

**MARIA IZABEL MERINO DE MEDEIROS**

**ASSOCIAÇÃO DE AGENTES PATOGÊNICOS  
ISOLADOS EM ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA  
ÁGUA, COM A PRESENÇA DE MASTITE CLÍNICA OU  
SUBCLÍNICA, EM PROPRIEDADES LEITEIRAS DA  
REGIÃO DE CERQUEIRA CÉSAR - SP**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**



**BOTUCATU**

**2005**

**MARIA IZABEL MERINO DE MEDEIROS**

**ASSOCIAÇÃO DE AGENTES PATOGÊNICOS  
ISOLADOS EM ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA  
ÁGUA, COM A PRESENÇA DE MASTITE CLÍNICA OU  
SUBCLÍNICA, EM PROPRIEDADES LEITEIRAS DA  
REGIÃO DE CERQUEIRA CÉSAR - SP**

**Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina Veterinária e Zootecnia da  
Universidade Estadual Paulista, Campus  
de Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre em Medicina Veterinária**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Souza**

**Botucatu – SP**

**2005**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Medeiros, Maria Izabel Merino de.

Associação de agentes patogênicos isolados em análise microbiológica da água, com a presença de mastite clínica ou subclínica, em propriedades leiteiras da região de Cerqueira César - SP / Maria Izabel Merino de Medeiros. – 2005.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2005.

Orientador: Luiz Carlos de Souza

Assunto CAPES: 50502050

1. Bovino – Doenças
2. Mastite em bovino - Etiologia

CDD 636.20896

Palavras-chave: Água; Bovino; Leite; Mastite



## **DEDICATÓRIA**

**Aos meus pais,**

**Alberto Antônio Ivo de Medeiros**

**Mercia Merino de Medeiros**

por me considerarem um presente de Deus...

me educarem com amor...

por entenderem e apoiarem minhas decisões...

cuidando para que estas sejam as melhores em minha  
vida.

Acreditaram nos meus sonhos e possibilitaram suas  
realizações.

**Eu amo vocês!**

**Aos meus irmãos**

**Kaliza Merino de Medeiros,**

**Alberto Antônio Ivo de Medeiros Filho**

peessoas diferentes, caminhos diferentes...

mas frutos do mesmo amor...

a nossa família, somos nós...

**a vocês, saúde, trabalho, amor e toda sorte...**

**A estes, meu sincero reconhecimento e gratidão,**

**E para os quais, peço permissão aos demais, para**

**Dedicar este trabalho...**



## **AGRADECIMENTOS**

## **AGRADECIMENTOS**

Sobretudo a **Deus** que é o grande responsável por todos os acontecimentos da minha vida, dando-me força para aceitar as coisas que não posso mudar, coragem para mudar aquelas que posso e sabedoria para distinguir uma das outras.

Por ocasião da apresentação desta dissertação, faz-se imprescindível externar publicamente sinceros agradecimentos à várias pessoas que possibilitaram que este trabalho fosse concluído a contento. Desta forma,

Ao meu amigo, professor e orientador **Dr. Luiz Carlos de Souza** pela confiança, compreensão, paciência e colaboração na minha vida profissional e acadêmica.

Ao meu pai **Alberto Antônio Ivo de Medeiros** pelo exemplo de honestidade e dignidade no trabalho.

A minha mãe **Mercia Merino de Medeiros** que me ensinou que tudo que é feito com amor sempre gera bons frutos.

Ao meu irmão **Alberto Antônio Ivo de Medeiros Filho** pelo seu exemplo de dedicação aos estudos e suas palavras de incentivo: “Vai estudar”.

A minha irmã **Kaliza Merino de Medeiros** pelo seu exemplo de profissionalismo e força.

Ao meu sobrinho **Murilo Medeiros Matthiesen** pelo amor mais puro que pode existir.

Ao meu primo **Dimas Chiari Sanches** pela torcida constante pelo meu sucesso e o amor de irmão.

Ao meu amigo, **Sr. Edson Ferraz de Oliveira** que pude contar sempre, pelo seu apoio nas coletas, dedicação e principalmente por me “ensinar os caminhos da possibilidade”.

Ao **Matheus J. Ribeiro**, que me incentivou e me deu força para que a parte prática fosse realizada, pela compreensão, amor e apoio.

Ao meu amigo e professor **Dr. Paulo F. Domingues** pela amizade, auxílio em todas as horas, por acreditar nos meus sonhos e pela colaboração no engrandecimento deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Antonio Carlos Paes** pela amizade, bons conselhos, incentivo e por abrir as portas do Laboratório de Diagnóstico de Enfermidades Infecciosas para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao meu amigo, **Fernando José Paganini Listoni**, por todas as vezes que me auxiliou nas minhas muitas dúvidas no laboratório, compartilhando sua experiência com dedicação e paciência.

Ao **Prof. Dr. Alcides de Amorim Ramos** pela colaboração e disposição para esclarecimentos sobre estatística.

A **Prof. Dra. Lisiane de Almeida Martins**, pela amizade, serenidade e colaboração no engrandecimento deste trabalho.

Aos demais **Professores do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ – Botucatu**, pelo convívio e colaboração a minha formação.

Ao curso de Pós-Graduação da FMVZ, pela oportunidade de fazer parte de seu corpo docente e especialmente a **Denise Aparecida Fioravante Garcia**, pelos préstimos e paciência durante esse período.

A todos os funcionários do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, **Sr. Humberto, Wanderley Da. Geni, Edi, Da. Maria, Rodrigo** e principalmente **Da. Zeza e a Adriana** pela ajuda na preparação do material de laboratório.

Ao laboratório **NUPEMAS** pelo auxílio na Contagem de Células Somáticas.

A Biblioteca da UNESP – Campus Botucatu na pessoa da bibliotecária **Rosemary Cristina da Silva**, pelo auxílio na revisão das referências e amizade.

Aos meus amigos e colegas de mestrado, **Liguito, Bárbara, Tamara, Luciany, Ana, Isabela, Francisco, Juliana, Marco Vigillato, Eliana, Vanessa, Sandia, Fabrícia, Silvio e Tatiana**, pelos momentos de alegria, amizade, boas conversas e coleguismo.

A **Maria Salete Sayão Salvia, Vicente Pires, Paulo de Souza, José Rafael de Souza, João Elemar Presser e seus familiares**, representando todos os proprietários dos sítios e fazendas visitadas, pela receptividade, colaboração e início de uma grande amizade.

Ao **SEBRAE – Botucatu, EDR (Botucatu e Avaré), técnicos da CATI e FEPAF – UNESP**, pela compreensão e possibilitar a associação do meu trabalho no SAI com meu mestrado.

Ao **Prof. Edivaldo Velini**, pela amizade, apoio, profissionalismo e por me ensinar a importância de ser tolerante.

Aos amigos de trabalho no SAI –Avaré, **José Henrique Piozzi da Silva, Francisco Galatti, Sônia Nunes, Fabiano Quaresma, Fábio Bengozi e Carlos Eduardo D. Silva** pelo apoio, amizade e incentivo nos momentos difíceis de conciliar trabalho e mestrado.

À minha equipe do SAI Botucatu, **Adriana P. Abdelnur, Giovana Furquim, Marco O. Morato de Oliveira, Ana Paula Z. Lombardi e Ednelson Bianchi** pela compreensão, apoio e amizade.

Ao **Tiago Mattosinho Corrêa**, pela amizade e por me ensinar muito sobre prioridades, força e escolhas nessa vida.

A **Elza Alves, Marcelo Corrêa e Pedro Henrique Alves Corrêa** pela grande amizade, incentivo para a finalização desta dissertação e colaboração na elaboração do abstract.

A todos os **meus amigos e familiares** que torceram e colaboraram para que este dia chegasse.

A todos os **estagiários e residentes** do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde pública, pelo apoio e incentivo.

E finalmente meu agradecimento a esta grandiosa **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus Botucatu** e ao **Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública**, que me acolheram em seus braços e embalaram os meus sonhos.

Não importa a ordem da lembrança, a posição profissional,  
o motivo, a relevância do auxílio prestado...

**Todos foram importantes...**

Àqueles que lembrei, deixo transcrito neste papel

Os meus sinceros agradecimentos...

Àqueles que por um lapso não fiz jus a esta seção,

**Fica consignado em meu coração,**

**O sentimento de gratidão**

**“Se não houver frutos,  
valeu a beleza das flores,  
se não houver flores,  
valeu a sombra das folhas,  
se não houver folhas,  
valeu a intenção da semente”.**

**(Henfil)**

## RESUMO

Este trabalho objetivou pesquisar a relação entre os microrganismos patogênicos isolados e identificados em água utilizada na ordenha, com o isolamento e identificação dos mesmos em amostras de leite, de quartos mamários apresentando mastite clínica ou subclínica nas mesmas propriedades. Foram utilizadas 16 propriedades rurais leiteiras, escolhidas aleatoriamente, na região de Cerqueira César – SP, que utilizavam ordenha mecânica. A água utilizada na ordenha foi classificada em relação à presença de coliformes totais e fecais, como: dentro dos padrões ou fora dos padrões de potabilidade humana. Nos resultados obtidos, 94% das amostras foram classificadas como fora dos padrões em relação a coliformes totais e fecais. Os microrganismos identificados foram: *Escherichia coli* (51%), *Enterobacter spp* (25%), *Enterobacter cloacae* (8%) *Edwardsiella tarda* (8%) e *Klebsiella oxytoca* (8%). Em relação ao leite, foram analisadas 373 amostras provenientes de vacas em lactação, com mastite clínica (n=19; 5%) e subclínica (n=354; 95%). Os animais com mastite subclínica foram identificados pela contagem de células somáticas (CCS), utilizando-se o aparelho eletrônico (Somacount 300, Bentley), onde a média observada foi de  $1.631 \times 10^3$  células/mL. Os principais microrganismos identificados foram: *Staphylococcus aureus* (30%), *Corynebacterium bovis* (23%) e *Staphylococcus spp* (15%). Conforme os dados obtidos, os agentes coliformes encontrados na água, utilizada na ordenha, não estavam presentes nas análises das amostras de leite dos quartos mamários com mastite clínica ou subclínica das respectivas propriedades, demonstrando não haver associação entre a qualidade da água e a ocorrência de mastite.

Palavras - chave: Bovinos; Mastite; Água; Leite.

## ABSTRACT

The aim of present study was to research the relation between isolated and identified pathogenic microorganisms on the water utilized in milking with isolation and identification of the ones on milk samples of teats showing clinic or subclinic mastitis. Sixteen milk farms were chose in a randomized way, in Cerqueira Cesar - SP town, that used mechanical milking. Water of the farms was classified in relation to presence of totals and fecal coliforms such as: in the standard or out of the standard of human potability. On the results obtained, 94% of the samples were classified as being out of the standards related to total and fecal coliforms. The identified microorganisms were *Escherichia coli* (51%), *Enterobacter spp* (25%), *Enterobacter cloacae* (8%), *Edwardsiella tarda* (8%) and *Klebsiella oxytoca* (8%). Related to the milk samples, 373 samples by cows in sukling were analyzed, presenting clinic mastitis (n=19; 5%) and subclinic mastitis (n=354; 95%). Animals presenting subclinic mastitis were identified by count of somatic cells (CSC), utilizing electronic equipment (Somacount 300 – Bentley), where the mean found was 1.631 thousand cells/mL. The main identified microorganisms were *Staphylococcus aureus* (30%), *Corynebacterium bovis* (23%) and *Staphylococcus spp* (15%). As according to the resulted obtained, coliforms agents found on the water, used in the milking, weren't present on the analysis of the milk samples of quarter presenting clinic or subclinic mastitis on the respective farms, showing that there wasn't an association between water quality and mastitis occurrence.

Keywords: bovine; mastitis, water, milk

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Microrganismos isolados nas amostras de leite com mastite clínica ou subclínica, das 16 propriedades estudadas, e o resultado das respectivas médias na Contagem de Células Somáticas ( $10^3$ cel/mL).....	54
--	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Mapa de localização da região de Cerqueira César / SP, onde foram realizadas as coletas (2002/2003).....	35
Figura 02. Caixa receptora da água de mina com mais de 50 anos .....	37
Figura 03. Os tubos de caldo bile verde brilhante semeados sendo incubados em estufa bacteriológica a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 e 48 horas $\pm 3$ horas ...	38
Figura 04. Tubos EC sendo incubados em banho maria a $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas $\pm 2$ horas.....	39
Figura 05. Resultado de semeadura com 0,1 mL dos tubos EC positivos de cada amostra em placas de meio de ágar base, adicionado 10% de sangue ovino e em ágar MacConkey .....	40
Figura 06. Exame de Tamis (“caneca de fundo negro”) .....	41
Figura 07. California Mastitis Test – CMT.....	42
Figura 08. Placas sendo incubadas a $37^{\circ}\text{C}$ com observação do desenvolvimento microbiano às 24, 48, e 72 horas.....	43
Figura 09. Somacount 300 – Bentley do Núcleo de Pesquisa em Mastites - NUPEMAS, FMVZ – UNESP - Campus de Botucatu .....	44
Figura 10. Origem das amostras das fontes de água .....	47
Figura 11. Características de potabilidade humana das fontes de água.....	48
Figura 12. Características de potabilidade humana da água utilizada na ordenha .....	48
Figura 13. Agentes bacterianos isolados nas amostras positivas de água utilizada na ordenha .....	49
Figura 14. Situação geral dos 1692 tetos estudados .....	50
Figura 15. Distribuição da porcentagem de mastite clínica e subclínica .....	50

Figura 16. Resultado das análises microbiológicas de amostras de leite de tetos positivos para mastite clínica ou subclínica. (CMT) .....	51
Figura 17. Principais agentes patogênicos isolados em amostras de leite de tetos positivos para mastite .....	52
Figura 18. Média de células somáticas por mL de leite dos principais agentes isolados .....	53

## SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
3. OBJETIVOS.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1 Plano de Amostragem.....	35
4.2 Análise da Água.....	36
4.3 Animais.....	41
4.4 Diagnóstico da mastite.....	41
4.5 Análise Microbiológica do Leite.....	42
4.6 Contagem de Células Somáticas.....	43
4.7 Metodologia Estatística.....	45
5. RESULTADOS.....	46
5.1 Água.....	47
5.2 Leite.....	49
6. DISCUSSÃO.....	55
7. CONCLUSÕES.....	61
8. REFERÊNCIAS.....	63



# 1. INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

Mais de um milhão de produtores no Brasil dedicam-se parcial ou integralmente à atividade leiteira, gerando mais de quatro milhões de empregos diretos, representando 15% da população rural do país. A atividade leiteira é a maior geradora de empregos permanentes no campo e a única atividade que exige a presença do homem todos os dias do ano evitando assim o êxodo rural. Investir em pesquisas que auxiliem a cadeia leiteira, portanto, não visa apenas o crescimento econômico, mas tem um importante efeito nos indicadores sociais. A pecuária leiteira esta passando por um processo de transformação acelerado pela globalização da economia. A tendência atual do mercado é o pagamento por qualidade do leite que sabemos ser considerado, pelas suas características nutritivas, como alimento importante para o homem e de aceitação quase universal. Um novo informativo publicado em janeiro de 2004 no *American Journal of Hypertension* sugere que servir três a quatro porções de produtos lácteos por dia pode levar a uma economia de mais de US\$ 200 bilhões nos custos com saúde nos Estados Unidos para os próximos cinco anos. Esta publicação está baseada em uma revisão de mais de cem estudos nos últimos vinte anos. Cabe ressaltar que o tratamento de diversas enfermidades, como hipertensão, diabetes tipo dois, doenças cardíacas, pedras nos rins, osteoporose, câncer de cólon e de reto, obesidade e complicações na gestação, custa aproximadamente US\$ 264 bilhões por ano aos programas de saúde daquele país (MCCARRON & HEANEY,2004).

A inocuidade dos alimentos é sumamente importante já que afeta tanto a economia como a saúde pública (CASTILLO, 2004). O dicionário Aurélio conceitua “qualidade” como “propriedade, atributo ou condições das coisas, capaz de distingui-las das outras e de lhes determinar a natureza. Numa escala de valores, qualidade permite avaliar e, conseqüentemente, aprovar, aceitar ou recusar qualquer coisa”.

Diante desta situação, as questões de manejo sanitário do rebanho leiteiro é o principal fator para obtenção de um produto final com todos os requisitos de qualidade. A mastite é sem dúvida um dos mais importantes problemas sanitários que afeta a produção leiteira. Determina perdas devido à redução na produção de leite, diminuição de sua qualidade, gastos com medicamentos, honorários profissionais além do descarte em muitos casos do leite e dos animais. Sua etiologia é bastante diversificada e pode apresentar-se sob as formas de mastite clínica ou subclínica, esta última de maior importância, pois pode permanecer quiescente no rebanho sem apresentar alterações macroscópicas no úbere e no leite. Sabemos que vários fatores contribuem para a sanidade do rebanho e dentre eles a qualidade da água é fundamental, pois mesmo sendo elemento ideal para limpeza e dessedentação dos animais poderá contribuir como veículo de impurezas bem como de microrganismos patogênicos. Com base nestes aspectos, este trabalho objetivou pesquisar a relação entre os microrganismos patogênicos isolados e identificados em água utilizada na ordenha, com o isolamento e identificação dos mesmos em amostras de leite, de quartos mamários apresentando mastite clínica ou subclínica nas mesmas propriedades.



## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

Em nosso país, a água como veículo de enfermidades já era motivo de preocupação nos fins do século XIX, como pode ser visto nessa citação de Oswaldo Cruz que consta em sua tese de doutoramento defendida em 1892: “É facto inconcusso, de observação diária e que está firmemente enraizado no espirito de todos que, interessando-se pela saúde e vida de seus semelhantes, se dedicam aos estudos da hygiene que a agua pode ser considerada vector de molestias que reconhecem como causa primitiva o“*micróbio*”. Porém, a despeito de assim o ser vamos no correr d’este trabalho, ora utilizando-nos das observações e experimentações de outros, ora das nossas, provar mais uma vez a veracidade d’este facto, procurando mostrar até que ponto intervem este meio na produção das molestias, mostrando quanto é necessario que sobre este assumpto se dirijam as vistas d’aquelles que velam pela saúde pública, porquanto, como é notorio e sabido a agua é constantemente usada pelo homem tanto como alimento como para diferentes misteres de sua vida” (CRUZ, 1892). A qualidade da água é um fator importante que deve ser considerado no processo de produção animal. A água de baixa qualidade afeta consideravelmente o desempenho produtivo dos animais. São inúmeras as impurezas que se encontram nas águas naturais, várias delas inócuas, poucas desejáveis e algumas extremamente perigosas. Entre as impurezas nocivas encontram-se vírus, bactérias, parasitas, substâncias tóxicas e até mesmo, elementos radioativos (RICHTER & AZEVEDO NETTO, 1991).

A água pura é um líquido incolor, inodoro, insípido e transparente. Entretanto, por ser ótimo solvente, nunca é encontrada em estado de absoluta pureza, contendo várias impurezas, que vão desde alguns miligramas por litro na água da chuva a mais de 30 mil miligramas por litro na água do mar. Dos 103

elementos químicos conhecidos, a maioria é encontrada de uma forma ou de outra nas águas naturais (RICHTER & AZEVEDO NETTO, 1991).

A contaminação da água geralmente se dá pela incorporação de resíduos, principalmente excretas humanas e animais. A contaminação fecal da água potável pode incorporar uma variedade de organismos patogênicos intestinais, sejam eles bacterianos, virais ou parasitários (OPAS, 1987).

Mesmo que a água apresente características organolépticas (cor, sabor, odor) dentro dos padrões normais, isto não garante que ela possa ser considerada potável, pois pode estar sofrendo alguma contaminação por agentes microscópicos, por exemplo (OPAS, 1987).

Segundo Souza & Cortês (1992), a água utilizada para dessedentação de animais pode ser poluída por águas residuárias e excretas de origens animal e humana e tornar-se importante veículo de transmissão de enfermidades. Em muitos casos, a água é tida como uma das principais vias de transmissão de agentes causadores de doenças para os animais domésticos, principalmente bovinos, suínos e aves, as quais segundo Souza et al. (1983), representam fatores importantes à economia e à saúde pública, pois podem acarretar prejuízos econômicos, às vezes elevados, e muitos dos seus agentes causais podem ser transmitidos ao homem.

Devido à necessidade de realizar um controle da qualidade microbiológica da água e a dificuldade que seria o isolamento de cada patógeno em separado, alguns foram eleitos como indicadores de contaminação. Os indicadores bacteriológicos estão associados com a demonstração de contaminação da água por excretas de animais de sangue quente. Os principais indicadores utilizados para exame da água são: coliformes totais, coliformes fecais, estreptococos fecais, todos indicadores de contaminação fecal. Para avaliar a qualidade sanitária da água potável, também é pesquisada a presença de *Pseudomonas aeruginosa* (OPAS, 1987).

Os coliformes são bacilos Gram negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos. Estas bactérias normalmente habitam os intestinos dos animais e sua presença na água indica a possibilidade de contaminação fecal e a possível presença de microrganismos patogênicos, sendo classificados em totais e fecais. Os mesmos são representados pelos gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. As bactérias que são exclusivamente de origem fecal são as da espécie *Escherichia coli* (CHRISTOVÃO, 1977).

Os microrganismos encontrados na água podem ser originados do solo, fezes ou matéria orgânica e segundo Amaral et al. (1995), em muitas propriedades rurais ocorre a disposição inadequada de resíduos orgânicos oriundo das atividades humana e animal, fato que propicia a contaminação da água, além das características de ubiquidade de determinados microrganismos, que também contribuem para a contaminação das fontes de água.

No que se refere aos padrões microbiológicos de potabilidade da água de consumo animal, a resolução N° 26 do Conselho Nacional do Meio Ambiente estabelece os limites de 20.000 coliformes totais 100/mL e 4.000 coliformes fecais/100mL (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 1986; SOUZA & MEIRA, 1982).

Analisando 28 amostras de água de bebida utilizada para dessedentação dos animais do município de Botucatu - SP, em apenas uma amostra verificaram índice colimétrico alterado – acima de 4.000 coliformes fecais/100 mL de água. Souza et al. (1983), em outro trabalho, verificaram que de 61 amostras de água analisadas em Botucatu, SP, Pardinho, SP e Itatinga – SP, 6 apresentaram índice acima de 4.000 coliformes fecais/100 mL de água. A contaminação de águas subterrâneas por bactérias indicadoras de poluição fecal tem sido verificada em diversos países o que evidencia a qualidade inadequada dessas águas, independente da localização das fontes. Amaral et al. (1994), analisando amostras de água de poços rasos, localizados na zona urbana do

município de Jaboticabal/SP, encontraram 92,1% das amostras fora dos padrões microbiológicos de potabilidade para consumo humano.

Análises de águas de diferentes fontes, realizadas em Araraquara - SP, por Falcão et al. (1993) revelaram que as únicas águas não contaminadas por coliformes fecais foram águas tratadas e as de poços artesianos. Coliformes fecais foram encontrados em 100,0% das amostras de rios, em aproximadamente 93,0% de amostras de reservatórios, em 50,0% das amostras de nascentes naturais e 44,5% das amostras de poços não artesianos. Todas as amostras contendo coliformes fecais também demonstravam contaminação por *Escherichia coli*. Tendo em vista o fato da *Escherichia coli* constituir-se na bactéria aeróbia mais comum do trato intestinal dos homens e animais, este microrganismo tem sido tradicionalmente utilizado como indicador de contaminação fecal na água e nos alimentos (ELEY, 1992). Neste sentido, tem sido constante a preocupação com a tentativa de isolamento destes microrganismos tanto no leite como em seus derivados, pois a contaminação destes alimentos pode estar relacionada com a ocorrência de surtos de gastroenterites em humanos (WIGHT et al., 1997).

Como toda enfermidade a mastite bovina é multifatorial, resultante da integração entre agente etiológico, meio ambiente e hospedeiro susceptível (ANDERSON, 1979). A mastite caracteriza-se por alterações físicas, químicas e bacteriológicas no leite e patológicas do tecido da glandular mamário (LANGONI et al., 1998). Muito prevalente na vaca leiteira, especialmente quando os animais sofrem estresse, como no período periparto (KEHRLI, 2002). A mastite apresenta distribuição mundial tendo um impacto considerável sobre o rendimento econômico das explorações leiteiras, podendo ser considerada como a mais importante de todas as enfermidades que afetam o gado leiteiro, caracterizada pela complexidade etiológica. Dentre os microorganismos envolvidos destacam-se os de origem bacteriana (LANGONI, 1995), e em menor frequência fungos (LANGONI & ROSA, 1995) e algas (COSTA et al.,

1992; LANGONI et al., 1992). Nos últimos anos estes agentes foram condicionalmente classificados em contagiosos e ambientais, de acordo com seu habitat e forma de transmissão.

A secreção da glândula mamaria de um animal saudável é estéril, portanto a detecção de um patógeno em uma amostra assepticamente colhida é indicativo de infecção (BRAMLEY, 1992).

As bactérias Gram-negativas da família *Enterobacteriaceae* embora com prevalência menor, podem estar envolvidas na etiologia das mastites e em algumas situações, originando surtos como ocorrem com as mastites ambientais, as quais são causadas por coliformes, influenciando na qualidade do leite. O leite para saúde pública tem grande importância principalmente pela veiculação de microrganismos patogênicos e suas toxinas (SILVA, 1999).

Os agentes ambientais são oportunistas e estão presentes no ambiente que o animal vive, inclusive na água e a infecção pode ocorrer tanto no período entre ordenhas ou durante a ordenha (BRAMLEY & DODD, 1984; MCDONALD, 1984; SMITH et al., 1985; SANDHOLM et al., 1990; CULLOR, 1993; COSTA, 1998).

Neste grupo, encontram-se os coliformes, sendo que os mais patogênicos são as *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, e *Klebsiella pneumoniae*. A prevalência deste tipo de mastite teve considerável aumento nos últimos anos, sendo uma preocupação para a indústria de laticínios e pesquisadores. Estes microrganismos, segundo Hogan et al. (1989), são as principais causas de mastites clínicas em rebanhos bem manejados que apresentam baixas contagens de células somáticas.

A água utilizada no ambiente de ordenha para limpeza, tanto dos tetos dos animais como dos equipamentos de ordenha (coletores, ordenhadeiras mecânicas, baldes, etc) pode atuar como via de transmissão destes microrganismos para a glândula mamária, bem como comprometer a qualidade do leite, uma vez que a água, com alta contagem de bactérias, utilizada na

limpeza dos equipamentos, possibilita a veiculação da população bacteriana diretamente para o leite quando este entra em contato com as superfícies contaminadas. As chuvas favorecem a contaminação ambiental, expondo o teto a um maior número de bactérias (BRAMLEY & NEAVE, 1975) e muitas vezes gera a contaminação da própria água utilizada na produção de leite que pode ser veículo potencial de agentes mastitogênicos (AMARAL et al., 1995). Pelo fato da água poder atuar como via de transmissão de microrganismos patogênicos para glândula mamária, nos últimos anos, tem sido estudada esta possibilidade por vários autores. Robinson (1987), referiu que a água utilizada para lavar os tetos dos animais, quando muito contaminada por *Pseudomonas sp.* e coliformes, pode ser responsabilizada por surtos de mastite por estes microrganismos. Embora não exista padrão específico para a água empregada com a finalidade de higienização dos animais e equipamentos de ordenha. O mesmo autor, concluiu em seu estudo ser necessário que este produto apresente características bacteriológicas semelhantes às da água com potabilidade humana, ou seja, menos de 2 coliformes totais /100 mL de água.

Os microrganismos em contato com o leite, rico em nutrientes, podem multiplicar-se de maneira significativa, depreciando a qualidade do produto. Nos Estados Unidos, segundo normas de produção de leite pasteurizado, a água utilizada na produção de leite também possui características de potabilidade humana (WILLERS et al., 1999).

Hutabarat et al. (1986), que em estudo realizado na Indonésia, verificaram associação entre o uso de água de boa qualidade microbiológica na produção de leite e a baixa porcentagem de mastite nos rebanhos estudados (22,4%) em comparação com propriedades com água de má qualidade (38,0%).

Lunder & Breenne (1996) em estudo realizado sobre a qualidade de leite cru produzido na Noruega, afirmam que a contagem bacteriana da água utilizada na higiene da produção de leite tem grande influência na contagem bacteriana do mesmo. Assim, deve-se dar importância para a qualidade da água

a ser utilizada na higienização de equipamentos e do úbere dos animais, durante o processo de produção de leite, uma vez que ela pode constituir-se numa fonte de microrganismos, que em contato com o leite, rico em nutrientes, pode ter seu número aumentado de maneira significativa depreciando a qualidade do produto.

Las Heras et al. (1999), descreveram surto de mastite aguda em 33 ovelhas na Espanha, por *Pseudomonas aeruginosa*, cuja provável origem da contaminação foi o equipamento de ordenha, que era higienizado com água contaminada. Úberes úmidos contribuem para que a água contaminada por bactérias escoe em direção da extremidade distal do teto e desça ao coletor de leite, prejudicando a qualidade do leite e aumentando a possibilidade de infecção intramamária (SMITH et al., 1985).

Bottino & Hipólito (1973), analisando 500 amostras de *Escherichia coli*, isoladas do leite de animais mastíticos na região do Vale do Paraíba (SP), encontraram uma frequência de amostras de *Escherichia coli* consideradas enteropatogênicas para gastroenterites infantil da ordem de 24,2% com predominância do tipo sorológico O119:B14. Desta informação se confirma novamente o papel relevante do leite como veículo de microrganismos potencialmente patogênicos para o homem.

Ribeiro (2001), verificou diferentes fatores de virulência com relevância em saúde pública identificados nos animais com mastite por *Escherichia coli*, destacando-se a produção de fator necrosante citotóxico e resistência múltipla aos antimicrobianos, bem como a detecção de cepas reagentes para sorogrupos EPEC e EIEC, reconhecidamente patogênicos para o homem.

Alguns tipos capsulares de *Klebsiella sp.* estão relacionados com a etiologia das mastites bovinas. Braman et al. (1973), reconheceram 33 tipos em 61 cepas de *Klebsiella pneumoneae* isoladas de leite proveniente de 12 rebanhos estudados, sendo que 50 (81,9%) delas foram obtidas de casos de mastite clínica e 11 (18,1%), provenientes de amostras de leite de tetas normais. Eles puderam

observar em um único rebanho 13 tipos capsulares diferentes. Biancard & Guglieimetti (1982), relataram a ocorrência de mastite bovina aguda do tipo parenquimatosa por este agente. Os resultados de Sarma & Boro, (1980), revelaram o isolamento de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* em 20,0% e 10,0%, respectivamente das amostras de leite provenientes de casos de mastite clínica. Bishop et al. (1980), também assinalaram o encontro de 30,0% de *Escherichia coli*, entre outros patógenos isolados.

A água também pode ser responsável pela veiculação do *Staphylococcus aureus* que é provavelmente o agente mais isolado em casos de mastite (FERREIRO, 1978). A infecção da glândula mamária por *Staphylococcus* coagulase negativa é de alta incidência e longa duração, e pode afetar a composição e a produção do leite. Esses fatores justificam a atenção dada a esses microrganismos como agentes etiológicos da mastite bovina (TIMMIS & SCHULTZ, 1987).

Existe um aumento do risco de ocorrer mastite por *Staphylococcus aureus* quando utiliza-se água não tratada no processo de obtenção do leite ou quando a água de lavagem do úbere está contaminada por coliformes (SCHUKKEN et al., 1991). Alguns microrganismos do gênero *Staphylococcus* constituem risco para a população consumidora de leite e seus subprodutos provenientes de animal com mastite. Algumas cepas podem produzir toxinas termoestáveis e provocar intoxicação alimentar, principalmente, em crianças e idosos (MELCHÍADES et al., 1993).

Também a água utilizada na lavagem de equipamentos pode ser importante fonte de contaminação do leite por *Staphylococcus aureus* (ADESIYUN et al., 1997). A importância da água na transmissão da mastite é enfatizada pelo fato de o *Staphylococcus aureus* e os *Staphylococcus* coagulase-negativa nela sobreviverem por 30 dias e a *Escherichia coli*, também importante agente etiológico da mastite, por 300 dias (FILIP et al., 1988). Há relatos de isolamento de *Staphylococcus aureus* em 20 (6,0%) das 320 amostras de água

utilizada na obtenção de leite, sendo 40,0% delas enterotoxigênicas (LECHEVALLIER & SEIDLER, 1980).

O *Staphylococcus aureus* e os *Staphylococcus* coagulase-negativa foram isolados em porcentagens relativamente baixas das amostras de água utilizada nas propriedades leiteiras. Entretanto, a água utilizada no processo de obtenção do leite pode ser fonte potencial de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antimicrobianos comumente utilizados no tratamento da mastite bovina. Isso evidencia a necessidade de controlar a qualidade da água para auxiliar no controle da mastite e diminuir os riscos de intoxicações alimentares (AMARAL et al., 2003).

Nader Filho et al. (1984), pesquisando a flora aeróbica na mastite subclínica em rebanhos leiteiros, no município de Jaboticabal (SP), embora tenham observado maior frequência dos estafilococos e dos estreptococos, obtiveram o isolamento de *Escherichia coli* em 10,0% inclusive associada com *Streptococcus sp.* em 2,0% das amostras.

Langoni et al. (1985), apontaram a *Klebsiella pneumoniae*, como responsável por surto de mastite bovina, no qual, de 86 vacas em lactação, 150 amostras de leite foram positivas ao teste de Whiteside, isolando-se exclusivamente o agente de 90 amostras (60,0%) dos 42 (48,8%) animais positivos. Em 17 cultivos de leite negativos à prova de Whiteside, também se isolou o mesmo microrganismo em estado puro.

Nicholls & Barton (1981), isolaram *Serratia liquefaciens* de caso de mastite clínica. Outra espécie, a *Serratia marcescens* é citada como agente de mastite subclínica e clínica (WILSON et al., 1990; BALDASSI et al., 1986). Langoni et al. (1998), assinalam o envolvimento das duas espécies em casos de mastites subclínica e clínica.

Binde & Hermansen (1982), isolaram *Hafnia alvei* de vaca com mastite crônica em cultura pura. Da mesma forma Langoni (1995), obteve o seu isolamento de casos de mastites subclínicas e clínicas. A bactéria *Aeromonas*

*hydrophila* é relatada como agente em surto de mastite, onde de 1232 vacas, 82 (6,6%) estavam infectadas, com o seu isolamento em 55 (75,3%) dos 73 tetos acometidos (BERGMAN et al., 1981).

Matsunaga et al. (1992) enfatizaram o papel das bactérias Gram-negativas isoladas de amostras de leite mastíticos procedentes de 66 propriedades no Japão. As espécies predominantes foram *Escherichia coli* 11,1%, *Klebsiella pneumoniae* 9,7%, *Enterobacter agglomerans* 5,5%, *Acinetobacter lwoffii* 9,7%, *Pseudomonas putida* 6,9%, *Pseudomonas fluorescens* 4,2%, *Alcaligenes faecalis* 4,2% e *Moraxela urethralis* 4,2%.

Pesquisadores concordam que o controle da mastite depende mais da prevenção do que de tratamentos, e o desenvolvimento de novas estratégias para prevenir a enfermidade é imprescindível para a produção leiteira do futuro. (PEORALA, 2002; SORDILLO & SCOTT, 1995).

Algumas práticas mais freqüentemente recomendadas em programa de controle de mastite são: verificar a qualidade da água utilizada na propriedade, higienização dos tetos através da lavagem e secagem antes das ordenhas, manutenção regular do equipamento de ordenha, uso de anti-sépticos após a ordenha, ordenhar por último os animais infectados, tratamento apropriado dos casos clínicos, tratamento com antibiótico de todas as vacas na secagem e descarte de vacas com mastites crônicas recidivantes (NATZKE, 1981; PHILPOT, 1984; GILL et al., 1990; DEGRAVES & FETROW, 1993; MORIN, 1993; KIRK et al., 1994; COSTA, 1998).



### **3. OBJETIVOS**

### 3. OBJETIVOS

Considerando:

Os prejuízos causados com a mastite bovina e a importância da água como transmissora de agentes patogênicos causadores de mastite;

A importância da mastite por agentes ambientais no contexto da saúde pública;

O pouco conhecimento dos produtores de leite sobre a qualidade da água utilizada nas propriedades no consumo familiar e na produção de leite;

Realizou-se o presente estudo objetivando:

- Verificar a qualidade microbiológica da água utilizada em 16 propriedades leiteiras tecnificadas da região de Cerqueira César – SP, pelo isolamento e identificação dos agentes patogênicos.
- Isolar e identificar agentes patogênicos de amostras de leite proveniente de quartos mamários apresentando mastite clínica ou subclínica nas mesmas propriedades.
- Associar os resultados obtidos para definir a possível influência da qualidade da água com a ocorrência de mastites clínicas ou subclínicas, principalmente relacionadas a enterobactérias nas propriedades.



## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Plano de Amostragem

Foram analisadas 16 propriedades rurais leiteiras, tecnificadas escolhidas aleatoriamente, na região de Cerqueira César – SP que utilizavam ordenha mecânica, no período de novembro de 2002 a fevereiro de 2003.



Figura 01. Mapa de localização da região de Cerqueira César / SP, onde foram realizadas as coletas (2002/2003).

## 4.2 Análise da Água

Foram colhidas duas amostras de água de cada uma das 16 propriedades rurais, sendo que uma amostra foi colhida diretamente da torneira que disponibiliza esta água para uso na sala de ordenha e outra na fonte de onde esta água se originava e era captada pela propriedade, totalizando assim 32 amostras. Os resultados das análises da água classificaram as propriedades em relação à presença de coliformes totais e fecais como: dentro dos padrões ou fora dos padrões de potabilidade humana (menos de 2 coliformes totais /100 mL de água).

Para a colheita das amostras foram utilizados frascos de vidro estéreis, boca larga, capacidade de 250 mL e volume de 100 mL, contendo em seu interior 0,2 mL de uma solução de 10% de Tiosulfato de Sódio mais 0,6 mL de uma solução de 15% de EDTA. Antes de proceder a colheita das amostras de água, as torneiras, no caso da sala de ordenha, foram abertas deixando-se escoar livremente a água durante cerca de cinco minutos. Após, as torneiras foram fechadas e flambadas. Em seguida, foram abertas e colhidas as amostras em frascos estéreis, já citados.

A colheita efetuada nas fontes de captação da água está conforme os padrões da APHA (1992), onde as amostras devidamente identificadas foram transportadas em caixas de isopor e mantidas sob refrigeração até a chegada ao laboratório, sendo processadas imediatamente. O tempo decorrido entre a colheita e o início dos exames não excedeu em seis (6) horas.



Figura 02. Caixa receptora da água de mina com mais de 50 anos.

A técnica utilizada para as análises da água foi a de tubos múltiplos (APHA, 1992).

Para determinação de bactérias coliformes da água bruta foram inoculados 10 mL, respectivamente, em cinco tubos contendo caldo lactosado (DIFCO ou similar), concentração dupla e com tubos de Duhram em seu interior. Da mesma água bruta foram inoculados 1 mL, respectivamente, em cinco tubos contendo caldo lactosado (DIFCO ou similar) concentração simples e com tubos de Duhram em seu interior. Após, foram realizadas diluições ( $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ ) e mais se houvesse necessidade, sendo o diluente, água fosfatada, pH 7,2 esterilizada e foram inoculados com 1 mL cada, respectivamente, cinco tubos contendo caldo lactosado (DIFCO ou similar) concentração simples com tubos de Duhram em seu interior.

Para a determinação dos coliformes totais (prova presuntiva), os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Foram realizadas leituras após 24 horas e 48 horas  $\pm 2$  horas e a partir dos tubos com produção de gás nos tubos de Duhrum procedeu-se a prova de confirmação para coliformes totais, realizando-se sementeiras em caldo bile verde brilhante (DIFCO ou similar), utilizando-se alça de níquel cromo com 3 mm de diâmetro. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 24 e 48 horas  $\pm 3$  horas. Foram considerados positivos os tubos que apresentaram produção de gás nos tubos de Duhrum após incubação. Das porções positivas e utilizando-se a tabela dos Números Mais Prováveis de Hoskins (APHA, 1992), determinou-se o NMP / 100 mL de bactérias coliformes totais da amostra e comparado com os padrões oficiais vigentes (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 1986).



Figura 03. Os tubos de caldo bile verde brilhante sementeados sendo incubados em estufa bacteriológica a  $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 24 e 48 horas  $\pm 3$  horas.

Para a determinação de bactérias coliformes fecais, a partir dos tubos positivos na prova presuntiva, realizou-se sementeiras em caldo EC (DIFCO ou similar), utilizando-se alça de níquel cromo, com 3mm de diâmetro. Os tubos positivos foram incubados em banho maria a  $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas  $\pm$  2 horas. Foram considerados positivos, para coliformes fecais, os tubos que revelaram produção de gás nos tubos de Durham, após a incubação. Das porções positivas e utilizando-se a tabela dos Números Mais Prováveis de Hoskins (APHA, 1992), determinou-se o NMP / 100 mL de bactérias coliformes fecais da amostra e comparado com os padrões oficiais vigentes (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 1986).



Figura 04. Tubos EC sendo incubados em banho maria a  $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas  $\pm$  2 horas.

Para o isolamento dos agentes dos tubos positivos foram semeados 0,1 mL de cada amostra positiva em placas de meio de ágar base, adicionado 10% de sangue ovino e em ágar MacConkey. As placas foram incubadas a 37°C com observação do desenvolvimento microbiano às 24, 48, e 72 horas. Os microrganismos foram identificados segundo as características morfotintoriais (coloração de Gram), bioquímicas e de cultivo (CARTER & COLE JÚNIOR, 1990).

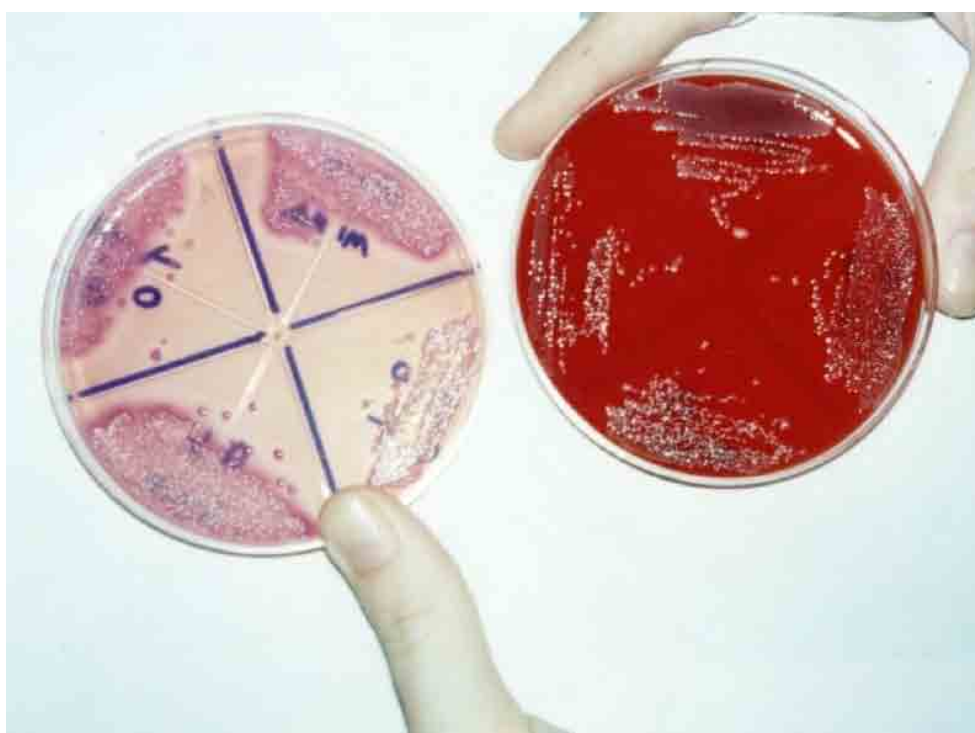


Figura 05. Resultado de semeadura com 0,1 mL dos tubos EC positivos de cada amostra em placas de meio de ágar base, adicionado 10% de sangue ovino e em ágar MacConkey.

### 4.3 Animais

Em relação ao leite, foram analisadas amostras de 423 vacas em lactação, primíparas e multíparas, em diferentes fases de lactação, mestiças das raças Holandês preto e branco, Gir, Girolando, Pardo Suíço e Jersey, com quartos positivos para mastite clínica ou subclínica, desconsiderando os quartos em tratamento e afuncionais. Os animais que se encontravam em período colostrado e em fase de secagem não foram incluídos no grupo de estudo.

### 4.4 Diagnóstico de mastite

Os animais foram submetidos, antes da ordenha, pela manhã ou à tarde, ao exame de Tamis (“caneca de fundo negro”), após a lavagem dos tetos com água, anti-sepsia com iodóforo comercial e secagem dos mesmos com papel toalha descartável, para a detecção de mastite clínica (BLOOD & RADOSTITS, 1991).



Figura 06. Exame de Tamis (“caneca de fundo negro”).

Os casos de mastite subclínica foram identificados pelo California Mastitis Test – CMT, segundo SCHALM & NOORLANDER (1957) e pela contagem de células somáticas (CCS), em aparelho eletrônico (Somacount 300 – Bentley).



Figura 07. California Mastitis Test – CMT.

#### **4.5 Análise Microbiológica do Leite**

As amostras colhidas foram enviadas e processadas no Laboratório de Serviço de Diagnóstico Bacteriológico e Micológico da Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais e no Laboratório do Serviço de Epidemiologia e Saneamento, pertencentes ao Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu, SP.

Antes da colheita das amostras de leite, foram realizadas as assepsias dos óstios dos tetos com álcool a 70%. O leite foi colhido em frascos estéreis devidamente identificados e em volume de 10mL. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas, contendo gelo reciclável e imediatamente encaminhadas ao laboratório. Foram realizadas sementeiras com 0.1 mL de cada amostra em placas de meio de ágar base, adicionado 10% de sangue ovino e em ágar MacConkey. As placas foram incubadas a 37°C com observação do desenvolvimento microbiano às 24, 48, e 72 horas. Os microrganismos foram identificados segundo as características de cultivo morfotintoriais (coloração de Gram) e bioquímicas (CARTER & COLE JÚNIOR, 1990).



Figura 08. Placas sendo incubadas a 37°C com observação do desenvolvimento microbiano às 24, 48, e 72 horas.

#### 4.6 Contagem de Células Somáticas

Para determinação da CCS, foram colhidas amostras compostas dos quatro tetos para animais negativos no CMT, e individual dos tetos positivos no CMT, em volume aproximado de 50 mL, utilizando frascos de plástico apropriados contendo como conservante Bronopol. Após a colheita, as amostras foram homogeneizadas e encaminhadas ao laboratório do Núcleo de Pesquisa em Mastites - NUPEMAS, do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP - Campus de Botucatu, para serem analisadas em um prazo de até sete dias. A Contagem de Células Somáticas de amostras de quartos sadios é normalmente menor que 300.000 células/mL. Níveis acima deste valor indicam condição anormal do quarto estudado.



Figura 09. Somacount 300 – Bentley do Núcleo de Pesquisa em Mastites - NUPEMAS, FMVZ – UNESP - Campus de Botucatu.

#### **4.7 Metodologia Estatística**

Baseado na qualidade da água, as propriedades foram classificadas como dentro e fora dos padrões de potabilidade humana para coliformes totais e fecais. Em cada propriedade foram amostrados animais com mastite clínica ou subclínica. Para cada agente patogênico isolado e identificado na água foram observadas as proporções de animais positivos em cada uma das propriedades anteriormente classificadas com os mesmos agentes. A comparação entre tais proporções observadas, que indicaram possível associação principalmente com coliformes fecais, foi realizada pela aplicação do teste do Qui - quadrado ao nível de 5% de significância (ZAR, 1996).



## **5. RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Água

Na Figura 10, observa-se a distribuição das fontes de água utilizadas na ordenha, procedentes das 16 propriedades sendo advindas de minas (57%), poços (31%), rios (6%) e tratadas (6%).

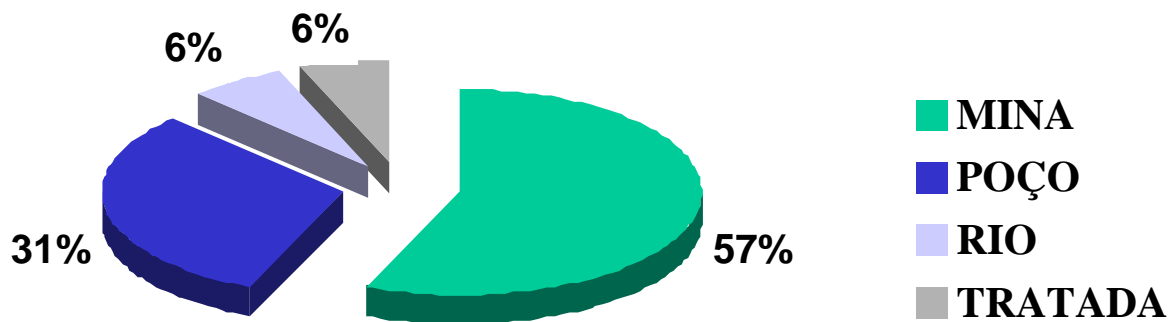


Figura 10. Origem das amostras das fontes de água.

Após a análise das fontes de água, verifica-se na Figura 11 que 56% das amostras estavam fora dos padrões de potabilidade humana e que 44% se apresentaram dentro dos padrões. A bactéria *Escherichia coli* foi isolada em todas as amostras consideradas fora dos padrões de potabilidade.

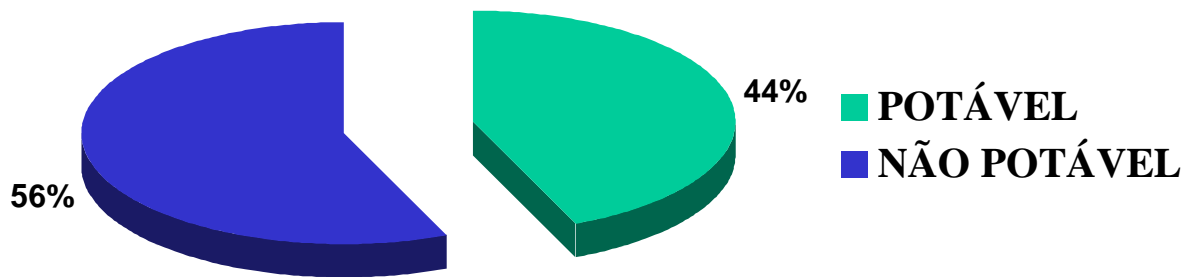


Figura 11. Características de potabilidade humana das fontes de água.

Na Figura 12, verifica-se que 94% da água utilizada na ordenha estavam fora dos padrões de potabilidade humana, e apenas 6% foram consideradas potáveis.

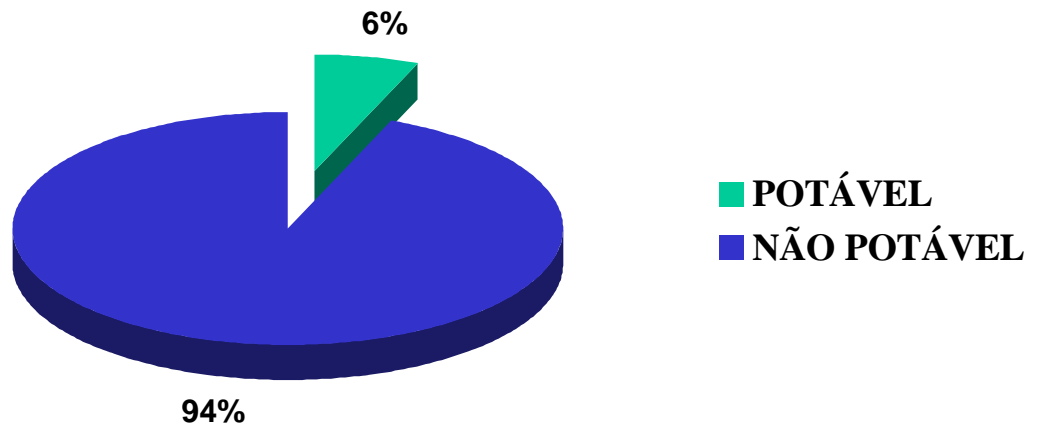


Figura 12. Características de potabilidade humana da água utilizada na ordenha.

Pode-se verificar na Figura 13 os principais microrganismos isolados nas amostras de água: *Escherichia coli* (51%), *Enterobacter cloacae* (8%), *Enterobacter spp* (25%), *Edwardsiella tarda* (8%) e *Klebsiella oxytoca* (8%), demonstrando a importância da *Escherichia coli* na contaminação das águas utilizadas na ordenha e para consumo humano.

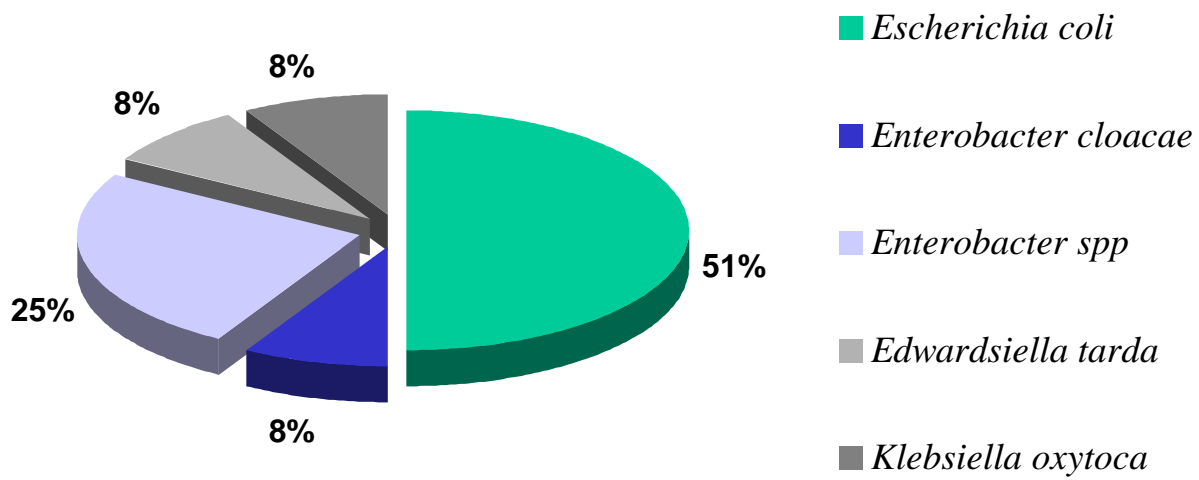


Figura 13. Agentes bacterianos isolados nas amostras positivas de água utilizada na ordenha.

## 5.2 Leite

Verifica-se na Figura 14 que dos 1692 tetos avaliados, foram CMT negativo 1269 tetos (75%), CMT positivo 373 tetos (22%), afuncionais 33 tetos (2%) e em tratamento 17 tetos (1%).

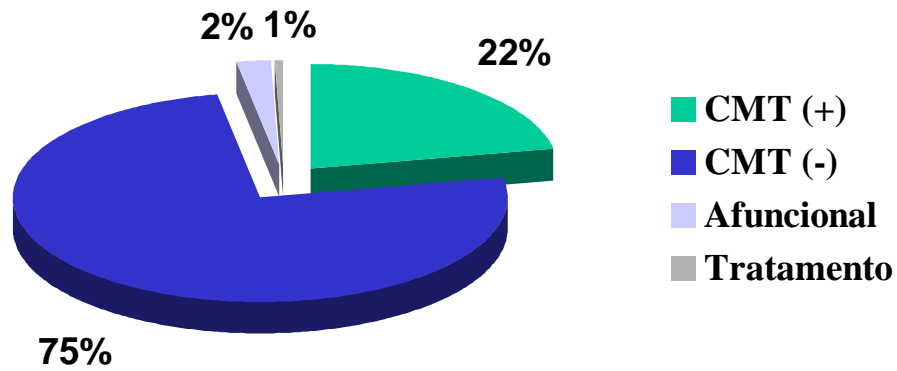


Figura 14. Situação geral dos 1692 tetos estudados.

Na Figura 15, observa-se a porcentagem de mastites clínicas (5%) e subclínicas (95%), das 373 amostras de leite positivas no CMT.

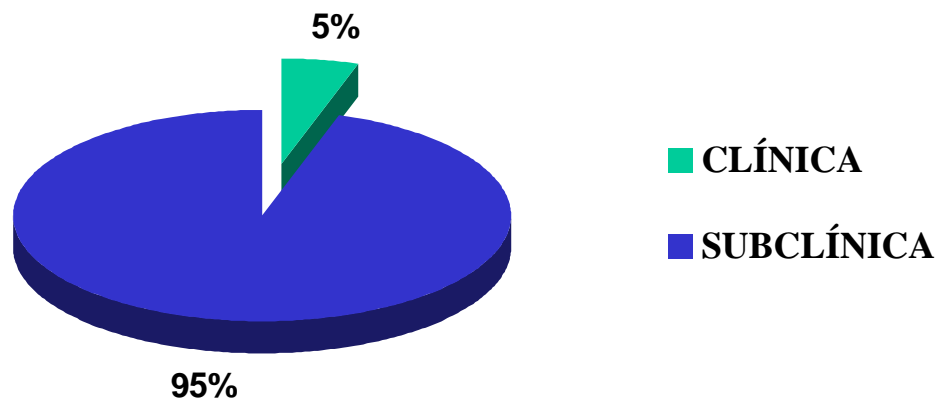


Figura 15. Distribuição da porcentagem de mastite clínica e subclínica.

Na Figura 16 observa-se que das amostras de leite CMT positivas, 9% das análises foram negativas e 91% foram positivas nas análises microbiológicas para confirmação da mastite clínica ou subclínica.

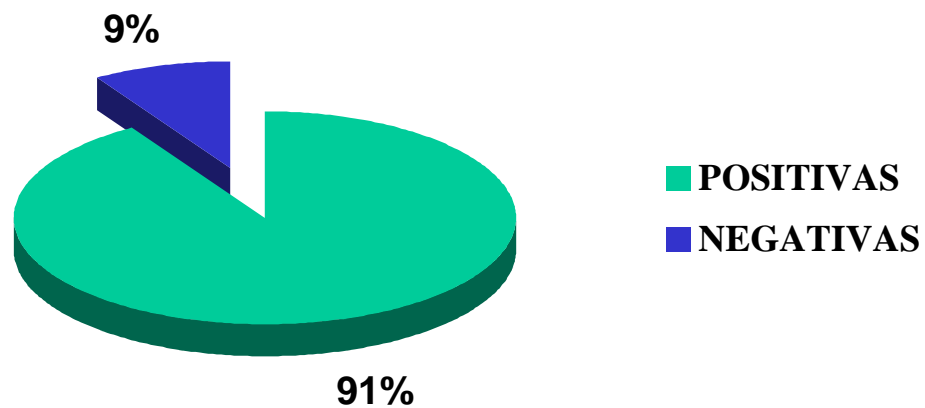


Figura 16. Resultado das análises microbiológicas de amostras de leite de tetos positivos para mastite clínica ou subclínica (CMT).

Na Figura 17, observa-se os principais agentes patogênicos, isolados nas amostras de leite de tetos positivos para mastite clínica ou subclínica, sendo; *Staphylococcus aureus* (30%), *Corynebacterium bovis* (23%), *Staphylococcus spp* (15%), *Staphylococcus hycus* (6%), *Streptococcus spp* (6%), *Streptococcus uberis* (5%) e *Streptococcus dysgalactiae* (2%).

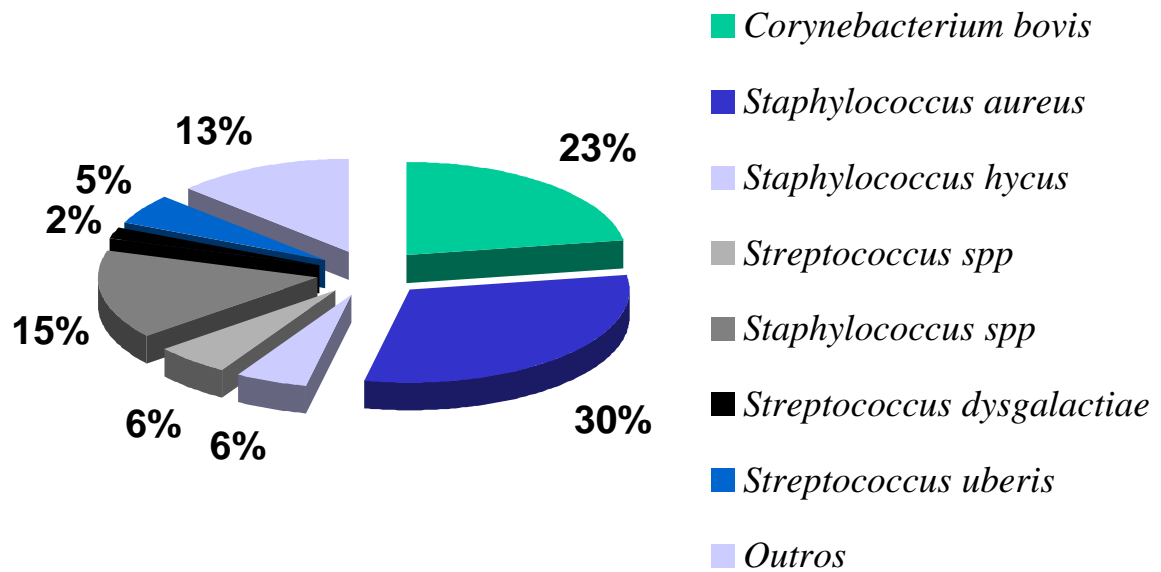


Figura 17. Principais agentes patogênicos isolados em amostras de leite de tetos positivos para mastite clínica ou subclínica.

A Contagem de Células Somáticas (Figura 18), demonstrou que tanto os agentes ambientais como os agentes contagiosos resultaram em contagens extremamente altas comprometendo a qualidade do leite nas propriedades estudadas. Sabe-se que a contagem normal de células somáticas de um quarto sadio é de até  $300 \times 10^3$  células/mL.

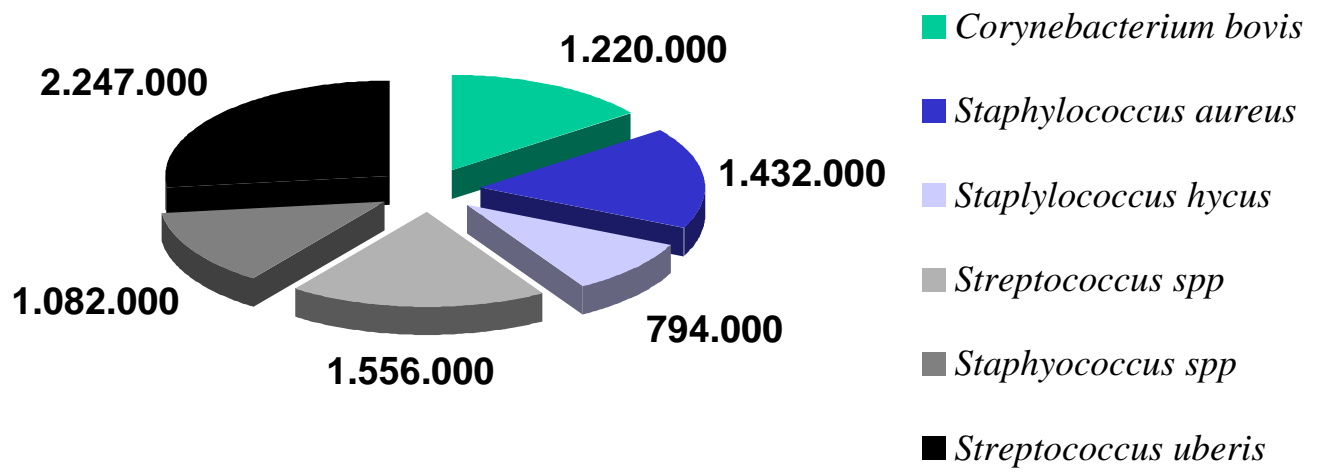


Figura 18. Média de células somáticas por mL de leite dos principais agentes isolados.

Tabela 1. Microorganismos isolados nas amostras de leite com mastite clínica ou subclínica, das 16 propriedades estudadas, e o resultado das respectivas médias na Contagem de Células Somáticas ( $10^3$  cel/mL).

<b>Agentes Isolados</b>	<b>Nº de isolamentos</b>	<b>Nº de Propriedades</b>	<b>Média CCS <math>10^3</math> cel / mL</b>
<i>Alcalygenes faecalis</i>	14	2	2.741
<i>Arcanobacterium pyogines</i>	1	1	7.000
<i>Citrobacter diversus</i>	4	2	2.320
<i>Corynebacterium bovis</i>	93	15	1.220
<i>Enterobacter aerogenes</i>	6	2	3.596
<i>Escherichia coli</i>	4	1	777
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	1	1.669
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	2	3.918
<i>Micrococcus</i>	9	8	747
<i>Nocardia spp</i>	3	3	7.115
<i>Pasteurela multocida</i>	3	2	7.569
<i>Serratia spp</i>	1	1	661
<i>Staphylococcus aureus</i>	127	14	1.432
<i>Staphylococcus spp</i>	64	14	1.082
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	2	2.308
<i>Staphylococcus hycus</i>	23	5	794
<i>Staphylococcus intermedius</i>	1	1	1.078
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3	1	3.989
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	8	3	1.992
<i>Streptococcus spp</i>	23	6	1.556
<i>Streptococcus uberis</i>	21	4	2.247
Total	414	-	1.631



## **6. DISCUSSÃO**

## 6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, realizou-se um estudo sobre a associação de agentes patogênicos encontrados na água utilizada na ordenha, na limpeza dos tetos e ordenhadeira, com agentes patogênicos isolados em amostras de leite de tetos apresentando mastite clínica ou subclínicas, de vacas em lactação em 16 propriedades da região de Cerqueira César - SP, no período de novembro de 2002 a fevereiro de 2003 (Figura 1).

Cruz (1892), já citava a importância da qualidade da água para a saúde pública e a importância de estudos nesta área para a prevenção de enfermidades relacionadas com possíveis microrganismos patogênicos isolados.

Observou-se nos resultados relacionados à origem da água que das 16 fontes utilizadas, 57% advinham de minas, 31% de poços, 6% tratadas e 6% de rio (Figura 10). Verifica-se na Figura 11, que na fonte, 56% estavam fora dos padrões de potabilidade humana e 44% estavam dentro dos padrões. O microrganismo isolado nas 56% das análises fora dos padrões de potabilidade foi *Escherichia coli*. Este resultado confirma a importância da manutenção das fontes para a prevenção de contaminações principalmente por coliformes fecais.

Segundo a OPAS (1987), a contaminação das fontes se dá pela incorporação de resíduos, principalmente de excretas humanas e de animais. Amaral et al. (1995), verificaram que em muitas propriedades rurais ocorre a disposição inadequada de resíduos orgânicos das atividades humana e animal, confirmando a contaminação das fontes como a situação encontrada neste estudo.

À semelhança das análises realizadas por Falcão et al. (1993), em diferentes fontes em Araraquara – SP, no presente trabalho não se observou contaminação por coliformes fecais em águas de poços e tratadas (SABESP), em contrapartida nas análises de água de rio e minas, obteve-se o mesmo resultado de contaminação por *Escherichia coli*.

Amaral et al. (1994) analisando amostras de água de poços rasos da região de Jaboticabal - São Paulo, encontraram 92,1% fora dos padrões de potabilidade humana, resultado preocupante que difere do encontrado no presente estudo.

Avaliou-se no presente estudo, a possibilidade das águas de fontes potáveis estarem fora dos padrões de potabilidade na torneira utilizada na ordenha, pela contaminação por agentes patogênicos no percurso ou pela falta de manutenção de caixas d'água.

Observa-se na Figura 12 que, 94% estavam fora dos padrões de potabilidade humana e apenas 6% estavam dentro dos padrões de potabilidade humana, concluindo-se que os produtores não cuidavam da manutenção de suas caixas d'água tornando-as importante veículo de transmissão de enfermidades, tanto para os animais estudados como para seus familiares. Das 16 propriedades avaliadas, apenas uma estava dentro dos padrões de potabilidade humana.

Souza & Cortez (1992), já indicavam a água como principal via de transmissão de doenças, acarretando prejuízos econômicos e problemas na saúde pública.

Pode-se verificar na Figura 13, os principais microrganismos isolados nas amostras de água: *Escherichia coli* (51%), *Enterobacter spp* (25%), *Enterobacter cloacae* (8%), *Edwardsiella tarda* (8%) e *Klebsiella oxytoca* (8%), demonstrando a importância da *Escherichia coli* na contaminação das águas utilizadas na ordenha e para consumo humano. Alguns destes agentes foram citados por Christovão (1997) como representantes importantes de coliformes totais e fecais. Eley (1992), cita que a presença principalmente da *Escherichia coli* indica contaminação fecal destas águas. Wight et al. (1997), relacionam a presença de *Escherichia coli*, com ocorrências de surtos de gastroenterites em humanos, situação não constatada no presente estudo.

O leite é um dos alimentos de maior importância para a sociedade humana e a produção de leite tem desempenhado um papel fundamental na geração de renda das empresas de agricultura familiar.

O que hoje preocupa o setor lácteo é a qualidade do leite. O leite de boa qualidade é aquele que é saboroso, seguro, íntegro e nutritivo. A partir de julho de 2005 estará entrando em vigor a normativa 51 visando a adoção de critérios mínimos de qualidade principalmente na produção pela necessidade de implementar medidas para melhorar a qualidade do leite no país.

De acordo com vários autores (LANGONI, 1995, COSTA et al., 1992; LANGONI et al., 1992, BRAMLEY, 1992, SILVA, 1999), pode-se afirmar que a mastite é responsável pelo comprometimento da qualidade do leite, inclusive por grandes aumentos na Contagem de Células Somáticas.

Existem muitos trabalhos relacionados com a etiologia da mastite. A mastite ambiental é a principal responsável pela ocorrência de quadros clínicos, geralmente causados por coliformes (BRAMLEY & DODD, 1984; MCDONALD, 1984; SMITH et al., 1985; SANDHOLM et al., 1990; CULLOR, 1993; COSTA, 1998).

Pelo fato da água poder atuar como via de transmissão de microrganismos patogênicos para a glândula mamária, muitos autores estudaram esta possibilidade obtendo resultados comprobatórios nesta associação. (HUTABARAT et al., 1986, LAS HERAS et al., 1999, SMITH et al., 1985, FERREIRO, 1978, SCHUKKEN et al., 1991, AMARAL et al., 2003, BRAMLEY & DODD, 1984; MCDONALD, 1984; SMITH et al., 1985; SANDHOLM et al., 1990; CULLOR, 1993; COSTA, 1998, AMARAL et al., 1995).

Com relação às amostras de leite colhidas neste trabalho, verificou-se que as propriedades apresentavam um controle sanitário animal muito superior ao que comumente é observado no Brasil. Observando a Figura 14, 75% dos 1692 tetos estudados, foram negativos ao teste de CMT. Dos 373 tetos positivos

no CMT (22%) e confirmados na CCS, os principais agentes isolados foram: *Staphylococcus aureus* (30%), *Corynebacterium bovis* (23%), *Staphylococcus spp* (15%), *Staphylococcus hycus* (6%), *Streptococcus spp* (6%), *Streptococcus uberis* (5%) e *Streptococcus dysgalactiae* (2%), (Figura 17).

A Contagem de Células Somáticas (Figura 18), demonstrou que tanto os agentes ambientais como os agentes contagiosos resultaram em contagens extremamente altas comprometendo a qualidade do leite nas propriedades estudadas. Sabe-se que a contagem normal de células somáticas de um quarto sadio é de até  $300 \times 10^3$  células/mL.

Os agentes patogênicos isolados nos casos de mastite clínica ou subclínica foram, na grande maioria, agentes considerados contagiosos. Os cuidados com a manutenção dos equipamentos de ordenha, a utilização de “pós-dipping”, a avaliação constante do rebanho, reposição de animais considerados crônico e a terapia de vaca seca são efetivas ações para que se possa diminuir a ocorrência da mastite considerada contagiosa.

É importante salientar que o controle da mastite depende mais da prevenção do que de tratamentos. (NATZKE, 1981; PHILPOT, 1984; GILL et al., 1990; DEGRAVES & FETROW, 1993; MORIN, 1993; KIRK et al., 1994; COSTA, 1998, TIMMIS & SCHULTZ, 1987).

Os problemas com a qualidade do leite pela presença de agentes contagiosos, principalmente pelo *Staphylococcus aureus* nos casos de mastite clínica ou subclínica, com altas Contagens de Células Somáticas no leite já foi relatada por vários autores (TIMMIS & SCHULTZ, 1987, MELCHÍADES et al., 1993, ADESIYUN et al., 1997).

Ferreiro (1978), associou a presença de *Staphylococcus aureus* isolado na água com a presença do mesmo nas ocorrências de mastite nas propriedades, fato que não foi constatado no presente estudo.

O resultado da etiologia da mastite no presente estudo vem confirmar o que Schukken et al. (1991) citaram em seu estudo. Os autores descreveram um

aumento do risco na ocorrência de mastite por *Staphylococcus aureus* quando se utiliza água não tratada no processo de obtenção do leite ou quando a água de lavagem do úbere está contaminada por coliformes.

A água utilizada na ordenha advinda das 16 propriedades estudadas e que foram positivas no isolamento de coliformes totais e fecais não obtiveram associação alguma com os agentes isolados no leite mastítico analisados nas mesmas propriedades, impossibilitando inclusive uma análise estatística.

Os cuidados com a qualidade da água devem ser constantes para evitar que se repitam os resultados encontrados por diversos autores (HUTABARAT et al., 1986, LAS HERAS et al., 1999, SMITH et al., 1985, FERREIRO, 1978, SCHUKKEN et al., 1991, AMARAL et al., 2003, BRAMLEY & DODD, 1984; MCDONALD, 1984; SMITH et al., 1985; SANDHOLM et al., 1990; CULLOR, 1993; COSTA, 1998, AMARAL et al., 1995) e proporcione uma matéria prima dentro dos padrões de qualidade necessários e valorizados pelos laticínios.

Os resultados do presente estudo levam à reflexão sobre a importância de uma colheita de amostras de forma asséptica para se evitar a contaminação de amostras do leite com microrganismos patogênicos ambientais. O presente estudo foi realizado no período das águas (novembro de 2002 a fevereiro de 2003) e com mínima incidência de coliformes isolados no leite, como apresentado na Tabela 1.

É importante salientar que os resultados observados sugerem que para os trabalhos a serem realizados para associar agentes patogênicos isolados em água utilizada na ordenha, com agentes patogênicos isolados em leite advindo de mastite clínica ou subclínica, sejam confirmados com um estudo de PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase), evitando-se afirmações equivocadas.

Este estudo possibilitou melhorias significativas relacionadas com a qualidade de água e vida de alguns produtores que efetuaram a limpeza ou troca de suas caixas d'água e protegeram suas minas da presença de animais e entulhos.



## **7. CONCLUSÕES**

## 7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados do presente estudo, pode-se concluir:

- Os agentes coliformes encontrados na água, utilizada na ordenha, não estavam presentes nas análises das amostras de leite dos quartos mamários com mastite clínica ou subclínica das respectivas propriedades, demonstrando não haver associação entre a qualidade da água e a ocorrência de mastite.
  
- Os agentes ambientais relacionados com a utilização de água fora dos índices de potabilidade na ordenha não foram significativos quando associados aos agentes ambientais isolados de quartos mamários positivos para mastite clínica ou subclínica.
  
- A bactéria *Escherichia coli* foi isolada em todas as amostras de água das fontes estudadas que se apresentavam fora dos padrões de potabilidade.



## **8. REFERÊNCIAS**

## 8. REFERÊNCIAS\*

ADESIYUN, A.A.; WEBB, L.A.; ROMAIN, H.I. Relatedness of *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk and human handlers in dairy farms in Trinidad. **J. Vet. Med.**, v.44, p.551-556, 1997.

AMARAL, L.A.; NADER FILHO, A.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; PENHA, L.H.C. Características microbiológicas da água utilizada no processo obtenção do leite. **Pesqui. Vet. Bras.**, v.15, n.2/3, p.85-88, 1995.

AMARAL, L.A.; ROSSI JR, O.D.; NADER FILHO, A.; ALEXANDRE, A.V. Avaliação da qualidade higiênico sanitária da água de poços rasos localizados em área urbana: utilização de colifagos em comparação com indicadores bacterianos de poluição fecal. **Rev. Saúde Pública**, v.28, n.5, p.345-348, 1994.

AMARAL, L.A.; ROSSI JUNIOR, O.D.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, F.L.A.; BARROS, L.S.S. Incidence of *Staphylococcus* sp. in the water used by dairy farms in the State of Sao Paulo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.55, n.5, p.620-623, Oct. 2003.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 16<sup>th</sup>. New York: APHA, 1992.

ANDERSON, B.J. The epidedemiology and pathogenesis of experimental staphylococcal and coliform mastitis in the mouse. **Br. Vet. J.**, v. 135, p. 163-171, 1979.

---

\* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.  
 BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

BALDASSI, G.; FERNANDES FILHO, M.; MOULIN, A.A.P.; HIPOLITO, M.; MURAKAMI, T.O. Estudo de sensibilidade *in vitro* dos principais agentes bacterianos isolados de mastites subclínicas na bacia leiteira de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo. **Arq. Inst. Biol.**, v.53, p. 55-63, 1986.

BERGMAN, A.; SEFFNER, W.; BUSCH, S. Zur Beteiligung von *Aeromonas hydrophila* an einem Mastitisgeschehen. **Monatsh. Veterinarmed.**, v. 36, p. 548-553, 1981.

BIANCARD, G.; GUGLIEIMETTI, P.L. Mastite acuta parenchimatosa bovina da *Klebsiella pneumoniae*: identificazione dei serotipi isolati. **Atti. Soc. Ital. Buiatria**, v.13, p. 389-400, 1982.

BINDE, M.; HERMANSEN, O. *Hafnia alvei* in mastitis secretion, a case report. **Nor. Veterinaertidsskr.**, v. 94, p. 569-570, 1982.

BISHOP, J.R.; BODINE, A.B.; JANZEN, J.J. Sensitivities to antibiotics and seasonal occurrence of mastitis pathogens. **J. Dairy Sci.**, v. 63, p. 1134-1137, 1980.

BLOOD, D.C.; RADOSTITS, O.M. **Clínica Veterinária**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. cap. 14, p. 424-63.

BOTTINO, J.A.; HIPÓLITO, O. Freqüência e incidência de amostras de *Escherichia coli* consideradas enteropatogênicas para gastroenterite infantil isoladas de mastite. **Atual.Vet. (São Paulo)**, v.9, p. 44, 1973.

BRAMAN, S.K.; EBERHART, R.J.; ASBURY, M.A.; HERMANN, G.L. Capsular types of *Klebsiella pneumoniae* associated with bovine mastitis. **J. Am.Vet. Med. Assoc.**, v.162, p.109-111, 1973.

BRAMLEY, A.J. Mastitis. In: ANDREWS, A.H. **Bovine Medicine: diseases and husbandry of cattle.** Oxford: Blackwell Scientific, 1992. p.289-300.

BRAMLEY, A.J.; DODD, F.H. Review of the progress of dairy science: mastitis control - progress and prospects. **J. Dairy Sci.**, v.51, p.481-512, 1984.

BRAMLEY, A.J.; NEAVE, F.K. Studies on control of coliforms mastitis in dairy cows. **Br. Vet. J.**, v. 131, p. 160-169, 1975.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 20 de 18 junho de 1986. Classificação das águas doces, salobras e salinas. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 jul. 1986.

CARTER, G.R.; COLE JÚNIOR, J.R. Diagnostic procedures. In: \_\_\_\_\_. **Veterinary bacterology and mycology.** 5 ed. New York: Academic Press, 1990. p. 620.

CASTILLO, A. Calidad e inocuidad en plantas lecheras. In: CONGRESO PANAMERICANO DE LA LECHE FEPALE, 8., 2004, **Proceedings...**, 2004.

COSTA, E.O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Rev. Educ. Cont. CRMV-SP**, v.1, p. 3-9, 1998.

COSTA, E.O.; CARCIOFI, A.C.; MELVILLE, P.A.; PRADA, M.S.; SCHALCH, U. *Prototheca* spp., outbreak of bovine mastitis. In: CONGRESSO PAN-AMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 13., 1992, Santiago. **Anais...** Santiago, 1992. p.92.

CHRISTOVÃO, D.A. Bacteriologia da água. Seu exame e controle bacteriológicos. In: \_\_\_\_\_. **Água:** qualidade, padrões de potabilidade e poluição. São Paulo: CETESB, 1977.

CRUZ, O.G. **A veiculação microbiana pelas águas.** 1892. 199F. Tese (Doutorado) - Faculdade Medicina do Rio de Janeiro.

CULLOR, J.S. The control, treatment and prevention of the various types of bovine mastitis. **Vet. Med. Food Anim. Pract.**, v.88, p.571-579, 1993.

DEGRAVES, F.J.; FETROW, J. Economics of mastitis and control. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v.9, p. 421-434, 1993.

ELEY, A. **Intoxicaciones alimentares de etiologia microbiana.** Zaragoza: Acríbia, 1992. p.208.

FALCÃO, D.P.; VALENTINI, S.R.; LEITE, C.Q.F. Pathogenic or potentially pathogenic bacteria as contaminants of fresh water from different sources in Araraquara, Brazil. **Water Res.**, v.27, n.12, p.1737-41, 1993.

FILIP, A.; KADDU-MALINDWAB, D.; MILD, G. Survival and adhesion of the facultative pathogenic microorganisms in groundwater. **Water Sci. Technol.**, v.19, p.1189, 1988.

FERREIRO, L. Agentes etiológicos e terapêutica da mastite bovina no Brasil. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.6, p.77-88, 1978.

GILL, R.; HOWARD, W.H.; LESLIE, K.E.; LISSEMORE, K. Economics of mastitis control. **J. Dairy Sci.**, v. 73, p. 3340-3348, 1990.

HOGAN, J.S.; SHITH, K.L.; HOBLET, K.H.; SCHOENBERG, P.S.; TODHUNTER, D.A.; HUESTON, W.D.; PRITCHARD, D.E.; BOWMAN, G.L.; HEIDER, L.E.; BROCHETT, B.L. et al. Field survey of clinical mastitis in low somatic cell counts herd. **J. Dairy Sci.**, v.72, p.1547-1556, 1989.

HUTABARAT, T.S.P.; WITONO, S.; UNRULT, D.H.A. Preliminary study on management factors associated with mastitis and milk production losses in small holder hand milking dairy farms in Central Java, Indonésia. **Proc. Int. Symp. Vet. Epidemiol. Econ.**, n.4, p. 151-154, 1986.

KEHRLI, M.E. Importance of functional mammary gland immunity during times of stress. **Proc. Natl. Mastitis Council.**, p.11-21, 2002.

KIRK, J. H.; DEGRAVES, F.; TYLER, J. Recent progress in treatment and control of mastitis in cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 204, p.1152-1158, 1994.

LANGONI, H. **Etiologia da mastite bovina subclínica e clínica: perfil da sensibilidade microbiana, controle e repercussão na produção leiteira e na saúde pública.** 1995. 200f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

LANGONI, H.; CORRÊA, C.N.M.; CORRÊA, W.M.; DE BARROS, J.A.; CORREA, G.N. Mastites Bovinas por *Cândida* e *Klebsiella*. **Rev. Bras. Méd. Vet.**, v.7, p. 203-204, 1985.

LANGONI, H. et al. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.20, p. 204-209, 1998.

LANGONI, H. et al. Mastite bovina por *Prototheca ssp.* In: CONGRESSO E INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 4., 1992, Araçatuba. **Anais...** Araçatuba, 1992. p. 92-93.

LANGONI, H.; ROSA, C. Aspectos micológicos do leite bovino mastítico. In: CONGRESSO BARSILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 1., 1995, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre, 1995. p. 18.

LAS HERAS, A.; DOMINGUEZ, L.; FERNANDEZ GARAYZABAL, J.F. Outbreak of acute ovine mastitis associated with *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Vet. Rec.**, v. 145, p. 111-112, 1999.

LECHEVALLIER, M.W.; SEIDLER, R.J. *Staphylococcus aureus* in rural drinking water. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.39, p.739-742, 1980.

LUNDER, T.; BREENNE, E. **Factors in the farm pollution production affection bacterial content in raw milk.** In: SYMPOSIUM ON BACTERIOLOGICAL QUALITY OF RAW MILK, 1996, Wolfpassing. **Proceedings...** 1996. p. 103-107.

MCCARRON, A.; HEANEY,R.P. Estimated healthcare savings associated with adequate dairy food intake. **Am. J. Hypertens.**, v.17, n.1, p. 88-97, 2004.

MACDONALD, J.S. Streptococcal and Staphylococcal mastitis. **Vet. Clín. North Am. Large Anim. Pract.**, v.6, p. 269-285, 1984.

MATSUNAGA, T.; KAMATA, S.; KAKIICHI, N.; UCHIDA, K. Identification of Gram negative bacteria from bovine mastitis and an examination of their susceptibility to antibiotics and beta- lactamase production. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 45, p. 761-765, 1992.

MELCHÍADES, L.E.A.; VEIGA, V.M.O.; RIBEIRO, M.T.; DUTRA, I.S. Produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* isolados de mastite subclínica bovina. **Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes**, v.48, p.80-81, 1993.

MORIN, D.E. Economic analysis of a mastitis monitoring and control program in four dairy herds. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 202, p.540-547, 1993.

NADER FILHO, A.; SHOCKEN-ITURRINO, R.P.; ROSSI JUNIOR, O.D. Mastite subclínica em rebanhos produtores de leite com gordura 3,2%. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.**, v. 36, p. 549-558, 1984.

NATZKE, R.P. Elements of mastitis control. **J. Dairy Sci.**, v. 64, p.1431-1442, 1981.

NICHOLLS, T.J.; BARTON, M.G. *Serratia liquefaciens* as a cause of mastitis in dairy cows. **Vet. Rec.**, v. 109, p. 288, 1981.

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. **Guia para la calidad del agua potable**. Washington: OMS, v. 2., 1987.

PEORALA, S. New strategies to prevent mastitis. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 37, p. 211-216, 2002.

PHILPOT, W.N. Economics of mastitis control. **Vet. Clín. North Am. Large Anim. Pract.**, v.6, p.233-245, 1984.

RIBEIRO, M.G. **Fatores de virulência em cepas de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina clínica e subclínica.** 2001. 98f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RICHTER, C.A.; AZEVEDO NETTO, J.M. **Tratamento de água.** São Paulo: Edgard Blucher, 1991. 332 p.

ROBINSON, R.K. **Microbiologia lactologia:** microbiologia de la leche. Zaragoza: Acriba, 1987. p.230.

SANDHOLM, M.; KAARTINEN, L.; PYORALA, S. Bovine mastitis – why does antibiotic therapy not always work? An overview. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, v. 13, p. 248-260, 1990.

SARMA, G.; BORO, B.R. Isolation and sensivity testing of etiological agentes from bovine mastitis. **Indian J. Anim. Health**, v. 19, p. 47-49, 1980.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **J. Am. Vet Med. Assoc.**, v.130, p.199-207, 1957.

SCHUKKEN, Y.H.; GROMMER, F.J.; VAN DER GREER, D. Risk factors for clinical mastitis in herds with low bulk milk somatic cell count. 2-Risk factors for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **J. Dairy Sci.**, v.74, p.826-832, 1991.

SILVA, N. Diagnóstico de mamite de importância econômica. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITE, 3., 1999, Botucatu. **Anais...** Botucatu, 1999. p.51-55.

SMITH, K.L.; TODHUNTER, P.A., SCHOMBERGER, P.S. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. **J. Dairy Sci.**, v.68, p.1531-1553, 1985.

SORDILLO, L. M.; SCOTT, N. L. Alternative approaches for the prevention and treatment of mastitis. **Bovine Proc.**, v.27, p.54 – 60, 1995.

SOUZA, L.C.; CORTÊS, V.A. Condições sanitárias da água de bebida fornecida aos animais do Campus de Botucatu/SP. **Vet. Zootec.**, v. 4, p. 17-24, 1992.

SOUZA, L.C.; IARIA, S.T.; LOPES, C.A.M. Bactérias coliformes totais e coliformes de origem fecal em águas usadas na dessedentação de animais. **Rev. Saúde Pública**, v.17, p.112-122, 1983.

SOUZA, L.C.; MEIRA, D.R. Levantamento das condições sanitárias de água de bebida fornecida a animais pertencentes ao Campus de Botucatu. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 18., 1982, Balneário Camboriú. **Resumos...** Florianópolis: SBMV / SOMEVESE, 1982. p. 456.

TIMMIS, L.L.; SCHULTZ, L.H. Dynamics and significance of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections. **J. Dairy Sci.**, v.70, p.2648 - 2657, 1987.

WIGHT, J.P.; RHODES, P.; CHAPMAN, P.A.; LEE, S.M.; FINNER, P. Outbreaks of food poisoning in adults due to *Escherichia coli* O11 and *Campylobacter* with coach trips to northern France. **Epidemiol. Infect.**, v.119, p.9-14, 1997.

WILLERS, H.C.; KARAMANLIS, X.N.; SCHULTE, D.D. Potential of closed water systems on dairy farms. **Water Sci. Technol.**, v.39, p.113-119, 1999.

WILSON, D.J.; KIRK, J.H.; WALTER, R.D.; BOSWORTH, O.W. *Serratia marcescens* mastitis in dairy herd. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.196, p.1102-1105, 1990.

ZAR, J.H. Biostatistical Analysis. **Prentice-Hall**. New Jersey, p. 718, 1996