CCS permitidos pelo MAPA (Brasil, 2012), é atribuído ao aproveitamento do leite de vacas portadoras de mastite, o qual não foi submetido a nenhum sistema de inspeção oficial, reforçando os resultados obtidos por Vidal-Martins et al., 2013.

Foi observado que 86% das amostras de leite informal estão em desacordo com a IN 62 (Tabela 2), que prevê a produção de leite com CBT máximo em 600.000 UFC/mL. Estudos similares Nero (2007) e Villa (2007) em diferentes regiões do Brasil, também encontraram valores de CBT acima do permitido pela IN 62, em amostras de leite comercializadas informalmente no país. Na região sudoeste do estado de São Paulo foi descrito que em tanques coletivos a CBT é o principal aspecto em desacordo com a IN 62 (Faccioli 2010). Altas contagens bacterianas foram um dos parâmetros com maiores irregularidades encontrados no presente estudo. A elevada CBT é reflexo de deficiências nas condições de higiene das instalações, dos animais e, principalmente, dos equipamentos e utensílios utilizados na ordenha. Ainda, está relacionada à ineficiente refrigeração do leite até o momento da coleta pelas indústrias de beneficiamento (Santos 2006). A adoção do *pré dipping* é considerado procedimento efetivo para a obtenção do leite com baixa carga microbiana inicial, pois esta prática contribui significativamente para a redução dos micro-organismos contaminantes que elevam a CBT no tanque, entretanto, este procedimento não é realizado na maioria dos criatórios que comercializam informalmente o leite na região (Faccioli 2010; Vidal-Martins et al., 2013).

Os resultados de CBT e CCS no presente estudo são alarmantes, do ponto de vista de saúde pública, posto que o leite informal não é submetido a nenhum tipo de tratamento térmico que garanta a segurança microbiológica do produto final. Ressalta-se que em inquéritos realizados com consumidores do leite informal, revelaram que na maioria das vezes, os consumidores não têm conhecimento dos riscos inerentes a ingestão deste produto sem tratamento térmico, comercializado sem fiscalização sanitária (Bersot et al. 2005, Vidal-Martins et al., 2013). Santos (2006) e Langoni et al., (2011) enfatizaram que a venda direta de leite cru para o

consumidor ou qualquer derivado lácteo produzido com leite cru, é proibido no Brasil desde a década de 1970. De maneira similar, nos EUA, é considerada violação da lei federal comercializar leite cru na maioria dos estados, enquanto no Canadá é ilegal a venda de leite cru em todo país (Bersot et al., 2005, Villa, 2007, Vidal-Martins et al., 2013). Desta forma, faz-se necessário orientar os consumidores sobre os riscos associados à ingestão do produto e derivados lácteos sem tratamento térmico prévio (Liro et al., 2011, Vidal-Martins et al., 2013). A demanda pelo consumo de leite cru no Brasil é um mercado em expansão (Villa 2007), as dificuldades em coibir a venda do leite informal repousam na venda do produto em carros, charretes, a cavalo, ou a pé em bares, mercearias ou de casa em casa nos municípios (Bersot et al., 2005, Villa 2007, Liro et al., 2011). Ademais, os consumidores em potencial do leite cru são sensíveis ao apelo do consumo de alimentos “mais naturais”, “mais nutritivos”, sem nenhum tipo de processamento industrial, com compra direta da fazenda e de melhor sabor (Vidal-Martins et al., 2013).

Principais constituintes do leite de vacas

O aumento dos teores de gordura do leite pode ser apenas relativo em virtude da redução dos demais componentes em processos inflamatórios da glândula mamária (Bueno et al. 2005). Porém, Santos (2006) descreveram que quando há diminuição da produção de leite proporcionalmente maior do que a diminuição da síntese de gordura, os teores de gordura aumentam em devido à concentração. Contrariamente, Arcuri et al., (2006) e Liro et al., 2011 observaram redução dos teores de lipídeos no leite de animais com mastite do estado de Goiás. Santos (2006) sugeriu que a redução da concentração total de gordura no leite se deve a diminuição da capacidade de síntese de lipídeos pela glândula mamária com mastite.

Segundo a IN-62 (Brasil 2012) o leite com padrão de qualidade para o consumidor deve conter no mínimo 2,9% de proteína. Diferentes autores têm relatado aumento dos teores de proteína no leite de animais mastíticos (Santos 2003, Langoni et al., 2011). O aumento dos teores de proteína é creditado ao aumento das proteínas plasmáticas em decorrência da resposta inflamatória e também ao maior afluxo de substâncias do sangue para o leite (Santos 2006). Langoni et al., (2011) observaram teores maiores de proteína em amostras de leite colhidas de vacas com mastite, criadas em sistema convencional. Em contraste, Bueno et al. (2005) observaram redução dos teores de proteína do leite de vacas com mastite criadas em sistema convencional no estado de Goiás. A mediana para o teor de proteínas do leite no presente estudo foi 3,2% (Quadro 3), considerados dentro dos padrões mínimos exigidos pela IN 62 do MAPA (Brasil 2012). No entanto, foi observado que 23% das amostras apresentaram níveis de proteína menores que a exigência mínima estabelecida. Os resultados de gordura e proteína abaixo do mínimo estabelecido pela legislação podem ser reflexos da aguagem (diluição da gordura e proteína com água) ou da prática de desnate, uma vez que o creme (nata) tem valor de

mercado maior que o do leite fluido, conforme recente estudo realizado por Montanhini & Hein (2013) com “leite informal” no estado do Paraná.

Gonzalez et al. (2004) afirmaram que a lactose é o componente que menos varia no leite bovino. Machado et al. (2000) e Arcuri et al., (2006) observaram pequena redução dos teores de lactose de leite colhido de tanques de expansão de propriedades convencionais. Na avaliação da qualidade do leite da bacia leiteira de Pelotas, RS, Gonzalez et al. (2004) observaram que os teores de lactose foram menores nos meses de março, abril e maio. Bueno et al. (2005) observaram que os valores de lactose foram inversamente proporcionais a CCS em vacas com mastite criadas em sistema convencional no estado de Goiás. No presente estudo a mediana da lactose foi 4,5%, embora, 40% das amostras avaliadas terem acusado teor de lactose menor que 3,9%, em desacordo com a IN 62. A redução dos teores de lactose no leite pode estar correlacionada com a alta prevalência de quartos mamários infectados por bactérias, ou mesmo por adulteração do leite pela adição de água (Santos 2003).

O nitrogênio uréico (NU) representa a porção de nitrogênio no leite na forma de uréia, o nível de NU no leite é diretamente proporcional aos teores de Nitrogênio do sangue (Lucci et al. 2006), sendo proporcionalmente correlacionados (Beserra et al. 2009). A presença de baixos valores de NU indica dieta desbalanceada em energia e proteínas fornecida aos animais em lactação. O teor do NU para as amostras de leite informal estão sumariados no Quadro 3. Foi constatado que 69% das amostras estudadas apresentaram valores abaixo de 10 mg/dl, resultado em desacordo, visto que os parâmetros normais situam-se entre 10 a 16mg/dl (Lucci et. al., 2006).

Pesquisa de resíduos de substâncias inibidoras da multiplicação de micro-organismos

Foi constatado que 59% do leite informal na região estudada encontravam-se em desacordo com a IN 62 do MAPA - Brasil 2012 (Quadro4), que prevê a ausência de resíduos de substâncias inibidoras do crescimento bacteriano no leite de vacas no Brasil. A preocupação com a presença destes resíduos no leite de vacas criadas no Brasil tem sido foco de vários estudos nas últimas décadas (Nascimento et al. 2001, Serra 2004, Villa 2007). Barros et al. (2001) encontraram 38,5% das amostras de leite C pasteurizado de vacas, comercializadas na cidade de Salvador, com a presença de resíduos de antimicrobianos. Nascimento et al. (2001) encontraram 50% de amostras positivas para resíduos em leite de vacas comercializado em Piracicaba, SP. Biacchi et al. (2004) encontraram resíduos de antimicrobianos em 80% das amostras analisadas de leite do tipo B e 100% de leite C provenientes do Vale do Paraíba, SP. Tetzner et al. (2005), no Triângulo Mineiro, detectaram resíduos em 33,3% das amostras avaliadas. Nero et al. (2007) constataram resíduos em 11,4% das amostras de leite de vacas colhidas em quatro regiões leiteiras do Brasil.

No entanto, são escassos os estudos direcionados à detecção de resíduos de antimicrobianos em leite informal comercializado no Brasil. A presença de resíduos de antimicrobianos no leite pode causar efeitos indesejáveis aos humanos (Ribeiro, 2008). Ademais, a presença de resíduos no leite de vacas causa problemas à indústria láctea, visto que pode prejudicar a produção de derivados, principalmente os obtidos pela fermentação do leite (Lucci et al. 2006; Montanhini & Hein, 2013, Vidal-Martins et al., 2013).

A presença de resíduos de antimicrobianos no leite informal constitui-se em desafio para os profissionais de saúde, pelo potencial nocivo dos resíduos aos humanos (Almeida et al. 2003). No presente estudo, 59% do leite informal acusou a presença de resíduos de antimicrobianos ou inibidores de multiplicação de micro-organismos. Resultados estes que concordam com vários autores que também encontraram elevada prevalência de resíduos de amostras de antimicrobianos no leite cru comercializado em diversas regiões do Brasil (Almeida et al., 1999, Badini et al., 1997, Barros et al., 2001, Bersot et al., 2005, Arcuri et al., 2006, Soares et al., 2010, Montanhini & Hein, 2013).

Vários fatores podem influenciar à qualidade do leite para o consumo humano no que tange à sua inocuidade, como a contaminação por agentes microbianos, presença de resíduos de antimicrobianos e os resultantes de ações fraudulentas, com o intuito de lesar o consumidor, aumentando o lucro de quem as pratica (Villa 2007, Soares et al., 2010, Montanhini & Hein, 2013). Assim, as atitudes frente à coibição do leite informal devem ser embasadas na legislação vigente, embora sua implementação deverá ser de maneira gradual, visto que o leite comercializado informalmente no país ainda represente 20 a 30% da produção nacional ou aproximadamente 900 milhões de litros por ano (Villa 2007, Langoni et al., 2011, Vidal Martins et al., 2013, IBGE 2014).

Cultivo microbiológico

Foram isolados e identificados 240 linhagens de micro-organismos com predomínio dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e enterobactérias, seguidos em menor frequência por actinomicetos, certos grupos de bactérias gram-negativas e fungos. Obteve-se isolamento microbiológico em 98 amostras (98%) do leite informal estudado (Quadro 5).

A percentagem de micro-organismos isolados foi *Staphylococcus aureus* (3,33%), *Streptococcus bovis* (5,00%), *Streptococcusagalactie* (7,50%), *Streptococcus dysgalactie* (7,08%), *Escherichia coli* (18,75%), *Enterobacter cloacae* (10,42%), *Klebsiella oxitoca* (5,41%), *Klebsiella pneumoniae* (4,16%), *Enterobacter aerogenes* (0,41%), *Serratia marcescens* (0,83%), *Enterobacter agglomerans* (2,91%), *Proteus mirabilis* (2,50%), *Nocardia asteroides* (1,66%), *Pasteurella multocida* (0,83%), *Pseudomonas aeruginosa* (1,66%).

Concomitantemente, nas amostras de “leite informal” houve o isolamento de alta percentagem linhagens de fungos, leveduras e algas aclorofílicas as quais podem ser distribuídas: *Aspergillus* sp (6,60%), *Candida* sp (8,33%), *Geotrichum* sp (5,83%), *Trichophyton* sp (7,08%) e *Prototheca zopfii* (0,41%).

As enterobactérias foram o grupo de micro-organismos isolados com maior frequência no leite amostrado. A alta prevalência de enterobactérias no leite informal e em tanques de expansão são indicativos de falta de higiene no momento da ordenha, particularmente na limpeza e desinfecção dos tetos dos animais, deficiência na higienização das ordenhadeiras, da mão dos ordenhadores, tanques e utensílios de armazenado e transporte do leite (Vasconcelos & Ito, 2011, Montanhini & Hein, 2013). Sinaliza, também, deficiências na profilaxia de agentes ambientais de mastite, que incluem a adoção de *pré-dipping*, evitar acúmulo de matéria orgânica no ambiente entre as ordenhas e o não oferecimento de alimentação após o término da retirada do leite (Santos 2006, Ribeiro 2008, Langoni et al., 2011). Estes micro-organismos também apresentam potencial patogênico à saúde pública e, comumente, estão relacionados com a deterioração do leite e derivados lácteos, conforme estudos realizados por Langoni et al., (2011), Vasconcelos & Ito, 2011, Vidal-Martins et al., (2013) e Montanhini & Hein (2013).

A elevada ocorrência de enterobactérias no leite informal é altamente preocupante no contexto de saúde pública. Este grupo de micro-organismos está intimamente associado a processos de infecção e toxi-infecções alimentares em humanos veiculadas pelo leite e derivados lácteos, principalmente nos produtos não submetidos ao tratamento térmico (Langoni et al., 1998, Acha & Szyfres 2003, Langoni et al., 2011 e Montanhini & Hein 2013). Estes resultados enfatizam a necessidade de orientação dos produtores da região com tanques de expansão para as boas práticas de ordenha higiênica (Langoni et al., 2011 e Montanhini & Hein 2013). Indicam, também, a necessidade de orientação da população quanto aos riscos do consumo do leite informal, assim como a importância de investimentos e políticas públicas, visando possibilitar ao pequeno produtor de leite informal condições de sair da marginalidade do comércio de leite, com vistas a garantir a inspeção e o tratamento térmico deste leite oferecido ao consumidor no Brasil (Liro et al., 2011, Vasconcelos & Ito, 2011, Montanhini & Hein 2013).

A baixa qualidade do leite comercializado informalmente no Brasil também tem sido identificada em estudos pontuais que avaliaram o perfil microbiológico do leite cru entregue às plataformas dos laticínios em diferentes regiões do país (Serra 2004, Nero 2007, Villa 2007, Vidal-Martinset al., 2013 e Montanhini & Hein 2013).

CONCLUSÕES

Na região Sudeste do Estado de São Paulo os módulos de produtores de leite informal foram constituídos por pequenos e médios produtores com baixo nível de tecnificação, carentes de assistência veterinária especializada;

O leite informal é comercializado na região sem as mínimas condições de higiene e oferece riscos a saúde pública, além de representar sério problema sócio-econômico para região;

O nitrogênio uréico foi o constituinte que mais oscilou, indicando dieta desequilibrada dos animais, refletindo diretamente no baixo nível de tecnificação e assistência profissional na região estudada;

A CCS e CBT encontraram-se em grande número de amostras em desacordo com a IN 62, como provável reflexo de leite proveniente de vacas com mastite, em condições inadequadas de ordenha, com deficiência na conservação e armazenamento do leite.

A presença de substâncias inibidoras do crescimento bacteriano nas amostras de leite avaliadas, alerta para os riscos em saúde pública do consumo de leite e derivados destas propriedades e o descumprimento desta exigência da IN 62;

A elevada ocorrência de micro-organismos no leite informal amostrado, particularmente, enterobactérias e fungos, indica contaminação fecal e precárias condições de armazenamento do leite comercializado informalmente na região.

REFERÊNCIAS

- Acha P.N.& Szyfres B. 2001.Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales.3ª ed. Organización Panamericana de La Salud, Washington, DC. 398p.
- Arcuri E.F., Brito, M.A.V.P. & Pinto, S.M. 2006. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 58:440-446.Almeida A.C., Silva G.L., Silva D.B., Fonseca Y.M., Buelta T.T.& Fernandes E.C. 1999. Características físico-químicas e microbiológicas do leite cru consumido na cidade de Alfenas, MG. Revista Unifenas, Alfenas, 5:165-168.
- Almeida L.P., Vieira R.L., Rossi D.A., Carneiro A.L.& Rocha M.L. 2003. Resíduos de antibióticos no leite de propriedades rurais da região de Uberlândia, MG. Biosci. J. 9(3):83-87.
- Badini K.B., Nader Filho A. & Amaral L.A. 1997. Hábitos dos consumidores de leite cru produzido clandestinamente nos municípios de Botucatu, SP, e São Manuel, SP. Higiene. Alimentar 11:15-17.
- Barros G.M.S., Jesus N.M. & Silva M.H. 2001. Pesquisa de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado tipo C, comercializado na cidade de Salvador. Revista Bras. Saúde Prod. Anim. 2(3):69-73.

- Bersot L.S., Barcellos V.C., Motta D.S. & Galvão J.A. 2005. Perfil dos consumidores de leite informal de Palotina, PR. Revista CRMV-PR 4:20-24.
- Beserra E.E.A., Vieira R.J., Souza J.A.T. & Nunes J.F. 2009. Efeitos do nitrogênio uréico no leite sobre a eficiência reprodutiva de vacas girolandas. Revista Cient. Prod. Anim. 11(1):34-35.
- Biacchi N.C., Jorge A.O.C. & Ueno M. 2004. Detecção de resíduos de antibióticos em leite bovino na região do Vale do Paraíba, São Paulo. Revista Biociências 10(2):47-49.
- Bueno V.F.F., Mesquita A.J., Nicolau E.S., Oliveira A.N., Oliveira J.P., Neves R.B.S., Mansur J.R.G. & Thomaz L.W. 2005. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. Revista Ciência Rural. 35 (4):848-854.
- Brasil 2012. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado, o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. Instrução Normativa 62, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 29 dez (1):6.
- Daniel W.W. 2009. Bioestatistics: a foundation for analysis in the health sciences. 9^a ed. Wiley, Philadelphia. 956p.
- Faccioli P.Y. 2010. Detecção molecular de *Staphylococcus aureus* e de suas toxinas no leite de tanque de rebanhos bovinos, em condições de refrigeração, e sob temperatura ambiente. Tese de Doutorado, - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 123p.
- Fonseca L.F.L. & Santos M.V. 2007. Qualidade do leite e controle de mastite. Lemos Editorial, São Paulo, SP. 175p.
- Freitas Filho J.F., Filho J.S., Gonçalves T.M., Souza J.F., Silva A.H., Oliveira H.B. & Bezerra J.D. 2009. Caracterização físico-química e microbiológica do leite 'in natura' comercializado informalmente no município de Garanhuns - PE, Revista Bras. Tecnol. Agroindustrial. Ponta Grossa, 3(2):38-46.
- Gonzalez H.L., Fischer V., Ribeiro M.E.R., Gomes J.F., Stumpf Jr W. & Silva M.A. 2004 Avaliação da qualidade do leite na bacia leiteira de Pelotas, RS. efeito dos meses do ano. Revista Bras. Zootec. 33(6):1531-1534.
- IBGE 2014. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/>>
- Langoni H., Silva A.V., Cabral K.G. & Domingues P.F. 1998. Aspectos etiológicos na mastite bovina: Flora bacteriana aeróbica. Revista Bras. Med. Vet. 20(5):204-209.
- Langoni H., Penachio D.S., Citadella J.C.C., Laurino F., Faccioli-Martins P.Y., Lucheis S.B., Menozzi B.D. & Silva A.V. 2011. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. Pesq. Vet. Bras. 31:1059-1065. Liro, C.V, Granja

- R.E.P & Zocche, F. 2011. Perfil do consumidor de leite no vale do rio São Francisco, Pernambuco. *Ciência Animal Brasileira*. 12:718-726.
- Lucci C.S., Valvasori E., Peixoto Jr K. & Fontolan V. 2006. Concentrações de Nitrogênio na dieta, no sangue e no leite de vacas lactantes no período pós parto. *Revista Bras. Zootec.* 35(1):258-263.
- Martinez, M.B. & Trabulsi, L.R. 2008. *Enterobacteriaceae*. Microbiologia. 5.ed. Atheneu, São Paulo. 280p.
- Montanhini M.M.T. & Hein K.K. 2013. Qualidade do leite cru comercializado informalmente no município de Pirai do Sul, Estado do Paraná, Brasil. *Revista Inst. Laticínios Cândido Tostes*. Juiz de Fora. 68 : 382-393.
- Nascimento G.G.F., Maestro V. & Campos M.S.P. 2001. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. *Revista Nutrição* 14(2):119-129.
- Nero L.A, Mattos M.R., Beloti V., Barros M.A.F., Pinto J.P.A.N., Andrade N.J., Silva W.P. & Franco B.D.G.M. 2005. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras; perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 25(1):191-195.
- Nero T.A., Mattos M.R., Beloti V., Barros M.A.F. & Franco B.D.G.M. 2007. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 27(2):391-393.
- Quinn P.J., Carter M.E., Markey B. & Carter G.R. 2011. *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe: London. 648p.
- Ribeiro M.G. 2008. *Princípios Terapêuticos na Mastite em Animais de Produção e de Companhia: manual de terapêutica veterinária*. 3ª ed. Roca, São Paulo. 812p.
- Santos M.V. 2003. Influência da qualidade do leite na manufatura e vida de prateleira dos produtos lácteos: papel das células somáticas. Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e questão dos resíduos de antibióticos. CBQL, Juiz de Fora, 1:139-149.
- Santos M.V. 2006. O uso da CCS em diferentes países. Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil. Goiânia. *Revista Talento* 1:181-197.
- Serra M.J.B. 2004. Qualidade microbiana e físico-química do leite cru produzido na região de Pardinho, SP. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 146p.
- Soares K.M.P, Gois V.A, Aroucha E.M.M, Verissimo A.M.O.T, Silva J.B.A. 2010. Hábitos de consumo de leite em três municípios do estado do Rio Grande do Norte. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*. 5:160 – 164.
- Tetzner T.A.D., Benedetti E., Guimaraes E.C. & Peres R.F. 2005. Prevalência de resíduos de antibióticos em amostras de leite cru na região do Triângulo Mineiro. *Higiene Alimentar* 19(130):69-72.

- Vasconcelos S.A & Ito F.H. 2011. Principais zoonoses transmitidas pelo leite. Revista Educ. Contin. Med. Vet. Zootec. 9(1):32-37.
- Vianna A. C. 2009 Avaliação de queijo de coalho produzido com bactérias lácticas endógenas. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia. 80p.
- Vidal-Martins A.M.C, Burger K.P.,Gonçalves A.C.S,Grisolio A.P.R,Aguilar C.E.G & Rossi G.A.M.R. 2013. Avaliação do consumo de leite e produtos lácteos informais e do conhecimento da população sobre os seus agravos à saúde pública, em um município do Estado de São Paulo, Brasil. Revista Indústria animal., Nova. Odessa.70(3):221-227.
- Villa F.B. 2007. Qualidade físico-química, microbiológica e resíduos de antimicrobianos em leite in natura comercializados informalmente em Brotas, SP.Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 121p.

Quadro 1. Medidas descritivas das variáveis quantitativas, da produção diária das propriedades (Litros), número de animais em lactação e produção média (Litros\vaca\dia), em amostras de leite comercializadas informalmente na região sudeste do estado de São Paulo, 2014

Leite Informal	Produção diária das propriedades (Litros)	Animais em lactação	Produção média diária (Litros\vaca\dia)
Mínimo	15	4	2
Mediana	66	10	5
Máximo	500	32	20
Média	100,6	13	6,1
Desvio Padrão	109,8	8,1	3,7

Quadro 2. Valor mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 da contagem de células somáticas e contagem bacteriana total em amostras de leite de vacas informalmente comercializados na Região Sudeste de estado de São Paulo, 2014

	Mín.	P25	Med.	Média	P75	Máx.	Acordo com IN-62 %	Desacordo com IN-62 %
CCS (x10 ³ /mL)	145,0	550,0	1199,0	2053,0	2874,0	9315,0	23	77
CBT (x10 ³ /mL)	61,0	1883,0	3515,0	3729,0	5335,5	9524,0	14	86

Mín = mínimo, P25 = percentil 25, P75 = percentil 75, Med.= mediana, Max = máximo, CCS = Contagem de Células Somáticas, cél/mL = células/mL, CBT= Contagem Bacteriana Total, UFC/ml = UFC/mL, P25 = percentil 25, P75 = percentil 75. Valores de referência segundo IN 62: máximo CCS 600.10³ cél/mL e CBT 600.10³ UFC/mL.

Quadro 3. Principais constituintes do leite informal comercializado na região sudeste do estado de São Paulo, divididos em valor mínimo, percentil 25, mediana, percentil 75 e respectiva adequação a IN-62, 2014

Variáveis	Mín.	P25	Med.	P75	Máx.	Acordo com IN-62 Número amostras (%)	Desacordo com IN-62 Número amostras (%)
ST (%\mm)	8,1	10,6	11,6	12,7	16,9	64%	36%
Proteína (%\mm)	2,5	3,0	3,2	3,3	3,9	77%	23%
Lactose (%\mm)	3,3	4,4	4,5	4,6	5,2	60%	40%
Gordura (%\mm)	1,2	4,4	4,5	4,6	5,2	62%	38%
ESD (%\mm)	6,7	8,4	8,7	8,8	9,7	57%	43%
NU (%\mm)	0,3	5,8	6,3	10,4	18,6	--	--*

ESD = extrato seco desengordurado, ST = sólidos totais, NU =nitrogênio uréico, Mín = mínimo, P25 = percentil 25, P75 = percentil 75, Máx. = máximo. Valores de referência IN-62: ST = 11, 0-2,5, Proteína = 2,9%, Lactose = 4,7-4,9, Gordura = 3,0%, ESD = 8,4%. *Parâmetro não incluso como indicador de qualidade de leite pela IN-62 Nitrogênio Uréico valor de referência 10 a 16mg/dl.

Quadro 4. Frequências absolutas (N) e relativas (%), e intervalos de confiança 95% (IC95%) para a presença de resíduos de antimicrobianos ou substâncias inibidoras da multiplicação de micro-organismos em amostras de leite informal, comercializados na região sudeste do estado de São Paulo 2014.

Leite informal	Presença de resíduos \ substâncias inibidoras						TOTAL	
	Negativo			Positivo				
	N	%	IC95%	N	%	IC95%	N	%
	41	41,0	31,8 -50,8	59	59,0	49,2 -68,1	100	33,3

Estatísticas: IC 95% = intervalo de confiança 95%, N = número, % = porcentagem.

Quadro 5. Micro-organismos isolados em amostras de leite comercializados informalmente na região sudeste do estado de São Paulo, 2014

Micro-organismos	Leite Informal
	Número de amostras/ Número total de linhagens (%)
<i>Streptococcus</i> sp.	47/240 (19,58%)
<i>Escherichia coli</i>	45/240 (18,75%)
<i>Enterobacter</i> sp.	31/240 (12,91%)
<i>Klebsiella</i> sp.	26/240 (10,83%)
<i>Staphylococcus</i> sp.	08/240 (3,33%)
<i>Nocardia</i> sp.	04/240 (1,66%)
<i>Pasteurella</i> sp.	02/240 (0,83%)
<i>Serratia</i> sp.	02/240 (0,83%)
<i>Proteus</i> sp.	04/240 (1,66%)
<i>Pseudomonas</i> sp.	04/240 (1,66%)
<i>Aspergillus</i> sp.	16/240 (6,60%)
<i>Candida</i> sp.	20/240 (8,33%)
<i>Geotrichum</i> sp.	14/240 (5,83%)
<i>Tricophyton</i> sp.	17/240 (7,08%)
<i>Prothoteca</i> sp.	01/240 (0,41%)

