

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós - Graduação em Bioquímica e
Bioprospecção



Dissertação

**Bactérias multirresistentes oriundas de mastite
bovina: suscetibilidade a antissépticos**

Patrícia Jacob Santos

Pelotas, 2013.

PATRÍCIA JACOB SANTOS

**BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES ORIUNDAS DE MASTITE
BOVINA: SUSCETIBILIDADE A ANTISSEPTICOS.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica e Bioprospecção da
Universidade Federal de Pelotas,
como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Ciências (área
do conhecimento: Bioquímica e
Bioprospecção).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia da Silva Nascente

Pelotas, 2013.

Banca examinadora:

.....
Prof^a. Dr^a. Daniela Isabel Brayer Pereira

.....
Prof^a. Dr^a. Marlete Brum Cleff

.....
Prof. Dr. Rafael Lund (suplente)

.....
Prof^a. Dr^a. Patrícia da Silva Nascente
(orientadora)

Dedicatória

Dedico este trabalho aos que dele participaram, desde quando era um sonho:

Meus pais, Paulo Helon e Maria Amélia, pelo amor, incentivo, e apoio incondicional!

Cairo, meu melhor amigo, meu amor, por tudo que vivemos e somos juntos...

Meu filho, Bruno, por me permitir viver o tipo de amor pelo qual as pessoas se dispõem a morrer.

Minha orientadora, Patrícia da Silva Nascente, obrigada por acreditar em mim, pela amizade, ajuda, entusiasmo, paciência... Sem você este trabalho estaria inacabado.

“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.”

Charles Chaplin

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus, permitindo que meu trabalho fosse realizado. Obrigada por ter me dado fé, saúde, resignação e humildade.

Ao meu esposo e filho, Cairo e Bruno, por terem tido a maior paciência, compreensão, ajuda.

Aos meus pais Paulo Helon e Maria Amélia, por terem me proporcionado a viver em amor, saber respeitar o próximo e por terem me ensinado o significado de família.

Ao meu irmão, Paulo Junior e cunhada Daniela, por estar sempre presente mesmo de longe, mas agora perto. Por iluminar e alegrar ainda mais nossa família, trazendo ao mundo nossos afilhados lindos Arthur e Maryana.

A minha co-orientadora Helenice Gonzalez pelos valiosos conhecimentos, colaboração, apoio e parceria constante neste estudo.

A minha orientadora, prof. Dra. Patrícia da Silva Nascente, por acreditar em mim, com meus limites e assim, fazer a minha caminhada, tranquila, agradável e serena. Muito obrigada, fosse mais que uma orientadora, és uma amiga!

As minhas colegas de mestrado, parceiras de bancada, que eu tive o prazer em ganhar nestes dois anos, Josiara Mendes e Cristina Hallal. De tudo que passou, ficarão a saudade das centenas de placas, milhares de ponteiras e claro da companhia especial de vocês! Muito obrigada pela ajuda de sempre, com certeza, vocês tiveram um grande papel no sucesso deste trabalho.

À todos os colegas do Laboratório de Micologia, em especial a Isabel Esteves, a Bel, Gracialda, a Graci, Viviane seixas, a Vivi e o Vinicius, o Vini! Por toda ajuda, conselho, paciência, disponibilidade e muitas vezes pelo silêncio!!! Muito obrigado, vocês foram, e serão sempre muito especiais!!!

A professora Dr^o Daniela Brayer, a Dani, pelos conhecimentos, amizade, paciência, e claro pelo chimarrão de todo dia!!!

Aos demais colegas do laboratório de Micologia que ao longo desse tempo passaram pelo laboratório e tive oportunidade de conhecer: Julia, Beatriz, Bruna, Tai, Ane, Michele, Bianca, Neila, Fernando, a Lili, obrigado pelos momentos vividos foi muito bom poder conhecer vocês!

Aos laboratoristas, do laboratório de aulas práticas, que sempre muito prestativos nos auxiliavam nas mais diferentes necessidades. Ao Isaías que diante das nossas necessidades estava sempre disposto a ajudar. Obrigado!

Aos colegas e professores do departamento de Inspeção de produtos lácteos UFPel: Natalia Piva, a Nati; Milimani Andretta, a Mili; Dante Frigotto, em especial a minha co-orientadora Helenice Gonzalez, que embora distante fisicamente, sempre esteve pronta a contribuir com seu conhecimento, alegria e serenidade. Também agradeço a todos que contribuíram para elaboração desse trabalho, com certeza é um grande projeto onde todos fazem a diferença.

A professora, Sylvia, pelo estudo da citotoxicidade, muito obrigada pela disponibilidade, atenção e o ensinamento.

Aos colegas do “Mic-vet”, pela paciência, divisão de espaço e cordialidade.

À UFPel e à coordenação do Programa de Pós-Graduação de Bioquímica e Bioprospecção, o meu muito obrigada, em especial para os professores: Rosélia, Elisandra, Francieli, Giovana, Adriana, Marlete, Patrícia, Rafael Lund, Wilson, Márcia, Geonir, Cláudio, Willian, Francisco Del Pino e Rogério pela oportunidade de aprender mais com as aulas e assim, poder me tornar uma profissional melhor.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudo que viabilizou essa pesquisa.

Enfim, deixo o meu muito obrigado a todos que de alguma maneira, fisicamente ou espiritualmente, me ajudaram na realização deste trabalho.

Resumo

SANTOS, Patrícia Jacob. Bactérias multirresistentes oriundas de mastite bovina subclínica: suscetibilidade a antissépticos. 2013. 67f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas - RS.

A mastite subclínica é mais prevalente e é responsável pela perda de 70% na produção, enquanto a mastite clínica ocasiona perdas menores. O objetivo deste estudo foi isolar e identificar bactérias patogênicas de 94 amostras de leite com mastite e testar a suscetibilidade de 38 bactérias multirresistentes a antibióticos frente a antissépticos utilizados no pre e pos dipping através de duas metodologias assim como verificar citotoxicidade destes produtos. Destes produtos previamente identificados em tubos de ensaio foram semeadas em agar sangue, e os resultados observados em 24 horas após permanecer 36°C em condições aeróbias. O isolamento bacteriano foi observado em 62 (65,96%) amostras. Após a caracterização bioquímica foram identificados: *Staphylococcus* spp. Coagulase negativa (n = 29), *Staphylococcus* spp. Coagulase positiva (n = 6), *Corynebacterium* spp. (N = 16), *Streptococcus* spp. (N = 7), *Streptococcus uberis* (n = 4). Um outro grupo de 38 isolados, sendo identificados como *Staphylococcus aureus* (11), *Staphylococcus lentus* (1), *Staphylococcus sciuri* (1), *Kocuria kristinae* (2), *Kocuria varians* (1), *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* (1), *Enterococcus casseliflavus* (1), *Enterococcus faecalis* (1), *Staphylococcus* spp. Coagulase positivo (15), *Staphylococcus* spp. Coagulase negativo (3). Foram selecionados para serem testados frente a três antissépticos: hipoclorito de sódio, iodo e clorexidina, através do teste de Microdiluição em Caldo (MC) para avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), de acordo com as normas CLSI (*Clinical and Laboratory Institute*), documento M7-A6 (CLSI 2003). No segundo experimento os desinfetantes foram avaliados através do Teste de Eficiência dos Antissépticos, sendo selecionados para este, cinco isolados bacterianos e três desinfetantes, conforme metodologia adaptada por Schuch et al. (2008). Depois foi realizado teste de citotoxicidade em frente a células MDBK (Madin-Darby bovine kidney) através do ensaio com sal de tetrazolium (MTT). Dentre os antissépticos testados o que apresentou melhor atividade antisséptica frente às 38 bactérias foi clorexidina, onde 71,05% dos isolados foram sensíveis, já o iodo foi o desinfetante que apresentou menor efeito desinfetante sendo que 21,02% dos isolados se mostraram resistentes. No teste de eficiência dos desinfetantes os melhores resultados foram obtidos com iodo onde o crescimento variou de zero a 2% UFC no tempo de 30". Com hipoclorito de sódio a variação foi de zero a 2 % UFC no tempo de 60", ambos resultados em salina. O Clorexidina variou seu crescimento, no tempo de 30", de zero a 1% UFC, em salina. Quando comparado com matéria orgânica, leite, observou-se que este demonstrou como fator de proteção aos microrganismos. A variação observada no iodo foi de 3% UFC em 15', já do hipoclorito de 66% UFC no mesmo tempo descrito. Já a clorexidina não observou-se crescimento em 15'. A identificação do agente etiológico é importante para a implementação de métodos de controle e prevenção de mastite e para o monitoramento do rebanho. Mas para isso a escolha adequada do antissépticos, com conhecimento da CIM e do tempo necessário de exposição, é importante para o controle efetivo destas bactérias.

Palavras-chave: mastite, antissépticos, bactérias, resistência.

Abstract

SANTOS, Patrícia Jacob. Multiresistant bacteria derived from bovine subclinical mastitis: susceptibility to antiseptics 2013. 67f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas - RS.

Subclinical mastitis is more prevalent and is responsible for 70% loss in production, while clinical mastitis causes minor losses. The aim of this study was to isolate and identify pathogenic bacteria of 94 milk samples from mastitis and test the susceptibility of 38 multiresistant bacteria to antibiotics compared to antiseptics used in pre and post dipping through two methodologies as well as verifying cytotoxicity. PCR products previously identified in test tubes were inoculated on blood agar and the results observed within 24 hours after standing at 36 ° C under aerobic conditions. Bacteria growth was noted in 62 (65.96%) samples. After the biochemical characterization were identified: *Staphylococcus* spp. Coagulase-negative (n = 29), *Staphylococcus* spp. Coagulase positive (n = 6), *Corynebacterium* spp. (N = 16), *Streptococcus* spp. (N = 7), *Streptococcus uberis* (n = 4). Another group of 38 isolates was identified as *Staphylococcus aureus* (11), *Staphylococcus lentus* (1) *Staphylococcus sciuri* (1), *Kocuria kristinae* (2) *Kocuria varians* (1) *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* (1), *Enterococcus casseliflavus* (1), *Enterococcus faecalis* (1) *Staphylococcus* spp. coagulase positive (15), *Staphylococcus* spp. Coagulase-negative (3). Were selected to be tested against three antiseptics: sodium hypochlorite, iodine and chlorhexidine by testing microdilution (MC) for the assessment of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC), in accordance with the standards CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), document M7-A6 (CLSI 2003). In the second experiment, the disinfectants were evaluated by Efficiency Test of antiseptics, being selected for this, five strains against the two disinfectants, as adapted methodology (Schuch et al., 2008). After cytotoxicity assay performed in front of MDBK (Madin-Darby bovine kidney) assay using the tetrazolium salt (MTT). Among the antiseptics tested presented the best activity to front antiseptic chlorhexidine was 38 bacteria, where 71.05% of the isolates were susceptible, since iodine was the disinfectant of lowest disinfectant effect of which 21.02% of the isolates were resistant. In the test of the effectiveness of disinfectants best results were obtained with iodine where growth ranged from 0 to 2% of UFC at time 30". White sodium hipoclorite, the variation was from zero to 2% UFC 60" in time, results im both saline. When compared with organic matter milk, observed that this demonstrated a protective factor for microorganisms the variation in iodine was 3% UFC 15', and sodium hypochlorite has UFC by 66% in the same time UFC described. Already chlorhexidine growth was not observed in 15'. The identification of the etiologic agent is important for the implementation of methods of control and prevention of mastitis and for monitoring the herd. But for that the proper choice of antiseptics, with knowledge of the CIM knowledge and exposure time, it is necessary for the effective control of these bacteria.

Key-words: mastitis, antiseptic, bacteria resistance.

Lista de Tabelas

Artigo 1 - Bacteria from milk cows with clinical and subclinical mastitis: survey and literature review

Tabela 1. Microorganisms isolated from milk of cows with mastitis in Pelotas - State of Rio Grande do Sul	50
---	----

Artigo 2 - Suscetibilidade *in vitro* de antissépticos frente à bactérias multiresistentes isoladas de mastite bovina

Tabela 1. Isolados bacterianos oriundos de casos de mastite bovina subclínica e respectiva suscetibilidade frente a antibióticos.....	76
---	----

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e perfil de suscetibilidade de três antissépticos utilizados no pré e pós-dipping frente a 38 isolados bacterianos oriundos de mastite bovina subclínica.....	78
--	----

Tabela 3. Teste de eficiência de antissépticos, valores em % da redução das UFC.....	79
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVO	16
2.1	Objetivo Geral	16
2.2	Objetivos Específicos	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	Qualidade do leite	17
3.2	Mastite bovina	18
3.3	Tratamento Da Mastite	21
3.3.1	Antimicrobianos	22
3.3.1.1	Antissépticos e Desinfetantes	22
3.3.1.2	Antibacterianos	24
3.3.3	Resistência Bacteriana	24
3.4	Testes Antimicrobianos	26
3.5	Citotoxicidade	28
4	ARTIGO	30
5	CONCLUSÃO	52
6	PERSPECTIVAS	53
7	REFERÊNCIAS	54
8	ANEXO 1	64
9	ANEXO 2	81

INTRODUÇÃO

O agronegócio do leite ocupa destacado espaço na economia mundial. Este sistema agroindustrial é um dos mais expressivos no Brasil pela sua importância social, e a atividade leiteira é praticada em todo País, em cerca de um milhão de propriedades rurais (Guimarães; Langoni 2009). Dentre os alimentos de origem animal, o leite e seus derivados merecem destaque, pois são muito consumidos. Desta forma, do ponto de vista de saúde pública, a qualidade do leite é muito importante (Miguel et al., 2012).

A qualidade do leite cru é influenciada por múltiplos fatores, entre os quais se destacam fatores zootécnicos associados ao manejo, saúde da glândula mamária, alimentação, potencial genético dos rebanhos e fatores relacionados à obtenção e armazenagem do leite recém-ordenhado (Guerreiro et al., 2005). Em 2002 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2002), determinou através da Instrução Normativa N° 51, de 18 de setembro de 2002, os parâmetros físicos- químicos e microbiológicos para o leite cru produzidos no Brasil e comercializado em estabelecimentos sob fiscalização federal, na tentativa de estimular o fornecimento de produtos com melhor qualidade e inócuos à saúde do consumidor (Pinto et al., 2011). Em resposta as dificuldades ocorridas para implementação da Instrução Normativa N° 51, devido aos problemas apontados por vários técnicos do setor para sua implantação, foi determinada através da Instrução Normativa N° 62, de 29 de dezembro de 2011, novas medidas, definindo um novo cronograma para adaptação gradativa dos produtores (Silva, 2012).

Uma das causas que exerce influência extremamente prejudicial sobre a composição e as características do leite é a mastite (Müller, Ernst 2002). A mastite bovina é considerada a doença que acarreta os maiores prejuízos econômicos à produção leiteira, pela redução da quantidade e pelo comprometimento da qualidade do leite produzido ou até pela perda total da capacidade secretora da glândula mamária (Ribeiro et al., 2003). A mastite pode ser classificada em clínica ou subclínica. A forma clínica apresenta sinais visíveis enquanto a forma subclínica não apresenta sinais visíveis, apenas

aumento na contagem de células somáticas (CCS) do leite, podendo ser diagnosticada através de métodos como, por exemplo, *California Mastitis test* (CMT) (Oliveira et al., 2010).

Entretanto vários fatores podem influenciar a variação do CCS, sendo citadas a ordem de parto, período de lactação, mês e estação do ano; no entanto a ocorrência de infecção intramamária é o principal fator responsável pela variação do CCS (Coentrão et al., 2007).

Philpot e Nickerson (1991) indicam que 90% da mastite são causadas por bactérias. Em adição a estes agentes patogénicos, fungos, leveduras, algas e vírus podem também estar envolvidos na etiologia da doença, mas a ocorrência é baixa. Dentre as bactérias, os gêneros bacterianos mais frequentemente isolados de casos de mastite bovina são *Staphylococcus* coagulase positivo e negativo, os *Streptococcus* spp. e o *Corynebacterium bovis* (Ribeiro et al., 2003).

Para controle das mastites bacterianas o principal tratamento é a antibioticoterapia. Porém o aumento no uso de antimicrobianos ou seu uso indiscriminado aumenta o risco de resíduos no leite, o que contribui com contaminação do ambiente, da cadeia alimentar e com resistência dos microrganismos a fármacos de importância para a saúde humana (Ribeiro Junior; Beloti, 2012). A escolha de antimicrobianos adequados e eficientes deve ser criteriosa e sempre que possível baseada em resultados de testes de sensibilidade (Ferreira; Pigato et al., 2010).

Diversas medidas sanitárias devem ser adotadas durante o processo de ordenha para minimizar a transmissão de agentes causadores de mastite que podem ser transferidos ao leite depreciando sua qualidade microbiológica deste (Medeiros et al., 2008). Entre eles cita-se: tratamento da vaca no período seco, tratamento de casos clínicos, manejo adequado e bom funcionamento do sistema de ordenha (Pedrini; Margatho, 2003). O método convencional do controle de mastite durante a ordenha consiste basicamente na lavagem dos tetos com água e assepsia com produtos químicos com ação antimicrobiana como cloro, iodo ou quaternário de amônio (Ramalho et al., 2012). Antissépticas são substâncias aplicadas à pele para reduzir o número de agentes da microbiota transitória e residente (ANVISA, 2012).

Entretanto, os antissépticos podem apresentar pouca eficácia quando na presença de matéria orgânica, dificultando desta forma a atuação eficaz do produto (Coutinho et al., 2012).

A importância de se diagnosticar vacas com mastite subclínica e aparentemente saudáveis, é identificar quais animais podem ser transmissores de infecção pela linha de ordenha ou pela mão do ordenhador. Estes animais além de serem foco de contaminações, contribuem para baixa qualidade do leite e menor volume total produzido, o que reflete em perdas econômicas às propriedades (Barbosa et al., 2009) e também pode ser considerado como sério problema para saúde pública (Medeiros et al., 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Identificar bactérias em leite proveniente de mastite bovina e avaliar a suscetibilidade *in vitro* de bactérias multiresistentes isoladas de mastite bovina a antissépticos utilizados no pré e pós dipping.

2.2 Objetivos Específicos:

- Isolar e identificar bactérias em leite proveniente de mastite bovina clínica e subclínica;
- Avaliar perfil suscetibilidade bactérias aos antimicrobianos;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CFM) de três antissépticos (Hipoclorito de sódio, iodo e clorexidine) frente a 38 bactérias multirresistentes a antibióticos;
- Avaliar a capacidade de inativação do crescimento bacteriano, de três antissépticos em diferentes tempos de exposição;
- Avaliar a citotoxicidade dos antissépticos usados no pré e pós dipping frente a células MDBK (Madin-Darby bovine kidney).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Qualidade do leite

Dentre os alimentos de origem animal, o leite e seus derivados merecem destaque por serem produtos muito consumidos (Miguel et al., 2012). O leite assume importância por ser destinado principalmente a crianças e recém-nascidos como alimento único nos primeiros meses de vida (Langoni et al., 2011) e por ser considerado um alimento completo (Gradella, 2008).

O leite é considerado um alimento completo e por ser rico em proteínas, vitaminas, gorduras, carboidratos e minerais é uma importante fonte de nutrientes para os seres humanos (Martins; Andrade 2011). Para que ele possa ser melhor utilizado pelo organismo, deve ser de excelente qualidade, garantindo assim sua eficiência (Mendonça et al., 1999).

O controle de qualidade inicia-se bem antes da produção da matéria prima nas fazendas ou granjas leiteiras, pois o leite de boa qualidade só é obtido de animais saudáveis, adequadamente manejados, bem nutridos e livres de doenças e infecções. Na sequência a ordenha deve ser realizada em condições higiênicas e ambiente apropriado. O leite precisa ser resfriado e transportado nestas condições até indústria para que possa ser beneficiado (Miguel et al., 2012). Considera-se também importante os aspectos de educação sanitária, a fim de melhorar a produção animal e a qualidade do produto final (Langoni et al., 2011).

Riscos à saúde humana relacionada ao consumo de leite e derivados, podem decorrer do consumo de produtos lácteos crus, de erros na pasteurização, da contaminação destes por patógenos termorresistentes emergentes e/ou da seleção de agentes de zoonoses resistentes a antimicrobianos, além da sua adulteração (Langoni et al., 2011).

Do ponto de vista tecnológico, a qualidade da matéria prima é um dos maiores entraves ao desenvolvimento e consolidação da indústria de laticínios no Brasil. De modo geral o controle da qualidade do leite nas últimas décadas tem se restringido à prevenção de adulterações do produto *in natura*, baseado na determinação de acidez, índice crioscópico, densidade, percentual de gordura e extrato seco desengordurado. A contagem global de microrganismos aeróbios

mesófilo (indicadores de qualidade microbiológica do produto) tem sido utilizada para leite cru tipo A e B (Muller; Ernst. 2002).

O leite e produtos lácteos são excelentes meios para o desenvolvimento de microorganismos desejáveis e outros patogênicos e deteriorantes, exigindo, portanto, cuidados de sua produção: a ordenha, processamento e armazenamento (Guimarães; Langoni 2009). Os microorganismos veiculados no leite podem ser provenientes do úbere infectado, da superfície do teto ou uma variedade de outras fontes na ambientais (Godkin; Leslie 1993).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), publica em 2011 da Instrução Normativa 62 (IN62) (BRASIL, 2011), que reúne novas normas de produção, identidade e qualidade de leites tipos A, B, C, pasteurizado e cru refrigerado, além de regulamentar a coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. Entre as exigências na qualidade do leite destacam-se a quantidade de bactéria presente (limite aceitável 600 000 UFC/ml) e contagem de células somáticas (limite aceitável 600 000 células somáticas/ml).

3.2 Mastite Bovina

A mastite é caracterizada por uma inflamação da glândula mamária relacionada a uma causa física, química, térmica ou microbiana. Dentre os agentes microbianos, 90% das mastites são causadas por bactérias (Ramalho et al., 2012). Essa enfermidade pode ser classificada de acordo com a forma de apresentação em clínica ou subclínica (Philpot; Nickerson 1991).

Na mastite clínica o quadro clínico é caracterizado por sinais visíveis de inflamação, enquanto que a forma subclínica, exibe um grau de dificuldade de identificação porque não há alterações clínicas na glândula mamaria, que possam ser observados macroscopicamente (Mira et al., 2013). A forma subclínica é geralmente mais prevalente e gera cerca de 70% de perdas na produção, podendo reduzir a secreção de leite em 45% (Fonseca; Santos, 2000). Neste caso, é necessária a utilização de outros métodos de diagnóstico, tais como a Contagem de Células Somáticas (SCC) e o *Card Mastitis Test* (CMT) (Harmon, 1994, Machado et al., 2000, Della Libera et al., 2011).

No Brasil, pode-se dizer que a mastite subclínica está presente em todos os rebanhos leiteiros (Machado et al., 2000). Várias pesquisas realizadas desde 1992 indicam alta incidência, com taxas que variam de 14,4% a 58,8% de vacas infectadas por rebanho (Harmon, 2001).

Os patógenos envolvidos na etiologia da mastite bovina podem ser classificados em "maior" e "menor". A primeira categoria inclui agentes que causam maiores CCS, mudanças significativas na composição do leite e, conseqüentemente, um grande impacto econômico, sendo os principais agentes: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, Coliformes, *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Actinomyces pyogenes* e *Serratia* spp. *Staphylococcus* spp. Coagulase negativo (CN) e *Corynebacterium bovis* são considerados patógenos "menores" e promovem a inflamação moderada com menor CCS (Harmon, 1994).

Considerando-se a fonte de infecção, os agentes de mastite podem ser classificados como infecciosos (mastite primária), tais como: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma* spp., *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus* Coagulase Negativa, ou ambiental (mastite secundária), tais como *Escherichia coli*, Coliformes, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus equinus* (anteriormente *S. bovis*) e *Streptococcus* spp. (Costa et al., 1998, Mendonça et al., 1999).

Mais de 140 diferentes tipos de microrganismos podem causar a mastite (Guimarães; Langoni 2009). Dentre os agentes etiológicos mais isolados em casos de mastite subclínica destacam-se os *Staphylococcus* coagulase positivo e coagulase negativo, *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium bovis* (Ribeiro et al., 2003)

Dentre os patógenos contagiosos, o *Staphylococcus aureus* é o mais frequente nos casos de mastite bovina (Freitas et al., 2005). A alta prevalência de *S. aureus* está relacionada à habilidade desse patógeno de invadir e se estabelecer profundamente nos tecidos da glândula mamária, o que torna a mastite por esse agente um desafio aos programas de controle e prevenção de infecção intramamária. Além disso, a capacidade de desenvolver resistência também contribui para a alta prevalência dessa espécie bacteriana (Silva et al., 2012).

O aumento das células somáticas é a característica principal utilizada para o diagnóstico da mastite subclínica, no entanto, outros fatores podem provocar esta alteração. Existem vários testes que avaliam a contagem de células somáticas do leite destacando-se o CMT, WMT (Wisconsin Mastitis Test) e Contagem eletrônica de Células Somáticas (CCS) (Rupp et al., 2000). O cultivo das amostras de leite dos quartos mamários individuais é usado para identificar um agente etiológico, especialmente nos casos de CMT positivo (Bramley et al., 1996, Sears et al., 1993).

O resultado do teste CMT é determinado de acordo com o grau de gelificação ou da viscosidade da mistura de partes iguais de leite e de reagente na bandeja apropriada. Os resultados podem ser pontuação negativa ou positiva, o último sendo classificado em três níveis. O aumento da viscosidade das amostras de leite, positivas por infecção microbiana, ocorre devido ao aumento de leucócitos no lúmen alveolar, o que está relacionado com a patogenicidade do agente causador (Souza et al., 2009).

A inflamação pode também estar presente sem um processo infeccioso na glândula, devido a lesões traumáticas, ataques por agentes químicos, entre outros fatores. O agente microbiano pode ainda já ter sido eliminado pela maneira natural dos processos de auto-cura, resultando em uma cultura negativa (Ribeiro et al., 2003, Brito et al. 1999, Skrzypek et al., 2004, Gomes et al., 2011). Por isso, segundo Ribeiro et al. (2003) mastite subclínica infecciosa é aquele que apresenta resultado de teste positivo para a CMT, ou outros ensaios indicativos e confirmado pelo crescimento microbiano.

Os resultados obtidos na investigação dos agentes causadores de mastite são fundamentais para a compreensão dos problemas específicos dos rebanhos, para orientar medidas racionais para o controle da mastite e sugerir mudanças relativas ao manejo, incluindo a realização de testes de sensibilidade para indicar a melhor opção para tratamento (Radostitis et al., 1994, Bramley et al., 1996). A utilização de testes de diagnóstico leva indiretamente a uma redução, em casos de mastite, proporcionando assim um produto de qualidade superior (Mira et al., 2013).

No entanto, apesar do diagnóstico bacteriológico ser crucial, é caro e demorado, não sendo aplicável a rebanhos com grande número de animais. Várias simplificações têm sido estudadas para serem aplicadas a rotina a fim

de eliminar essas dificuldades, como o uso de meios de cultura especiais e criação de esquemas de identificação presuntiva (Ribeiro et al., 2003, Figueiredo, 1995). Esses animais, além de ser fontes de contaminação, contribuem para a baixa qualidade do leite e menor volume total produzido, o que reflete em perdas econômicas na propriedade (Moeini et al., 2002).

Além dos problemas com os animais infectados, o estudo de microrganismos no leite também revela o conhecimento sobre o seu índice de contaminação que podem ser utilizadas na repressão da sua qualidade intrínseca e condições sanitárias da sua produção e saúde do rebanho. Considerando o potencial de multiplicação as bactérias no leite e as alterações químicas, tais como a degradação de gorduras, proteínas ou hidratos de carbono, estes microrganismo podem tornar o produto impróprio para consumo e industrialização (Primo, 1982).

3.3 Tratamento da Mastite

A mastite pode ser controlada com a utilização de substâncias germicidas nos tetos antes e após a ordenha, através da antibioticoterapia no período de secagem, eliminação de casos crônicos, tratamento dos casos clínicos durante a lactação e o adequado funcionamento dos equipamentos de ordenha (Philpot e Nickerson, 1992).

Um bom programa de controle deve ter como metas principais: erradicar as mastites contagiosas por *Streptococcus agalactiae*, controlar as infecções por *Staphylococcus aureus*, manter baixos os índices de mastites ambientais, contagem de células somáticas abaixo de 200.000 por ml/leite, menos de 2% de episódios clínicos ao mês e 85% das vacas livres de mastite subclínica (Muller e Ernst, 2002).

3.3.1 Antimicrobianos

3.3.1.1 Antissépticos e desinfetantes

Os antimicrobianos são substâncias químicas utilizadas para combater os microrganismos, são divididos em dois grupos: Agentes Inespecíficos, que atuam de modo geral, em microrganismos patogênicos ou não, sendo composto pelos antissépticos e desinfetantes e Agentes Específicos, que agem sobre microrganismos responsáveis por doenças infecciosas, sendo representados pelos quimioterápicos e antibióticos (BRASIL, 1999).

Vários trabalhos demonstraram a eficiência dos desinfetantes na redução dos casos de mastite subclínica quando utilizados de maneira adequada (Goldberg et al., 1994, Freitas, 1998, Jones, 1998, Brito, 2000) sendo capazes de diminuir os riscos de novas infecções da glândula mamária.

O uso apropriado de agentes desinfetantes tem como objetivo reduzir suficientemente a população de microrganismos patogênicos e evitar a potencial disseminação de agentes infecciosos. O método convencional de controle de mastite durante a ordenha consiste basicamente na lavagem dos tetos com água e assepsia com produtos químicos com ação antimicrobiana, como cloro, iodo ou quaternário de amônio (Ramalho et al., 2012).

O uso dos desinfetantes nas práticas de higiene da exploração leiteira é um costume antigo e ainda atual, que desempenha uma função muito importante na rentabilidade da fazenda, contribuindo para a produção de alimentos lácteos de alto padrão e para obtenção de um rebanho sadio. No entanto, variações no perfil de sensibilidade e resistência dos microrganismos envolvidos nos processos infecciosos da glândula mamária de animais de produção leiteira, podem comprometer os programas de controle da mastite (Coutinho et al., 2011).

A antisepsia pode ser realizada de duas formas: o pré e pós dipping, seus efeitos são distintos. O objetivo do pré- dipping, desinfecção dos tetos antes da ordenha, é impedir a contaminação dos tetos, impedindo a ocorrência de novas infecções, principalmente aquelas causadas por patógenos ambientais. O pós- dipping é uma estratégia direcionada sobre tudo para controlar a mastite contagiosa (Hoy; Soriano 2006).

Pré- dipping consiste na imersão completa dos tetos em solução antisséptica. O procedimento envolve: lavar os tetos com água e usar um desinfetante (sanitizante) aprovado. Um contato de 30 segundos do antisséptico com os tetos deve ser observado, para permitir a sua atuação. Em seguida, os tetos são secos cuidadosamente com papel-toalha, para evitar a contaminação do leite com resíduos do antisséptico (Schvar; Santos 2012).

Pós- dipping permite evitar a disseminação dos microrganismos no rebanho e prevenir a mastite subclínica. O antisséptico deve ser aplicado imediatamente após a ordenha, em todos os tetos do animal, para remover os resíduos de leite deixados nas extremidades dos tetos (que servem de substrato para as bactérias) e inativar as bactérias (Schvar; Santos 2012). O pós-dipping impede assim a colonização e entrada de bactérias no canal do teto, tendo em vista que ele se mantém aberto durante 20 a 30 minutos depois da ordenha (Souza, 2013).

Entretanto, os antissépticos podem apresentar pouca eficiência quando na presença de matéria orgânica, sujidades ou urina, dificultando desta forma a atuação eficaz do produto (Pankey et al., 1984, Quinn 1991). Costa et al., (1998) destacaram a importância do uso adequado dos desinfetantes no controle das mastites, uma vez que a presença de matéria orgânica determinou acentuada redução na eficiência dos mesmos.

Na maioria das propriedades, agentes desinfetantes são escolhidos por hábito de uso, facilidade de aplicação e preço. Os princípios ativos mais utilizados para desinfecção dos tetos são o iodo, clorexidina, ácido sulfônico, hipoclorito de sódio e quaternário de amônio (Ramalho et al., 2012). Como não existe um agente desinfetante ideal, deve-se ter em mente algumas considerações para escolha do desinfetante apropriado, tais como possuir amplo espectro de ação; ser atóxico e não irritante aos tecidos humano e animal; apresentar estabilidade na pele e ter custo acessível (Pedrini; Margatho 2003).

Com objetivo de minimizar a irritação e condicionar a pele dos tetos, são utilizadas algumas bases e emolientes na formulação desses germicidas, como a glicerina, lanolina, propilenoglicol, sorbitol, óleos vegetais, minerais e colágeno (Santos & Fonseca 2006).

3.3.1.2 Antibióticos

A antibioticoterapia é o procedimento mais utilizado no tratamento da mastite bovina (Pinto et al., 2001). A escolha de antibioticos adequados e eficientes deve ser criteriosa e sempre que possível baseada em resultados de teste de sensibilidade. O uso indiscriminado de antimicrobianos tem favorecido a seleção de cepas resistentes, o que ressalta a importância de levantamentos periódicos quanto à resistência bacteriana dos agentes causadores da mastite (Ferreira et al., 2010).

Os quimioterápicos são agentes químicos sintéticos com as mesmas finalidades de um antibiótico. Os antibioticos são substancias químicas produzidas a partir do metabolismo de bactérias e fungos. A função dos antibioticos é impedir temporariamente ou definitivamente as funções vitais de outros microrganismos através de efeitos bacteriostáticos e bactericida (BRASIL 1999).

Os principais grupos de antimicrobianos de uso animal são: Sulfonamidas, Aminoglicosídeos, Tetraciclina, Beta- lactâmicos, Macrolídeos, Quinolonas (Martins e Andrade, 2011). A terapia antimicrobiana é um componente importante de programas de controle e prevenção de mastites e é determinante para a eliminação da doença em rebanho leiteiro (3 ou 12).

3.3.3 Resistência bacteriana

Do ponto de vista epidemiológico, segundo o centro de controle e Prevenção de Doenças (CDC) de Atlanta, nos Estados Unidos, microrganismos resistentes são aqueles que resistem a uma ou mais classes de antimicrobianos. Sob a perspectiva laboratorial, entende-se como crescimento de uma bactéria *in vitro* na presença de concentrações séricas de antibiótico, ou quando se mostram resistentes a duas ou mais classes de drogas que interfeririam em suas funções de crescimento e, às quais seriam habitualmente sensíveis (Oliveira; Silva 2008).

O aparecimento de resistência a drogas antimicrobianas foi, e provavelmente continuará a ser um dos grandes problemas da medicina, pois uma das causas é mutação espontânea e recombinação de genes, que criam

variabilidade genética sobre a qual atua a seleção natural, dando vantagens aos mais aptos (Mota et al., 2005).

A origem da resistência microbiana pode ser genética ou não (cromossômica e extra- cromossômica). Na de origem não genética, ou seja, fenotípica, a bactéria adquire resistência à determinada droga, momentaneamente e, não consegue transmiti-la para sua progênie (Mota et al., 2005). Os meios não genéticos são: formação de biofilme, produção de enzimas inativadoras, composição bioquímica da parede celular bacteriana, impenetrabilidade do antibiótico (Oliveira; Silva 2008)

Com relação aos mecanismos genéticos de resistência, há três caminhos pelos quais isso pode acontecer, sendo eles: resistência inerente ou intrínseca, mutação genética e transferência de material genético (Oliveira; Silva 2008).

O aumento do uso de antibioticos ou seu uso indiscriminado no tratamento de mastite bovina aumenta o risco de seus resíduos no leite, o que contribui com a contaminação do ambiente, da cadeia alimentar e com a resistência dos microrganismos as drogas de importância para saúde humana (Ribeiro Junior; Beloti 2012).

A importância da aquisição de bactérias resistentes a partir de alimentos de origem animal esta relacionada à capacidade que possuem estes microrganismos de causar manifestações patológicas caso sejam capazes de superar as barreiras impostas pelo sistema de defesa do organismo hospedeiro (Miguel et al., 2012).

Outra implicação importante relacionada à presença de resíduos refere-se à ocorrência de problemas tecnológicos nas indústrias de alimentos, especialmente naquelas que utilizam bactérias ácido- lácticas (Martins; Andrade 2011). Para o ser humano, a presença de resíduos de antimicrobianos pode levar a seleção de cepas bacterianas resistentes, desequilíbrio da microbiota intestinal, efeitos teratogênicos, reações de hipersensibilidade e inibição da multiplicação bacteriana com redução da carga microbiana em análises laboratoriais. (Martins; Andrade 2011)

Porém, distintos genes de resistência podem ser trocados pelos microrganismos presente no intestino dos animais, ser adquiridos por microrganismos saprófitos do intestino humano e, posteriormente, transferida a

possíveis patógenos, que podem ser disseminados a outros indivíduos (Miguel et al., 2012).

Algumas estratégias podem ser adotadas para evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana: prevenção de infecções bacterianas com o uso de vacinas, uso racional de antimicrobianos, controle e prevenção da disseminação de microrganismos resistentes, desenvolvimento de novos antimicrobianos. Além disso, a caracterização dos genes responsáveis pela resistência, assim como sua localização, é de grande importância para o entendimento dos fatores envolvidos na resistência (Guimarães et al., 2010).

A presença da mastite no rebanho leiteiro eleva o gasto com medicamentos que são escolhidos, muitas vezes, de maneira aleatória, além disso, o uso indiscriminado de antimicrobianos tem favorecido a seleção de cepas resistentes, o que ressalta a importância de levantamentos periódicos quanto à resistência bacteriana dos agentes causadores de mastite bovina (22).

3.4 Testes antimicrobianos

O antibiograma é um teste que oferece como resultado padrão a resistência ou sensibilidade de uma amostra bacteriana específica a vários antimicrobianos.

Os métodos usados para realização do antibiograma baseiam-se na difusão do antimicrobiano a partir de disco colocados sobre a camada de Agar ou contato direto da suspensão padronizada da bactéria com diferentes concentrações do antimicrobiano, incorporados em meios de cultivo sólido ou líquido (Brito, 2009).

No método de difusão em Agar ou método de Kirby-Bauer, uma quantidade padrão do microrganismo patogênico é semeada uniformemente sobre uma placa contendo meio de cultivo específico e filtros impregnados com concentrações específicas de agentes antimicrobianos selecionados são colocados na superfície do Agar (Black et al., 2002).

A suscetibilidade antimicrobiana é definida qualitativamente de três formas: Sensível (S), que indica que a dose padrão do antibiótico deve ser apropriada para tratar a infecção pelo microrganismo isolado; Resistente (R),

que indica que a infecção causada pela cepa testada não deverá responder ao agente antimicrobiano; e Intermediário (I), onde os isolados são moderadamente suscetíveis ou moderadamente resistentes, e indica que a cepa pode ser inibida por altas doses do antibiótico ou em locais onde o agente antimicrobiano se concentra (Andrade; Hudson, 2012).

O método de diluição em caldo para testar a sensibilidade microbiana foi praticado, pela primeira vez, em tubos de caldos de cultura; entretanto hoje é realizado em microplacas padronizadas. Neste método, uma quantidade constante de inóculo bacteriano é introduzida em meios de cultura contendo concentrações decrescentes de um agente antimicrobiano. Após incubação, os tubos ou os orifícios são examinados, e é determinada a mais baixa concentração do fármaco que impede o crescimento visível do microrganismo (indicado pela turbidez ou depósitos em pontos dos organismos em crescimento). Esta concentração é definida como Concentração Inibitória Mínima (MIC) para um determinado fármaco, atuando sobre um microrganismo específico. Este teste pode ser feito para diversos fármacos simultaneamente, utilizando diversos conjuntos de tubos ou microplacas (Black et al., 2002).

O CLSI, (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), entidade responsável pela normatização de técnicas de laboratório clínico nos Estados Unidos, padronizou em um documento os testes de sensibilidade de bactérias frente à antimicrobianos, CLSI M7-A6, definindo variáveis como método e preparação de inóculo, composição, pH do meio a ser utilizado, temperatura, tempo de incubação e determinação dos critérios de leitura do teste.

Os testes de sensibilidade são indicados para qualquer organismo que contribua a um processo infeccioso que justifique terapêutica antimicrobiana, sempre que sua sensibilidade não possa ser predita de maneira confiável a partir do conhecimento da identidade do organismo. Os testes de sensibilidade são indicados, com maior frequência, quando se acredita que o microrganismo causativo, pertence a uma espécie capaz de apresentar resistência aos agentes antimicrobianos geralmente usados (CLSI, 2013).

O Teste de Eficiência de Desinfetantes é o teste padrão para avaliar *in vitro* a ação dos antissépticos. Vários autores (Pedrini e Margatho 2003, Schuch et al., 2008 Medeiros et al., 2009, Coutinho et al., 2012, Ramalho et al., 2012) vêm desenvolvendo esta metodologia que complementa a Concentração

Inibitória e Bactericida Mínima. A concentração e o tempo de contato são fatores que podem interferir na ação do desinfetante (Bessems 1998) e este binômio é citado como fundamental para o sucesso do efeito de desinfetante principalmente de compostos a base de hipoclorito de sódio.

3.5 Citotoxicidade

Segundo o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a compatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos e depois de comprovada a sua não toxicidade, é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório. Estudos demonstraram que os testes com culturas celulares podem ser utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução do estudo de biocompatibilidade *in vitro* (Rogerio et al., 2003).

Ensaio de avaliação da citotoxicidade permitem averiguar os efeitos tóxicos ou proliferativos da amostra-teste em culturas celulares, sendo de extrema importância durante o desenvolvimento de produtos (químicos, farmacêuticos, alimentos, biológicos e físicos) destinados ao uso humano ou em animais (Rogerio et al., 2003).

Experimentos celulares laboratoriais possibilitam reproduzir condições e até reações semelhantes às ocorridas no organismo podendo, dessa forma, observar e quantificar alterações sofridas pelas células frente a um determinado produto ou medicamento, bem como o comportamento de cada componente celular isoladamente (Castro et al., 2004).

Na literatura pesquisada não foram encontrados testes de citotoxicidade nas mesmas condições em que foi realizado esse estudo. Entretanto, estudos desenvolvidos por Pedrini & Margatho (2003) e Medeiros et al., (2009), evidenciaram que a solução de hipoclorito de sódio a 2% mostrou excelente eficácia contra todos os microrganismos testados, mas nessa concentração é extremamente irritante para pele do animal. Coutinho et al., (2012), relatou que soluções de iodo acima de 1% é contra indicado em pele inflamada por causar ação irritante, o ideal é usar baixas concentrações de iodo (0,5% ou menos).

Segundo Medeiros et al., (2012), a clorexidine na concentração recomendada, 2%, causa menor reação tecidual ou de pele, que o iodo, 0,5%, que são diluições recomendadas.

4 ARTIGO

Texto elaborado conforme as normas da Revista *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* qualis B2 em Ciências Biológicas II.

Bacteria in mastitis: survey and review

Bacteria from milk cows with clinical and subclinical mastitis: survey and literature review

Patrícia Jacob dos Santos¹, Josiara Furtado Mendes², Cristina Hallal de Freitas¹, Silvia Leal Ladeira³, Jesus Jaime Hernandez Escareño⁴, Helenice de Lima Gonzalez⁵, Patrícia da Silva Nascente^{1*}.

¹Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção

^{1*}Instituto de Biologia – Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Campus Universitário s/n Prédio 18 sala 14. CEP 96010-900. Capão do Leão - RS.
patsn@bol.com.br.

² Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias – Departamento de Farmacologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

³Faculdade de Veterinária – Laboratório Regional de Diagnóstico – UFPel;

⁴Departamento de Microbiologia - Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Autonoma de Nuevo Leon;

⁵Faculdade de Veterinária – Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal – UFPel.

ABSTRACT

Subclinical mastitis is the most prevalent and is responsible for 70% loss in production, reducing milk secretion by 45%. Already clinical mastitis has clinical signs besides reducing production. The aim of this study was to isolate and identify pathogenic aerobic bacteria in 94 milk samples with clinical (n=12) or subclinical (n=82) mastitis with CMT positive (+ + +), obtained from farms in the region of Pelotas - RS - Brazil. Samples previously identified in test tubes were cultured in blood agar, and reading the results performed within 24 hours of 36°C aerobically. Bacterial growth was observed in 62 (65.96%) samples. After the biochemical characterization identified: *Staphylococcus* sp. Negative Coagulase (n=29), *Staphylococcus* sp. Positive Coagulase (n=6), *Corynebacterium* spp. (n=16), *Streptococcus* spp. (n=7), *Streptococcus uberis* (n=4). The identification of the etiologic agent is important for the implementation of methods of control and prevention of mastitis and for monitoring of herd.

Key words: Mastitis, *Card Mastitis Test*, CMT, SCC.

INTRODUCTION

Milk is considered a complete food. To be rich in proteins, vitamins, fats, carbohydrates and minerals, it is an important source of nutrients for humans (Martins; Andrade 2011). And so it can be better used by the body, must be of excellent quality, thus ensuring efficiency (Mendonça et al. 1999). Alongside the milk and dairy products are excellent means for the development of desirable microorganisms, and other pathogenic and spoilage, thus requiring care from their production: milking, processing and storage (Guimarães; Langoni 2009). The microorganisms originate from the milk of infected udder, and the surface thereof or a variety of other sources in the environment property (Godkin; Leslie 1993).

Mastitis is characterized by an inflammation of the mammary gland related to physical, chemical, thermal or microbial, and 90% of mastitis are caused by bacteria (Ramalho et al. 2012). This disorder can be classified as a form of presentation as clinical or subclinical (Philpot; Nickerson 1991). The clinical presentation is characterized by visible signs, while the subclinical form displays a degree of difficulty to identify because there is no clinical changes in the mammary gland that can be observed macroscopically (Mira et al. 2013). The subclinical form is usually the most prevalent accounting for approximately 70% of production losses may reduce the secretion of milk by 45% (Fonseca; Santos 2000). In this case it is necessary to use other methods of diagnosis, such as Somatic Cell Count (SCC) and the *California Mastitis Test* (CMT) (Harmon 1994, Machado et al. 2000, Della Libera et al. 2011). In Brazil it can be said that subclinical mastitis is present in all dairy herds (Machado et al., 2000). Several surveys conducted since 1992 indicate high incidence, with rates ranging from 14.4% to 58.8% of infected cows per herd (Harmon, 2001).

The pathogens involved in the etiology of bovine mastitis can be classified into "major" and "minor". The first category includes agents that cause higher SCC, significant changes in milk composition and, consequently, a great economic impact, the main ones being: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, Coliforms, *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Actinomyces pyogenes* and *Serratia* spp. Negative Coagulase (NC) *Staphylococcus* and *Corynebacterium bovis* pathogens are considered "minor" and promote moderate inflammation with lower SCC (Harmon 1994).

Considering the source of infection, the agents of mastitis are classified, infectious (primary mastitis), such as: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma* spp., *Corynebacterium bovis*, NC *Staphylococcus*, or environmental (secondary mastitis) such as *Escherichia coli*, Coliforms, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus equinus* (formerly *S. bovis*) and other environment *Streptococcus* spp. (Costa et al. 1998, Mendonça et al. 1999).

The increase in somatic cells is the main feature used for the diagnosis of subclinical mastitis, other factors may however result in this change. There are several tests that assess Somatic Cell Count (SCC) of milk from these tests highlight the CMT, WMT (Wisconsin Mastitis Test) and Electronic Somatic Cell Count (SCC) (Rupp et al. 2000). The cultivation of milk samples from individual mammary quarters is used to identify an etiologic agent, especially in cases of positive CMT (Bramley et al. 1996, Sears et al. 1993). The results obtained in the investigation of the causal agents of mastitis are fundamental to the understanding of the specific problems of the herds, to guide rational measures to control mastitis and suggest changes regarding the management adopted, including performing susceptibility testing to indicate best medication for treatment (Radostitis et al. 1994, Bramley et al. 1996). The use of

diagnostic tests indirectly leads to a reduction in mastitis cases, providing thus a higher quality milk product (Mira et al. 2013).

The aim of this study was to isolate pathogens causing clinical and subclinical with positive CMT (+++) mastitis in 94 milk samples obtained on farms in the region of Pelotas - RS - Brazil in six months referred to the Regional Diagnostic Laboratory at the Faculty of Veterinary UFPel.

MATERIALS AND METHODS

Were followed during the period of six months, four dairy farms herd Jersey and Dutch in Pelotas - RS to check cases of clinical and subclinical mastitis (CMT + + +). The four farms milking were performed twice a day, with a mean interval of 12 hours. During visits evaluated all lactating cows. The clinical mastitis was diagnosed by testing “Dark Background Coffee” and subclinical mastitis was used the California Mastitis Test (CMT). Milk was collected about 10 ml in sterile test tubes, individual, being performed disinfection of the teat orifice with cotton soaked in alcohol 70°GL, identified for each mammary quarter and shipped immediately after collection, to the Regional Laboratory Diagnostics - Faculty of Veterinary UFPel under refrigeration in insulated containers with ice.

In the laboratory, samples were plated on blood agar (8% defibrinated sheep blood), the reading of the plates held at 18 to 24 hours in an oven maintained at a temperature of 36°C in aerobic atmosphere. The samples which were subjected to bacterial growth making smear stained by Gram and subsequently to the appropriate biochemical tests such as catalase, coagulase and assimilation of carbohydrates for their identification.

From the total number of mammary quarters analyzed calculated the percentage of clinical mastitis, subclinical (CMT + + +), non-infectious and infectious and the data were analyzed descriptively. Of the 94 samples analyzed, 82 were from subclinical mastitis (CMT + + +) and 12 derived from clinical mastitis.

RESULTS AND DISCUSSION

The test result CMT is determined according to the degree of gelation or viscosity of the mixture of equal parts milk and reagent (2 ml) in the appropriate tray. The results may be negative or positive scores, the latter being classified in three levels (+, + +, + + +) and in this case were selected for the analysis process microbiological those with scores + + +, as well as cases of clinical mastitis, or the presence of clinical signs. The increase in viscosity of the milk samples positive by bacteriological examination occurs due to the increase of leukocytes into the alveolar lumen, which is related to the pathogenicity of the causative agent (Souza et al. 2009).

Samples represented 82 (87.2%) score CMT + + + and 12 (12.8%) clinical mastitis. The bacterial isolation was observed in 62 (65.9%) samples: 12 (19.36%) originated from clinical mastitis and in 50 (80.64%) from subclinical mastitis. Considering only subclinical mastitis (n = 70) bacterial isolation was 50, representing 71.43%.

Philpot & Nickerson (1991) indicate that 90% of mastitis are caused by bacteria. In addition to these pathogens, fungi, yeasts, algae and viruses may also be involved in the etiology of the disease, but the occurrence is low. According to Ribeiro et al. (2003) infectious subclinical mastitis is one that presents positive test result for CMT, or other tests indicative and confirmed by microbial growth. This test was chosen because it is one of the most popular and practical tests for the diagnosis of subclinical mastitis,

which analyzes separately the mammary glands of lactating cows (Philpot 1994, Della Libera et al. 2011).

In relation to subclinical mastitis, similar to the results observed in this study, other authors did not have 100% of bacterial isolation in CMT positive milk samples. Costa et al. (1986) reported bacterial growth at 88.79% between 2533 CMT positive milk samples, originating from 32 dairy properties, eighteen municipalities of the state of São Paulo. Filippesen et al. (1999) showed that of 1.319 mammary quarters with CMT positive, 670 (50.03%) presented in isolation microbiological, and Brito et al. (1999) analyzed samples 6315, found that in 57.6% of bacteria were isolated. Beloti et al. (1997) working with 295 milk samples from subclinical mastitis, bacterial growth obtained in 223 (75.60%) samples. These results are lower than those obtained in the present study. At the same time Costa et al. (1995) reported 46.54% positive mammary quarters the CMT showed bacterial isolation.

Previously, Costa et al. (1986) bacteria isolated in 88.79% of 2,533 milk samples originating from 32 dairy farms in the state of São Paulo, higher than those cited in this paper in relation to subclinical mastitis.

A study conducted by Ribeiro et al. (2001a) observed that the total of 9.079 with a positive reaction to CMT, 4.952 (54.54%) showed microbial growth. Ribeiro et al. (2001b) showed that of 9.150 samples with positive CMT, 4.988 (54.51%) had bacterial isolation. In another study Ribeiro et al. (2001c) found that of 1.554 samples positive to the CMT, 596 (38.35%) presented microbial isolation. Confirming that not all milk samples positive present CMT bacterial growth. The same author notes that the greater the intensity of the reaction to CMT greater the number of samples positive microbiologically. This justifies the high percentage of this work insulations in cases of CMT positive, since it was only evaluated score + + +. To Brito et al. (1999), the

number of bacterial isolates increased with the intensity of the reaction to CMT. Regarding 32 (34.1%) samples with CMT + + + found in this study, which showed no bacterial isolation, can be explained by some physiological interferences. There are several factors that can influence the variation of SCC being cited: the order of birth, lactation, month and season (Schepers et al. 1997, Laevens et al. 1997, Souza et al. 2005, Cunha et al. 2008). For this reason, the CMT test should be performed as presumptive test for mastitis, just as it is necessary to repeat the microbiological examination in these cases. The inflammation may also be present without an infectious process in the gland, due to traumatic injuries, assaults by chemical agents, among other factors. The microbial agent may further have already been eliminated by the natural way of self-healing processes, resulting in a negative culture (Ribeiro et al. 2003, Brito et al. 1999, Skrzypek et al. 2004, Gomes et al. 2011).

Costa et al. (2001), in their study, 8.116 samples were collected from the mammary glands negative CMT, and 45.1% were isolated microorganisms contagious. Moreover, the test samples positive CMT not always show microbial growth. According to the author, it is suspected that the agent is not removed continuously false negative result may occur. According to Sears et al. (1993) and Brito et al. (1999), samples of milk should be confirmed microbiologically negative only after two or three analyzes.

Freitas et al. (2005) analyzed 984 quarters breast. Of these, 10 (1.0%) had clinical mastitis and 562 (57.1%) subclinical mastitis. Correlating the CMT test with microbiological examination, it was found that 562 of subclinical mastitis, only 356 (63.3%) were positive for microbiological examination. The positive results in CMT, but negative in microbiological examination may indicate an inflammatory etiology of nonbacterial, because according to Costa et al. (1996), the CMT is a helper method in

good correlation with the microbiological examination, however, the inflammatory process may not be of infectious origin.

The results reported for the identification of subclinical mastitis by CMT suggest greater caution in the use of this test as an indicator of intramammary infection by the finding of large numbers of milk samples without microbial growth, since it is probably a non-infectious subclinical mastitis. And we still need to work proactively in mastitis control, it is a disease management and to make a proper prevention, it is necessary to consider the entire property management, mainly including hygienic measures (Carvalho et al. 2002, Silva et al. 1998). These results are worrying, since according to Prado et al. (1997) the subclinical form is responsible for the largest losses in the production and composition of milk.

In cases of clinical mastitis in 100% of cases was bacterial isolation, indicating that there is always the microbial involvement when the clinical signs are apparent. After the biochemical characterization identified: Negative Coagulase *Staphylococcus* spp. (n=29), Positive Coagulase *Staphylococcus* spp. (n=6), *Corynebacterium* spp. (n=16), *Streptococcus* spp. (n=7), *Streptococcus uberis* (n=4) (Table 1). The identification of the etiologic agent is important for the implementation of methods of prevention and control and monitoring of the herd. The importance of diagnosing subclinical mastitis and apparently healthy, the use of CMT, is to discover which animals can be transmitters of infection by line or by hand milking the milker (Bramley et al. 1996, Harmon 1994). These animals besides being sources of contamination, contribute by low milk quality and lower total volume produced, which reflects in economic losses to property (Moeini et al. 2002). However, despite the bacteriological diagnosis to be crucial, it is expensive and time consuming, not being applicable to herds with large numbers of animals. Several simplifications have been studied in order

to eliminate these difficulties, the use of special culture media and creating schemes presumptive identification (Ribeiro et al. 2003, Figueiredo 1995).

The species isolated in this study belonged to the classification of major pathogens (53.2%) and minor (46.8%), environmental (11.3%) and infectious (88.7%) and primary (27.4%) and secondary (72.6%). Among the contagious pathogens, *Staphylococcus aureus* is the most frequent in cases of bovine mastitis (Zschöck et al. 2000). According Gentilini et al. (2002) currently CN *Staphylococcus* have received greater importance as causative agents of intramammary infections in dairy cattle worldwide.

The most common microorganisms in cases of bovine mastitis are *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Corynebacterium* spp., *Escherichia coli*, *Nocardia* spp. *Prototheca* and *zopffi* (Brabes et al. 1999). The *S. aureus* is known worldwide as a causative agent of various purulent diseases in both humans and animals (Bean; Griffin 1990) is also one of the most important causes of food poisoning (Penna et al. 1998) due to production of various enterotoxins (Omoe et al. 2002). Thus, the milk and dairy products are important vehicles of *S. aureus* and are commonly involved in outbreaks of food poisoning (Bergdoll, 1989).

Although most articles reviewing belong to Brazilian studies in other countries, such as Sweden, the isolated species are the same: The most common isolates of 590 bacteriological diagnoses were *Staphylococcus aureus* (19%) and NC *Staphylococcus* sp. (NCS 16%) followed by *S. dysgalactiae* (9%), *S. uberis* (8%), *Escherichia coli* (2.9%), and *Streptococcus* spp. (1.9%) (Persson et al. 2012). The distribution of the most commonly isolated bacteria considering only bacteriological positive samples

were: *S. aureus* (31%), *NC Staphylococcus* spp. (27%), *S. dysgalactiae* (15%), *S. uberis* (14%), *E. coli* (4.8%), and *Streptococcus* spp. (3.1%).

The correct identification of *S. aureus* from bovine mastitis is important both from the epidemiological point of view as the prevention of infections, including immunoprophylaxis (Brito et al. 2002). In Pernambuco, Pinheiro de Sá et al. (2000) found that the most common microorganisms in cases of bovine mastitis were *Staphylococcus* spp. (32.6%) and *Corynebacterium* spp. (13.2%), but among *Staphylococcus* isolated, the species *S. aureus* was the most prevalent (66.4%).

In 2001, a nationwide survey was conducted in Finland to estimate prevalence of bovine mastitis, distribution of mastitis pathogens. The results were compared with those of a previous survey done in 1995. The prevalence of mastitis continued to decrease from 38% in 1995 to 31% in 2001. This mainly resulted from increased prevalence of *Corynebacterium bovis*. *NC Staphylococcus* spp. remained the most common bacterial group, comprising almost one-half of the pathogens isolated, whereas the relative number of *Staphylococcus aureus* isolations decreased from the time of the previous study. Compared with the other Nordic countries, penicillin resistance among the *Staphylococcus* spp. was still at a relatively high level in Finland (52.1 and 32.0% for *Staphylococcus aureus* and *CN Staphylococcus*, respectively) (Pikala et al. 2001).

Mastitis causing *CN Staphylococcus* and *Staphylococcus aureus* are compared to Taponen; Pyörälä (2008). *Staphylococcus* spp. are the bacteria most commonly isolated from bovine mastitis, and CNS are now predominant over *S. aureus* in most countries. CNS include various species, but only a few prevail in bovine mastitis. *S. aureus* can cause clinical mastitis, but often causes subclinical mastitis, which remains persistent and increases milk somatic cell count. CNS, traditionally regarded as minor pathogens,

seem to lack the ability to cause severe mastitis. CNS can, however, persist in the mammary gland and moderately increase milk somatic cell count.

Freitas et al. (2005) noted that the most prevalent agents in bovine mastitis in Pernambuco (Brazil) were 36% NC *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. 34.8% and *S. aureus* 13.6%.

Besides the problems with the infected animals, the study of microorganisms in milk also reveals knowledge about its index of microbial contamination that can be used in the prosecution of its intrinsic quality and sanitary conditions of its production and herd health. Considering the potential to multiply the bacteria in the milk can cause chemical changes such as degradation of fats, proteins or carbohydrates, which may render the product unfit for consumption and industrialization (Cousin 1982).

It has questioned the interpretation of the CMT as diagnosing subclinical mastitis, being a subjective test with false-positive or false-negative (Martin et al. 1994, Casura et al. 1995). However, even with some positive results in CMT, but that does not indicate an infectious process, the articles reviewed indicate that this test should be routinely performed for measures in the handling of animals and milking line are adopted to ensure maximum production and quality of milk (Barbosa et al. 2002, Oliveira et al. 2011).

CONCLUSION

Based on these results, it was observed that the presence of bacteria in samples positive for CMT may represent subclinical mastitis, it is important to perform the test and prevention of mastitis, however no risk of positive results, which is not observed bacterial isolation and should to check other factors which cause this type of result. The results regarding the identification of subclinical mastitis by *California Mastitis Test* (CMT) suggest greater caution in use as an indicator of intramammary infection by finding milk samples without bacterial isolation, likely in the case of subclinical mastitis noninfectious.

REFERENCES

- Barbosa CP, Benedetti E, Ribeiro SCA, Guimarães EC 2002. Relação entre contagem de células somáticas (CCS) e os resultados do “California Mastitis Test” (CMT) no diagnóstico de mastite bovina. *Bioscience Journal* 18 (1): 93-102.
- Bean NH, Griffin PM 1990. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: pathogens, vehicles, and trends. *Journal of Food Protection* 53 (9):804-817.
- Beloti V, Müller EE, Freitas JC, Mettifogo E 1997. Estudo da mastite subclínica em rebanhos leiteiros no norte do Paraná. *Seminário Ciências Agrárias* 18 (1):45-53.
- Bergdoll MS 1989. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle MP (Ed.). *Foodborne bacterial pathogens*. New York: Marcell Dekker: 463-523.
- Brabes KCS, Carvalho EP, Dionísio FL, Pereira ML, Garino F, Costa EO 1999. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas do gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos Estados de São Paulo e Minas Gerais. *Revista Napgama* 2(3):4-11.
- Bramley AJ, Cullor JS, Erskine RJ, Fox LK, Harmon RJ, Hogan JS, Nickerson SC, Oliver SP, Smith KL, Sordillo LM 1996. *Current of Bovine Mastitis*. 4th ed. Madison: National Mastitis Council. 64p.
- Brito MAVP, Brito JRF, Ribeiro MT, Veiga VMO 1999 Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 51(2): 33-35.
- Brito MAVP, Brito JRF, Portugal JAB 2002. Identificação de contaminantes bacterianos no leite cru de tanques de refrigeração. *Rev Inst Lat Când Tostes* 57: 47-52.
- Carvalho LA, Novaes LP, Martins CE, Zoccal R, Moreira P, Ribeiro ACCL, Lima VMB 2002. Embrapa Gado de Leite Sistema de Produção 2 In:

http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/manejo/ma_mite.html Acessado em 02/09/2007.

Casura C, Schukken YH, Rüsç P 1995. Quality assessment of California mastitis test as a diagnostic tool in quarter somatic cell count estimation. *Proc. IDF Int. Mastitis Seminar 3*: 57-3.58.

Costa EO, Coutinho SD, Teixeira CM 1986. Etiologia bacteriana da mastite bovina no estado de São Paulo, Brasil. *Revista Microbiológica 17*(2): 107- 112.

Costa EO, Carciofi AC, Melville PA, Prada MS, Schalch U 1995. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária 17*:156-159.

Costa EO, Melville PA, Ribeiro AR, Watanabe ET, Carciofi AC, Porada MS 1996. Desinfecção mamária pós-ordenha: avaliação de sua eficiência no controle de mastite bovina. In: *Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária 24*. Goiânia, GO. Anais...:123.

Costa EO 1998. Importância da mastite na produção leiteira do Brasil. *Revista de Educação Continuada do CRMV-SP 1*:3-9.

Costa EO, Ribeiro AR, Garino Jr. F, Silva JAB, Watanabe ET, Delibre E, Leão EF 2001. Portador: um importante elo na epidemiologia de mastite infecciosa bovina. In: *Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária 28* 2001, Salvador, Anais....: 159.

Cousin MA 1982. Presence and activity psychrotrophic microorganisms in **milk** and **dairy** products. *Journal of Food Protection 45*:172.

Cunha RPL, Molina LR, Carvalho AV, Facury Filho EJ, Ferreira PM, Gentilini MB 2008. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número e lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. *Arq Bras Med Vet Zootec 60*:19-24.

Della Libera AMMP, Souza FN, Blagitz MG, Batista CF 2011. Avaliação de indicadores inflamatórios no diagnóstico da mastite bovina. *Arquivos do Instituto Biológico* 78 (2):297-300.

Figueiredo JB 1995. Mamite bovina: visão panorâmica de uma doença complexa *In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal 11* Belo Horizonte. Anais...:176.

Filippsen LF 1999. Prevalência da mastite bovina causada por *Prototheca zopfii* em rebanhos leiteiros, na região Norte do Paraná. *Ciência Rural* 29(1): 87-89.

Fonseca LFL, Santos MV 2000. *Qualidade do Leite e Controle de Mastite*. São Paulo: Lemos Editorial 175p.

Freitas MFL, Pinheiro Júnior JW, Stamford TLM, Rabelo SSA, Silva DR, Silveira VM, Santos FGB, Sena MJ, Mota RA 2005. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus coagulase positivos* isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco *Arq Inst Biol* 72(2): 171-177.

Gentilini E, Denamiel G, Betancor A 2002. Antimicrobial susceptibility of Coagulase-Negative *Staphylococci* isolated from bovine mastitis in Argentina. *Journal of Dairy Science* 85:1913-1917.

Godkin MA, Leslie KE 1993. Culture of bulk tank milk as a mastitis screening test: a brief review. *Canadian Veterinary Journal* 34:601-605.

Gomes V, Madureira KM, Della Libera AMMP, Blagitz MG, Alves M, Baptistella F, Benesi FJ 2011. Dinâmica da celularidade do colostro de vacas da raça Holandesa no pós-parto imediato. *Arq Bras Med Vet Zootec* 63(5):1047-1053.

Guimarães FF, Langoni H 2009. Leite: Alimento imprescindível, mas com riscos para saúde pública. *Vet e Zootec* 16(1): 38-51.

Harmon RJ 1994. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Re.* 77: 2103-2112.

- Harmon RJ 2001. Somatic cell counts: a primer. *In: Annual Meeting National Mastitis Council 40*. Reno. Anais... Madison: National Mastitis Council: 3-9.
- Laevens H, Deluyker H, Schukken YH, De Meulemeester L, Vandermeersch R, De Muñenaere E, De Kruif A 1997. Influence of parity and stage of lactation on the somatic cell count in bacteriologically negative dairy cows. *J Dairy Sci* 80:3219-3226.
- Machado PF, Pereira AR, Silva LFP 2000. Células somáticas no leite em rebanhos brasileiros. *Scientia Agricola* 57(2): 359- 361.
- Martin SW, Meek AH, Willeberg P 1994. Measurement of disease frequency and production, p. 48-76. *In: Martin S. W., Meek A. H. & Willeberg P. (ed.) Veterinary Epidemiology. Principles and Methods*. Iowa State University Press, Ames.
- Martins PF, Andrade HV 2011. Identificação de Resíduos de Antibióticos na Recepção de Leite Cru Pré-Beneficiado Como Implantação do Plano APPCC em Laticínios. *FAZU em Revista* 8:108-114.
- Mendonça CL, Fioravante MCS, Silva JA 1999. Etiologia da mastite bovina. *Veterinária Notícias* 5(1):107-118.
- Mira SC, Della Libera AMP, Souza NF, Lima SM, Blagitz GM 2013. Celularidade do leite no diagnóstico de infecções intramamárias em bovinos. *Rev Cienc Agrar* 56(1):7-11.
- Moeini MM, Sanjabi MR, Ahadi AH 2002. High bacteria count in milk and it's economic loss. *In: World Buiatrics Congress 22*. Hannover. Anais...: 9-10.
- Oliveira CMC, Sousa MGS, Silva NS, Mendonça CL, Silveira JAS, Oaigen RP, Andrade SJT, Barbosa JD 2011. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. *Pesq Vet Bras* 31(2):104-110.
- Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, Hu D, Ueda S, Shinagawa K 2002. Detection of *seg*, *she*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the

enterotoxin productivities of *Staphylococcus aureus* isolates harborin *seg*, *seh*, or *sei* genes. *J Clin Microbiol* 40 (3):857-862.

Penna TCV, Colombo AJ, Abe LE, Machoshvili SAM 1998. Parâmetros de resistência térmica de cepas de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos no leite. *Rev Farm Bioq* 24:113-117.

[Persson Y](#), [Nyman AK](#), [Grönlund-Andersson U](#) 2012. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *PLoS One* 7(10).

Pikala [M](#), [Haveri S](#), [Pyörälä V](#), [Myllys T](#), [Honkanen-Buzalski](#) 2009. Bovine mastitis in Finland 2001 prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *Vet Microbiol.* 16 (1-2):29-36.

Pinheiro de Sá ME, Mota RA, Souza MI, Oliveira AAF 2000. Etiologia da mastite subclínica em bovinos leiteiros do agreste meridional do Estado de Pernambuco. *Rev Bras Ciênc Veter* 7(2):100-1003.

Philpot WN 1994. Dairy herd management practices for improving milk quality and controlling mastitis *In: Dairy Research Report*. Louisiana State University p.13-25.

Philpot WN, Nickerson SC 1991. *Mastitis: Counter Attack*. A strategy to combat mastitis. Illinois: Badson Brothers Co.150p.

Prado E, Cruz FER, Viana FC 1997. Problemas sanitários do rebanho de leite: percepção dos criadores. *Arq Bras Med Vet Zoot* 49(1): 19-29.

Radostitis OM, Leslie KE, Fetrow J 1994. Mastitis control in dairy herds. *In: Radostitis OM, Leslie KE, Fetrow J. Herd health food animal production medicine*. Philadelphia: WB Saunders p.229-276.

Ramalho CA, Soares KDA, Silva DF, Barros MRC, Junior JWP, Oliveira JMB, Mota RA, Medeiros ES 2012. Eficácia *in vitro* de desinfetantes comerciais utilizados no pré e

pós-dipping frente a *Staphylococcus* spp. isolados em rebanhos leiteiros. *Pesq Vet Bras* 32(12):1285- 1288.

Ribeiro ME, Petrini LA, Aita MF, Balbinotti M, Stumpf JrW, Gomes JF, Schramm RC, Martins PR, Barbosa RS 2003. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. *Rev Bras Agroci* 9(3):287-290.

Ribeiro MER, Stumpf Jr W, Gomes JF, et al. 2001a. Relação de CMT positivo e crescimento microbiológico no diagnóstico da mastite bovina na região sul do Rio Grande do Sul. In: Congresso Brasileiro de Zootecnia 21. *Congresso Internacional de Zootecnia 3*. Goiânia. SBZ. Anais...: 98.

Ribeiro MER, Stumpf Jr. W, Gomes JF, et al. 2001b. Ocorrência de *Streptococcus* sp. em Unidades de Produção Leiteiras monitoradas na região sul do Rio Grande do Sul. In: *Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária 28*. Salvador. SBMV Anais...: 162.

Ribeiro MER, Stumpf Jr W, Gomes JF, et al. 2001c. Mastite causada por *Staphylococcus* coagulase negativa em um rebanho Jersey na região de clima temperado In: *Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária 28*. Salvador. SBMV Anais...: 162.

Rupp R, Beaudeau F, Boichard D 2000. 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* 46:99-111.

Schepers AJ, Lam TJGM, Schukken YH, Wilmink JBM, Hanekamp WJA 1997. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. *J Dairy Sci* 80:1833-1840.

Sears PM, Gonzaléz RN, Wilson DJ, Han HR 1993. Procedures for mastitis diagnosis and control. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 9 (3):445-468.

Silva N, Lobato FCF, Costa GM 1998. Mastitis aguda espontânea por *Klebsiella* en bovinos Holstein. In: *Panamerican Congress on Mastitis Control and Milk Quality*, Mérida, México. p.144-147.

Skrzypek R, Wójtowski J, Fahr RD 2004. Factors affecting somatic cell count in cow bulk tank milk – A case study from Poland. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 51(1): 127-131.

Souza GN, Brito JRF, Moreira EC, Brito MAVP, Silva MVGB 2005. Fatores de risco para alta contagem de células somáticas do leite do tanque em rebanhos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil. *Arq Bras Med Vet Zootec* 57(2):251-260.

Souza GN, Moreira EC, Brito JRF, Brito MAVP, Silva MVGB 2009. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. *Arq Bras Med Vet Zootec* 61(5):1015-1020.

Taponen S, Pyörälä S 2011. Coagulase Negative *Staphylococci* as cause of bovine mastitis- not so different from *Staphylococcus aureus*? [*Acta Vet Scand*](#) 8:53-36.

Zschöck M, Botzler D, Blöcher S, Sommerhäuser J, Hamann H P 2000. Detection of genes for enterotoxins (*ent*) and toxic shock syndrome toxin-1 (*tst*) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase-chain-reaction. *Int Dairy J* 10:569-574.

TABLE I

Microorganisms isolated from milk of cows with mastitis in Pelotas - State of Rio Grande do Sul

Microorganisms	AF	RF	Clinical mastites	Subclinical mastitis
Coagulase negative <i>Staphylococcus</i> spp.	29	46,8%	3	26
Coagulase positive <i>Staphylococcus</i> spp.	6	9,7%	3	3
<i>Corynebacterium</i> spp.	16	25,8%	0	16
<i>Streptococcus</i> spp.	7	11,3%	4	3
<i>Streptococcus uberis</i>	4	6,4%	2	2
TOTAL	62	100%	12	50

AF – Absolute Frequency RF – Relative frequency

5 CONCLUSÃO

A identificação de bactérias em leite pode ocorrer em amostras de mastite bovina clínica e subclínica, sendo considerado um método importante de diagnóstico à identificação do agente causador.

Os isolados bacterianos que apresentaram maior suscetibilidade aos antissépticos foram *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativo e isolados de *Staphylococcus* positivo. Assim como exemplares das mesmas espécies apresentaram menor suscetibilidade aos antissépticos (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase positivo e *Leuconostoc mesenteroides* spp *cremoris*).

Através do teste de eficiência de desinfetantes o isolado que apresentou melhor eficiência em menor tempo foi *Staphylococcus aureus* frente ao clorexidine. Assim como foi constatado que a matéria orgânica é um fator protetor ao microrganismo, nos diferentes tempos testados.

6 PERSPECTIVAS

Perspectivas futuras para estudo:

- ✓ Estudo diversidade genética dos isolados multirresistentes.
- ✓ Fatores virulência.
- ✓ Produção biofilme.
- ✓ Verificar a capacidade das cepas isoladas, quanto à produção de toxinas.
- ✓ Realizar antibiograma no sistema vitek².
- ✓ Estudo de epidemiologia local.
- ✓ Testar os isolados com novos fármacos a serem utilizados como antibióticos.

7 REFERÊNCIAS

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

BEAN, N.H., GRIFFIN, P.M., Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: pathogens, vehicles, and trends. **Journal of Food Protection**, v.53, n.9, p.804-817, 1990.

BELOTI, V., MULLER, E.E., FREITAS, J.C., METTIFOGO, E., Estudo da mastite subclínica em rebanhos leiteiros no norte do Paraná. **Seminário Ciências Agrárias**, v.18, n.1, p.45-53, 1997.

BERGDOLL, M.S., Staphylococcus aureus. In: Doyle MP (Ed.). **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcell Dekker, p. 463-523, 1989.

BLACK, J. G. **Microbiologia fundamentos e perspectivas**. 4. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 2002. 500p.

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

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa MAPA nº 42, de 20 de dezembro de 1999 -Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR, e os Programas de

Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel - PCRM, Leite - PCRL e Pescado - PCRP. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. 1999. Seção 1- Anexo I. p.1. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa MAPA nº 62,- **Diário Oficial [da] União, Brasília**, n. 432. Seção 1- Anexo I, p.14. 2011.

BRITO, M.A.V.P., BRITO, J.R.F., RIBEIRO, M.T., VEIGA, V.M.O., Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.2, p. 33-35. 1999.

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

BRITO, M.A.V.P., BRITO, J.R.F., PORTUGAL, J.A.B.,. Identificação de contaminantes bacterianos no leite cru de tanques de refrigeração. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes** 57: 47-52. 2002.

CARVALHO, L.A., NOVAES, L.P., MARTINS, C.E., ZOCCAL, R., MOREIRA, P., RIBEIRO, A.C.C.L., LIMA, V.M.B., 2002. Embrapa Gado de Leite Sistema de Produção 2. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/manejo/mamite.html> Acessado em 02 ago. 2012.

CASURA, C., SCHUKKEN, Y.H., RÜSCH, P., Quality assessment of California mastitis test as a diagnostic tool in quarter somatic cell count estimation. **Proceedings of the third. IDF International Mastitis Seminar**. V.3, n.3, p.57-.58. 1995.

CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition*. **CLSI document M7-A6** [ISBN 1-56238-486-4]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

COSTA, E.O., COUTINHO, S.D., TEIXEIRA, C.M.,. Etiologia bacteriana da mastite bovina no estado de São Paulo, Brasil. **Revista Microbiológica**, v.17, n.2, p.107- 112, 1986.

COSTA, E.O., CARCIOFI, A.C., MELVILLE, P.A., PRADA, M.S., SCHALCH, U., Estudo etiológico da mastite clínica bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.17, p.156-159. 1995.

COSTA, E.O., MELVILLE, P.A., RIBEIRO, A.R., WATANABE, E.T., CARCIOFI, A.C., PORADA, M.S., Desinfecção mamária pós-ordenha: avaliação de sua eficiência no controle de mastite bovina. In: **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária 24**. Anais...: Goiânia, GO. 1996, p.123.

COSTA, E.O., Importância da mastite na produção leiteira do Brasil. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP** v.1, n.3, p.9, 1998.

COSTA E. O, RIBEIRO AR, GARINO JR. F, SILVA JAB, WATANABE ET, DELIBRE E, LEÃO EF 2001. Portador: um importante elo na epidemiologia de mastite infecciosa bovina. In: **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária 28, Anais....**, Salvador, 2001, p.159.

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

CUNHA, R.P.L., MOLINA, L.R., CARVALHO, A.V., FACURY FILHO, E.J., FERREIRA, P.M., GENTILINI, M.B., Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número e lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v.60, p.19-24. 2008.

DELLA LIBERA, A.M.M.P., SOUZA, F.N., BLAGITZ, M.G., BATISTA, C.F., Avaliação de indicadores inflamatórios no diagnóstico da mastite bovina. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, n.2, p.297-300, 2011.

FIGUEIREDO, J.B., Mamite bovina: visão panorâmica de uma doença complexa **In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal 11**, Anais ...: Belo Horizonte, 1995, p.176.

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

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

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

GENTILINI, E., DENAMIEL, G., BETANCOR, A., Antimicrobial susceptibility of Coagulase-Negative *Staphylococci* isolated from bovine mastitis in Argentina. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.1913-1917. 2002.

GOLDBERG, J.J., MURDOUGH, P.A., HOWARD, A.B. & DRECHSLER, P.A. Evaluation of a 1 percent iodophor postmilking teat sanitizer. **Journal Dairy Science**. v.77, n.33, p.740-747. 1994.

GODKIN, M.A., LESLIE, K.E. Culture of bulk tank milk as a mastitis screening test: a brief review. **Canadian Veterinary Journal**, v.34, p.601-605. 1993.

GOMES, V., MADUREIRA, K.M., DELLA LIBERA, A.M.M.P., BLAGITZ, M.G., ALVES, M., BAPTISTELLA, F., BENESI, F.J. Dinâmica da celularidade do colostro de vacas da raça Holandesa no pós-parto imediato. **Arquivos Brasileiros Medicina Veterinária Zootecnia**, v.63, n.5, p.1047-1053. 2011.

GUIMARÃES, F.F., LANGONI, H., Leite: Alimento imprescindível, mas com riscos para saúde pública. **Revista Veterinária e Zootecnia**. V.16, n.1, p.38-51. 2009.

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

HARMON, R.J., Somatic cell counts: a primer. In: **Annual Meeting National Mastitis Council 40th, Reno**. Anais... Madison: National Mastitis Council, p.3-9. 2001.

HUDSON, Holanda Andrada. **Genotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* Isolados de mastites subclínica bovina no distrito federal e entorno**. 2012, 46f. Dissertação Mestrado (Mestrado em saúde Animal)-Faculdade de Agronomia e Veterinária. Universidade de Brasília.

JONES, G.M. Milking practices recommended to assure milk quality and prevent mastitis. **Dairy Science, Virginia Cooperative Extension**, p.404-227. 1998.

LAEVENS, H., DELUYKER, H., SCHUKKEN, Y.H., DE MEULEMEESTER, L., VANDERMEERSCH, R., DE MUÏLENAERE, E., DE KRUIF, A., Influence of parity and stage of lactation on the somatic cell count in bacteriologically negative dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.3219-3226. 1997.

MACHADO, P.F., PEREIRA, A.R., SILVA, L.F.P., Células somáticas no leite em rebanhos brasileiros. **Journal Scientia Agricola**, p. 57, v.2, p.359- 361. 2000.

MARTIN, S.W., MEEK, A.H., WILLEBERG, P., Measurement of disease frequency and production. In: Martin S. W., Meek A. H. & Willeberg P. (ed.) **Veterinary Epidemiology. Principles and Methods**. Iowa State University Press, Ames. , 1994. p. 48-76.

MARTINS, P.F., ANDRADE, H.V., Identificação de Resíduos de Antibióticos na Recepção de Leite Cru Pré-Beneficiado Como Implantação do Plano APPCC em Laticínios. **FAZU em Revista** v.8, p.108-114. 2011.

MEDEIROS, E.S., SANTOS, M.V., PINHEIRO JUNIRO, J.W., et al. Avaliação *in vitro* da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n.1, p.71-75, janeiro 2009.

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

MIRA, S.C., DELLA LIBERA, A.M.P., SOUZA, N.F., LIMA, S.M., BLAGITZ, G.M., Celularidade do leite no diagnóstico de infecções intramamárias em bovinos. **Revista Ciências Agrárias**, v.56, n.1, p.7-11. 2013.

MOEINI, M.M., SANJABI, M.R., AHADI A.,H. High bacteria count in milk and it's economic loss. In: **World Buiatrics Congress 22**. Hannover: Proceedings,. Anais...: 2002. p.9-10.

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

OMOE, K., ISHIKAWA, M., SHIMODA, Y., HU, D., UEDA, S., SHINAGAWA, K. Detection of seg, she, and sei genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *Staphylococcus aureus*

isolates harborin seg, seh, or sei genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.3, p.857-862. 2002.

PANKEY, J.W.W.R.J., EBERHART, A.L., CUMING, R.D., DAGGETT, R.J, FARNSWORTH & MCDUFF, C.K. Update on postmilking teat antiseptis. **Journal Dairy Science**, v. 67, p.1336. 1984.

PENNA, T.C.V., COLOMBO, A.J., ABE, L.E., MACHOSHVILI, SAM. Parâmetros de resistência térmica de cepas de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos no leite. **Revista Farmácia e Bioquímica**, v.24, p.113-117. 1998.

PERSSON,Y., NYMAN, A.K., GRÖNLUND-ANDERSSON, U. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *PLoS One* 7(10). 2012.

PIKALA, M., HAVERI, S., PYÖRÄLÄ, V., MYLLYS, T., HONKANEN-BUZALSKI.. Bovine mastitis in Finland 2001 prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. **Journal Veterinary Microbiology**. v.16, n.1-2, p.29-36. 2009.

PINHEIRO DE SÁ, M.E., MOTA, R.A., SOUZA, M.I., OLIVEIRA, A.A.F. Etiologia da mastite subclínica em bovinos leiteiros do agreste meridional do Estado de Pernambuco. **Revista Brasileira Ciências Veterinárias**, v.7, n.2, p.100-1003. 2000.

PHILPOT, W.N. Dairy herd management practices for improving milk quality and controlling mastitis In: **Dairy Research Report**. Lousiana State University, 1994. p.13-25.

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

PRADO, E., CRUZ, F.E.R., VIANA, F.C. Problemas sanitários do rebanho de leite: percepção dos criadores. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, v.49, n.1, p.19-29. 1997.

QUINN, P.J. **Disinfection and disease prevention in veterinary medicine**In: (Ed.), Disinfection, Sterilization, and Preservation. 4th ed. Lea and Febiger, Philadelphia. 1991. p.169-175.

RADOSTITIS, O.M., LESLIE, K.E, FETROW, J., Mastitis control in dairy herd Health: Food animal production medicine. Philadelphia: **WB Saunders Company**, p.229-276. 1994.

RAMALHO, C.A., SOARES, K.D.A., SILVA, D.F., BARROS, M.R.C., JUNIOR. J.W.P., OLIVEIRA, J.M.B., MOTA, R.A., MEDEIROS, E.S., Eficácia in vitro de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente a *Staphylococcus* spp. isolados em rebanhos leiteiros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n.12, p.1285- 1288. 2012.

RIBEIRO, M.E., PETRINI, L.A., AITA, M.F., BALBINOTTI, M., STUMPF, J.R.W., GOMES, J.F., SCHRAMM, R.C., MARTINS, P.R., BARBOSA, R.S., Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira Agrocência**, v.3, p.287-290. 2003.

RIBEIRO, M.E.R., STUMPF JR., W., GOMES, J.F., et al. Relação de CMT positivo e crescimento microbiológico no diagnóstico da mastite bovina na região sul do Rio Grande do Sul. In: Congresso Brasileiro de Zootecnia 21. Congresso Internacional de Zootecnia 3. Goiânia. SBZ. **Anais...** 2001a, p.98.

RIBEIRO, M.E.R., STUMPF JR., W., GOMES, J.F., et al. Ocorrência de *Streptococcus* sp. em Unidades de Produção Leiteiras monitoradas na região sul do Rio Grande do Sul. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária 28. Salvador. SBMV **Anais...** . 2001b. p.162.

RIBEIRO, M.E.R., STUMPF JR., W., GOMES, J.F., et al. Mastite causada por *Staphylococcus coagulase negativa* em um rebanho Jersey na região de clima temperado In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária 28. Salvador. SBMV **Anais...**: 2001c. p.162.

RUPP, R., BEAUDEAU, F., BOICHARD, D., Relationship between milk somatic-cell counts in the first lactation and clinical mastitis occurrence in the second lactation of French Holstein cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v.46, p.99-111. 2000.

SANTOS, M.V., FONSECA, L.F.L. **Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade do Leite**. Editora Manole, Barueri. 2006, 314p.

SEARS, P.M., GONZALÉZ, R.N., WILSON, D.J., HAN, H.R. Procedures for mastitis diagnosis and control. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.9, n.3, 1993. p.445-468.

SILVA, N., LOBATO, F.C.F., COSTA, G.M. et al. Mastitis aguda espontânea por *Klebsiella* em bovinos Holstein. In: Panamerican Congress on Mastitis Control and Milk Quality, Mérida, México. Proceedings...I, 1998. p.144-147.

SKRZYPEK, R., WÓJTOWSKI, J., FAHR, R.D. Factors affecting so-matic cell count in cow bulk tank milk – A case study from Poland. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v.51, n.1, p.127-131. 2004.

SOUZA, G.N., BRITO, J.R.F., MOREIRA, E.C., BRITO, M.A.V.P., SILVA, M.V.G.B. Fatores de risco para alta contagem de células somáticas do leite do tanque em rebanhos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais, Brasil. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**. V.57, n.2, p.251-260. 2005.

SOUZA, G.N., MOREIRA, E.C., BRITO, J.R.F., BRITO, M.A.V.P., SILVA, M.V.G.B. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de

acordo com patógenos da mastite. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 61, n.5, p.1015-1020. 2009.

SOUZA, Flávio. **Considerações práticas sobre a rotina de ordenha**. 2013. 27f. Relatório de estágio curricular (Curso Zootecnia) – Universidade Federal de Goiás – Jataí.

SCHEPERS, A.J., LAM, T.J.G.M., SCHUKKEN, Y.H., WILMINK, J.B.M., HANEKAMP, W.J.A. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.1833-1840. 1997.

SCHUCHU, L.F.D., WIEST, J.M., COIMBRA, H.S., PRESTES, L.T., LEMOS, J.S. Cinética da atividade antibacteriana in vitro de extratos naturais frente a microrganismos relacionados a mastite bovina. **Revista Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.1, p.161-169. 2008.

SILVA, R.O.P. Instrução Normativa n. 62: uma decisão consciente para o setor lácteo. **Análises e indicadores de Agronegócios**. V.7, n.2. 2012

TAPONEN, S., PYÖRÄLÄ, S. Coagulase Negative Staphylococci as cause of bovine mastitis- not so different from Staphylococcus aureus? **Acta Veterinária Scandinava**, v.8, p.53-36. 2011.

ZSCHÖCK, M., BOTZLER, D., BLÖCHER, S., SOMMERHÄUSEN, J., HAMANN, H.P. Detection of genes for enterotoxins (ent) and toxic shock syndrome toxin-1 (tst) in mammary isolates of Staphylococcus aureus by polymerase-chain-reaction. **International Dairy Journal**, v.10, p.569-574. 2000.

ANEXO 1

Susceptibilidade *in vitro* de antissépticos frente às bactérias multiresistentes isoladas de mastite bovina

Patrícia Jacob Santos¹; Helenice de Lima Gonzalez²; Silvia Hubner²; Patrícia da Silva Nascente ³

¹Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção – Universidade Federal de Pelotas (UFPel) pati-j@ibest.com.br;

²Faculdade de Veterinária – UFPel;

³Instituto de Biologia – Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção - UFPel. patsn@bol.com.br

Resumo

Este trabalho teve como objetivo verificar as Concentrações Inibitórias Mínimas e Bactericidas Mínimas de três antissépticos utilizados no pré e pós-dipping assim como avaliar a cinética da atividade antimicrobiana destes produtos frente a bactérias multiresistentes oriundas de mastite bovina. Para tal, produziram-se soluções antissépticas a partir da concentração de uso do iodo, clorexidine e hipoclorito de sódio. Os microrganismos utilizados foram *Staphylococcus aureus* (11), *Staphylococcus lentus* (1), *Staphylococcus sciuri* (1), *Kocuria kristinae* (2), *Kocuria varians* (1), *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* (1), *Enterococcus casseliflavus* (1), *Enterococcus faecalis* (1), *Staphylococcus* coagulase positivo (15), *Staphylococcus* spp. coagulase negativo (3), *Streptococcus* spp. (1). A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi verificada através da técnica de Microdiluição em Caldo (M7-A6) e o teste de cinética foi realizado a partir do Teste de Eficiência dos Desinfetantes. Foi realizado teste de citotoxicidade em frente a células MDBK (Madin-Darby bovine kidney). O trabalho foi realizado em duplicata. Verificou-se que, a CIM do iodo frente às 38 bactérias variou de 0,031 a 1,0%. A CIM do hipoclorito de sódio variou de 0,019 a 0,313% e do clorexidine variou de 0,0078 a 0,5%. Os antissépticos testados reduziram sua atividade antibacteriana quando na presença de matéria orgânica e melhoraram sua atividade antibacteriana

conforme se aumenta o tempo de exposição. Conclui-se que os desinfetantes testados foram efetivos frente aos isolados de mastite bovina, mostrando-se a clorexidine maior eficiência dos que os demais desinfetantes *in vitro*.

Palavras chaves: Iodo, Hipoclorito de sódio, Clorexidine, Microdiluição em Caldo, Teste de eficiência de desinfetantes, Teste de Cinética.

INTRODUÇÃO

A mastite é uma das principais enfermidades de vacas leiteiras, comprometendo a viabilidade de toda cadeia produtora de leite, afetando desde o produtor, passando pela indústria, até o consumidor final (Mira et al. 2013). Caracteriza-se por uma inflamação da glândula mamária relacionada a agressões físicas, químicas, térmicas ou microbianas, sendo que 90% das mastites são causadas por bactérias (Ferreira et al. 2010). A mastite pode ser classificada em clínica e subclínica (Mira et al. 2013). Enquanto a forma clínica pode ser visualmente perceptível, recursos indiretos de diagnóstico são necessários para identificar a forma subclínica (Ribeiro Júnior & Beloti. 2012). O prejuízo com a mastite no Brasil fica em torno de U\$\$ 184,00/vaca/ano, sendo 30% atribuídas à forma clínica da doença e 70% à mastite subclínica (Barbosa et al. 2009).

Para produção de leite com qualidade e quantidade é indispensável um úbere saudável e, para isto, deve-se adotar diversas medidas sanitárias, como exemplo pré e pós-dipping, durante o processo de ordenha para minimizar a transmissão de agentes causadores de mastites que podem ser transferidos ao leite depreciando sua qualidade microbiológica (Ramalho et al. 2012). Mergulhar os tetos, cobrindo-os por inteiro acima da base do úbere com soluções antissépticas adequadas é uma das práticas mais importantes e indispensáveis para redução da mastite contagiosa (Ramalho et al. 2012; Pedrini & Margatho. 2003). E o uso apropriado de agentes antissépticos tem como objetivo reduzir suficientemente a população de microrganismos patogênicos e evitar a potencial disseminação de agentes infecciosos (Ramalho et al. 2012). Entretanto os desinfetantes podem apresentar pouca eficácia quando em presença de matéria orgânica, sujidades ou urina, dificultando desta forma a atuação eficaz do produto (Coutinho et al. 2012)

Os princípios ativos mais utilizados para desinfecção dos tetos são iodo, clorexidina, cloro, ácido sulfônico, peróxido, ácido cloroso e lauridina (Medeiros et al. 2009). Considerando a importância da correta escolha do produto antisséptico para uso na antisepsia dos tetos, realizou-se o presente trabalho com objetivo de avaliar a Concentração Inibitória e Bactericida Mínima de três desinfetantes: hipoclorito de sódio, iodo e clorexidina; utilizados no pré e pós- dipping, frente a 38 bactérias isoladas de casos de mastite bovina multirresistente a antimicrobianos e verificar a citotoxicidade dos antissépticos.

Material e Métodos

Isolados bacterianos

Os 38 isolados bacterianos provenientes de mastite bovina eram provenientes do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Veterinária da UFPEL e foram selecionados por apresentarem resistência, no mínimo, a cinco antimicrobianos após prévia realização de antibiograma (Tabela 1).

A identificação dos isolados foi realizada através de provas bioquímicas, tintoriais e confirmada através de assimilação de carboidratos pelo Sistema Vitek2. Para realização deste trabalho, que se dividiu em três experimentos, cada amostra bacteriana foi reativada, na véspera do uso, em caldo cérebro-coração (BHI) por 16-20 horas a 37°C.

As espécies utilizadas neste estudo foram *Staphylococcus aureus* (11), *Staphylococcus lentus* (1), *Staphylococcus sciuri* (1), *Kocuria kristinae* (2), *Kocuria varians* (1), *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* (1), *Enterococcus casseliflavus* (1), *Enterococcus faecalis* (1), *Staphylococcus coagulase positivo* (15), *Staphylococcus* spp. *coagulase negativo* (3), *Streptococcus* spp. (1).

Microdiluição em Caldo (CLSI M7A6)

Os 38 isolados bacterianos foram testados frente a três desinfetantes: hipoclorito de sódio, iodo e clorexidina através do teste de Microdiluição em Caldo (MC) para avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de acordo com as normas CLSI

(*Clinical and Laboratory Institute*), documento M7-A6 (CLSI 2003) adaptado aos antissépticos. Os isolados foram reativados em BHI, semeados em BHA (Agar Cérebro- coração), e após 20hs foi preparado o inóculo, pela diluição em salina (NaCl- 0,8%) numa concentração entre 10^{7-8} UFC/ml. Cada desinfetante foi disposto em diluições 1:2 (100µl de meio cultura e 100µl de antisséptico) nos poços de uma mesma linha com dez concentrações na presença do inóculo. A leitura foi realizada após 18-20 horas de incubação a 35°C. Foi realizado controle positivo e negativo. Sendo o teste realizado em duplicata com três repetições.

As concentrações utilizadas para cada antisséptico foram de 0,0019 a 1% para o iodo e para a clorexidine e 0,0024 a 1,25% para o hipoclorito de sódio. Concentrações usuais no pré e pós dipping.

A partir do Calculo de CIM50 e CIM90 os isolados foram classificados como Sensíveis (S), Intermediários (I) e Resistentes (R) e analisados pelo teste de frequência com qui- quadrado.

Teste de Eficiência dos Desinfetantes

No segundo experimento os desinfetantes foram avaliados através do Teste de Cinética ou Eficiência dos Desinfetantes, sendo selecionados para este, cinco isolados bacterianos frente a três desinfetantes: iodo, clorexidine e hipoclorito de sódio. As cinco espécies bacterianas estudadas foram *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Kocuria kristinae*, *Staphylococcus sp.* coagulase positivo (2). Estes antissépticos foram escolhidos por serem utilizados: hipoclorito de sódio no pré-dipping, iodo no pós-dipping e clorexidine no pré e pós- dipping.

Os isolados foram reativados da mesma forma e diluídos em salina (NaCl- 0,8%) até 10^8 UFC/ml. Após retirava-se uma alíquota de 100µl e diluía num segundo tubo contendo 0,9ml de caldo Muller Hilton (MHc), agitava-se e retirava-se deste mais uma alíquota de 100µl e colocava-se no tubo final da preparação inóculo contendo 0,9ml meio Muller Hinton (MH). O desinfetante foi preparado em 2 tubos de ensaio, contendo 2ml desinfetante teste, para cada bactéria, em um foi adicionado 1ml de leite e no outro 1ml salina. Os tubos eram após inoculados com 50µl do inóculo, agitados vigorosamente e 100µl eram retiradas em intervalo de 30 e 60 segundos, 5 e 15 minutos e adicionadas

em tubos com 1,5ml de neutralizantes químicos de desinfetantes. Uma alíquota de 50µl desses tubos era semeada em superfície de três placas de Petri contendo Agar BHI. As placas eram incubadas por 24 horas a 37°C, e as colônias contadas. Realizou-se controle negativo com meio de cultura e desinfetantes, e também controle crescimento bacteriano de todas as soluções testes. A análise estatística empregada foi do tipo descritivo calculando-se as frequências absoluta e relativa, em relação a quantidade de UFC do controle e UFC dos isolados testados após o experimento.

Avaliação da Citotoxicidade

O terceiro experimento foi realizado para verificação de toxicidade celular de dois antissépticos (hipoclorito de sódio e clorexidine) em Células MDBK (Madin-Darby bovine kidney) que foram preparadas em microplacas de 96 poços e permaneceram em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂. Após confluência, 100 µl de diluições seriadas dos antissépticos foram adicionadas em cada placa. Após permanência com os antissépticos durante 72 horas foi retirado o sobrenadante dos poços e adicionado meio contendo 3.3 mg l⁻¹ de vermelho neutro. Após 2 horas a 37°C/5% de CO₂, o meio foi removido. O corante incorporado foi solubilizado pela adição de 100 µL de uma solução contendo etanol 50%, ácido acético 1% e água destilada q.s.p. A placa foi agitada por 10 minutos, e foi realizada a leitura das densidades ópticas em um espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. A percentagem de viabilidade foi calculada mediante a fórmula $AT/AC \times 100$, sendo AT e AC a absorbância dos tratados e a absorbância dos controles, respectivamente.

Resultados

Microdiluição em Caldo (CLSI M7A6)

Os resultados da determinação da CIM de cada um dos antissépticos frente às 38 bactérias são apresentados na Tabela 2. As Concentrações Bactericidas Mínima foram às mesmas observadas na CIM. A partir do cálculo de CIM 50 e CIM 90, se pode realizar o perfil de suscetibilidade de cada isolado frente a cada antisséptico. Para o hipoclorito se observou CIM50 de 0,078µL/mL e CIM90 de 0,313 µl/ml, para o Iodo, a CIM50 foi de 0,125 µl/ml e CIM90 de 0,5µl/ml e para a clorexidine a CIM50 foi de 0,0625 µl/ml e CIM90 de

0,125µl/ml. A descrição da sensibilidade, resistência ou sensibilidade intermediária de cada isolado frente a cada antisséptico também estão descritos na Tabela 2.

A partir da classificação em sensível e resistente, a clorexidine foi o antisséptico que apresentou maior numero de isolados sensíveis a ela (71,05%), seguidos pelo hipoclorito de sódio (57,89%) e pelo iodo (52,63%). A sensibilidade intermediaria esteve presente nos três antissépticos sem diferença significativa: clorexidine 21,05% dos isolados, hipoclorito de sódio em 28,94% e iodo 26,31%. O antisséptico que mais apresentou isolados resistentes foi o iodo com 21,02% das amostras, seguido pelo hipoclorito com 13,15% e clorexidine com 7,89% de resistência.

Teste de Eficiência dos Desinfetantes

A contagem de todas as UFC das placas foi realizada e posteriormente calculada as médias de cada repetição e do controle para a avaliação dos resultados. No estudo realizado com o iodo na concentração 2%, as cinco bactérias testadas reduziram em 100% a partir de 60 segundos de exposição ao antisséptico em solução salina. Duas delas *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* não reduziram totalmente após 30 segundos de contato. As mesmas bactérias em relação ao iodo na presença da matéria orgânica (leite) reduziram-se a partir de 50% após exposição em 5 minutos. Apenas duas amostras, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus sp* coagulase positivo, reduziram 100% após 15 minutos de exposição.

Quanto ao hipoclorito de sódio na concentração 0,625%, as cinco bactérias foram inibidas na exposição por 5 minutos em solução salina e só uma, *Staphylococcus aureus*, foi inibida no contato por 30 e 60 segundos com o produto em solução salina. Quanto à exposição ao hipoclorito em presença de matéria orgânica, apenas uma, *Staphylococcus sp* coagulase positivo, apresentou redução em 15 minutos de exposição. As demais se reduziram entre 44 e 95,76% no tempo de 15 minutos.

Em relação a clorexidine 2%, todos os isolados foram reduzidos em salina 30", exceto um isolado de *Staphylococcus* coagulase positivo que obteve uma redução de 99,4% no tempo de 30". Em presença de matéria orgânica (leite), todos isolados reduziram 100% no tempo de 30", exceto um

isolado de *Kokuria kristinae* e *Staphylococcus* coagulase positivo que se reduziram no tempo de 5 minutos.

O isolado *Staphylococcus aureus* foi o único isolado que obteve redução de 100% nas duas condições apresentadas nesse estudo (salina e leite), frente ao antisséptico clorexidine 2%.

Avaliação da Citotoxicidade

O hipoclorito de sódio manteve a viabilidade celular em 100% nas concentrações de uso: 1,25; 0,625; 0,3125; 0,156; 0,078; 0,039; 0,019; 0,009; 0,0048; 0,0024. Entretanto Clorexidine a partir das concentrações estudadas (1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,625; 0,031; 0,0156; 0,0078; 0,0039; 0,0019) diluída em 10.000 vezes manteve viabilidade celular em 80%. Apenas a diluição de 15.000 vezes da Clorexidine manteve viabilidade celular de 100%.

Discussão

De acordo com Fonseca e Santos (2000), os melhores resultados no pós-dipping têm sido obtidos com as seguintes concentrações de compostos: iodo 0,7-1,0%, clorexidina 0,5-1,0% e cloro 0,3-0,5% (4% hipoclorito de sódio). No pré-dipping, os produtos tradicionalmente utilizados são: hipoclorito de sódio a 2%, iodo a 0,3% e clorexidina a 0,3%. Em ambos os casos deve-se fazer a imersão completa dos tetos em solução desinfetante (Santos; Fonseca, 2006).

A partir destas concentrações usuais citadas anteriormente, como melhor a serem utilizadas *in vivo*, comparando os resultados das CIM obtidas neste estudo com outros autores (Medeiros et al., 2009; Ramalho et al., 2012), que testaram os mesmos antissépticos frente a bactérias isoladas de mastite bovina, não houve diferença devido aos isolados aqui testados serem previamente resistente a diferentes antibióticos.

Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com estudos relatados anteriormente, (Medeiros et al., 2009; Ramalho et al., 2012; Coutinho et al., 2012), que obtiveram melhor atividade desinfetante para a clorexidina 2%. Segundo Medeiros et al.,(2009), quanto maior o tempo de exposição, melhor a ação da clorexidina. Segundo Ramalho et al (2012), o clorexidine também apresentou ação desinfetante para *Staphylococcus aureus* e

Staphylococcus sp. coagulase negativa, porém se mostrou resistente aos *Staphylococcus* sp. coagulase positivo. Nesse estudo os isolados de *Staphylococcus* coagulase positivo, demonstraram-se sensíveis a clorexidine a 2%, reduzindo a 100% UFC no tempo de 60" apenas um isolado, *Staphylococcus* coagulase positivo, reduziu-se no tempo de 60".

O clorexidine é bastante utilizado para o tratamento de infecções superficiais de tetos em vacas devido seu efeito cumulativo e contínuo, permanecendo na pele no mínimo por seis horas, além disso, atua na presença de matéria orgânica, é de fácil aplicação e econômico, quando em comparação com iodo causa menor reação tecidual nas diluições recomendadas (Ramalho et al (2012), Medeiros et al 2009).

Coutinho et al (2012), relatou eficácia de 100% da clorexidine em seu experimento. De acordo com esse resultado, e características antimicrobianas da clorexidine, Coutinho et al (2012), sugere que este desinfetante deve ser utilizado como uma das primeiras opções no pré e pós-dipping.

Schuch et al (2008), descreve que nas condições de seu trabalho, a clorexidine demonstrou boa atividade na presença de baixas concentrações de matéria orgânica (20%), Sendo o leite integral principal matéria orgânica capaz de contaminar a solução desinfetante na situação-problema mastite bovina, parece importante que desinfetantes indicados para esses casos sejam avaliados na presença deste.

O uso do cloro como agente desinfetante é prática comum nas propriedades leiteiras do Brasil, uma vez que o produto apresenta baixo custo. Entretanto, tem como desvantagem sua menor estabilidade, além da não observação das recomendações e critérios de uso pelos produtores (Amaral et al., 2004).

Segundo Coutinho et al.,(2012), o cloro é um composto pouco tóxico, mas que apresenta ação irritante aos tecidos e tem sua ação reduzida pela presença de matéria orgânica. Produtos a base de cloro se tornavam instáveis na presença de proteínas com rápida inativação. Relatando ainda que a albumina, globulina e caseína são os componentes do leite que mais rapidamente inativam o cloro. Complementando ainda que cloro apresenta um elevado grau de afinidade por material orgânico como fezes, sangue e pus que

podem neutralizar a sua ação microbicida na prática rotineira do pré e pós-dipping.

Os resultados desse estudo revelaram que cloro em presença de matéria orgânica, leite, possivelmente tornou-se instável, e teve sua ação desinfetante reduzida. Das cinco bactérias testadas, quatro delas foram inativadas pelo cloro no tempo de 60", e uma no tempo de 5', quando comparadas na presença da matéria orgânica, o cloro não demonstrou eficiência. Apenas um isolado bacteriano foi inativado no tempo de 5', nos demais isolados o tempo de 15' não foi suficiente para inibir o crescimento.

De acordo com Medeiros et al (2009), a concentração e o tempo de contato são fatores que podem interferir na ação do desinfetante, e este binômio é fundamental para o sucesso do efeito desinfetante de compostos a base de cloro.

De acordo com resultados obtidos nesse estudo, o iodo mostrou-se mais eficiente em isolados de *Staphylococcus sp* coagulase positivo, inibindo o crescimento bacteriano no tempo de 30". Resultados semelhantes foram obtidos por Medeiros et al., (2009), no qual obtiveram maior atividade em testes *in vitro*, do iodo frente a *Staphylococcus sp.* coagulase positivo.

Especificamente o iodo é reconhecido por apresentar um efeito antisséptico, amplo espectro de ação sobre bactérias, fungos e vírus. No entanto, para serem eficazes, as concentrações devem ser ajustadas para os diferentes microrganismos (Coutinho et al., 2012). De acordo com resultado do estudo de Pedrini e Margatho (2003), o iodo apresentou uma maior atividade *in vitro* tanto a 2% quanto a 1% frente a microrganismos patogênicos isolados de casos clínicos de mastite bovina clínica. Porém a que solução 2% não diferiu da solução 1% estatisticamente, e que utilizadas em banhos dos tetos em baixas concentrações (0,5% ou menos), para evitar contaminação de iodo no leite.

. Para ser utilizada na desinfecção de tetos na rotina de ordenha de bovinos, o antisséptico deve ser eficaz sobre os agentes envolvidos na mastite, com o tempo de ação compatível ao manejo a que os animais são submetidos e com pouca suscetibilidade aos fatores intervenientes, como presença de matéria orgânica, pH e suporte (Schuch et al., 2008). Os desinfetantes podem apresentar pouca eficiência quando na presença de matéria orgânica,

sujidades ou urina, dificultando desta forma a atuação eficaz do produto (Pankey et al. 1984, Quinn 1991). Esta característica foi observada no presente estudo, onde houve diferença significativa entre o antisséptico em contato com as bactérias em presença de matéria orgânica. Concordando com Costa et al. (1998) que destacaram a importância do uso adequado dos desinfetantes no controle das mastites uma vez que a presença de matéria orgânica determinou acentuada redução na eficiência dos mesmos.

Medeiros et al. (2009) observaram que quanto maior o tempo de exposição dos isolados frente ao iodo e ao hipoclorito também aumentou a porcentagem de redução das bactérias.

Em geral, a concentração eficaz dos desinfetantes tradicionais é muito próxima a sua dose lesiva das estruturas de superfície do teto (Pedrini e Margatho, 2003).

Conclusões

As CIM observadas frente a 38 bactérias oriundas de mastite bovina previamente resistente a diferentes antibióticos foram efetivas quando relacionadas com as concentrações utilizadas no pré e pós-dipping dos antissépticos estudados.

Quando utilizados em presença de matéria orgânica, o iodo e o hipoclorito de sódio não reduziram significativamente o número de bactérias quando em contato por até 15 minutos. Já o clorexidine apresentou uma redução significativa, no tempo de 15 minutos todos isolada reduziram-se em 100%.

Entretanto às variações no perfil de sensibilidade e resistência encontradas, sugerem a necessidade de avaliar regularmente a eficiência dos desinfetantes usados nas propriedades, com o intuito de garantir controle da mastite no rebanho.

Referências bibliográficas

Amaral, L.A., Isa H., Dias, L.T., Junior, O.D.R. & Filho A.N. 2004. **Avaliação da eficiência da desinfecção de teteriras e tetos no processo de ordenha mecânica de vacas.** Pesq. Vet. Bras. 24(4):173-177.

CLSI (2003) **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico.** Clinical and Laboratorial Standards Institute, CLSI norma M7-A6, vol. 23 no. 2, 6a. ed.

Coutinho, L.C.A., Medeiros, E.S., Silveira, N.S.S., Silva, L.B.G. & Mota, R.A. 2012. **Eficácia *in vitro* de desinfetantes utilizados na antissepsia dos tetos frente a leveduras isoladas do leite de vaca com mastite.** Pesquisa Veterinária Brasileira 32(1):61-65.

Barbosa, C.P., Benedetti E. & Guimarães, E.C. 2009. **Incidência de mastite em vacas submetidas a diferentes tipos de ordenha em fazendas leiteiras na região do Triângulo Mineiro.** Biosci. J. 25(6):121-128.

Ferreira, J.L.; Pigatto, C.P.; Lins, J.L.F.H.A.; Aguiar Filho J.L.C.; Cavalcante, T.V. 2010. **Bactérias causadoras de mastite subclínica em rebanhos leiteiros no município de Teresina, Piauí.** Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, v.8, n.14,

Mira, C.S., Della Libera, A.M.M.P., Souza, N.F., Lima, S.M., Blagitiz, M.G., 2013.

Celularidade do Leite no Diagnóstico de Infecções Intramamárias em Bovinos.

Rev. Cienc. Agrar., v. 56, n. 1, p. 7-11.

Medeiros, E.S., Santos, M.V., Pinheiro, Jr J.W., Faria, E.B., Wanderley, G.G., Teles, J.A.A. & Mota, R.A. 2009. **Avaliação *in vitro* da Eficácia de Desinfetantes Comerciais Utilizados no Pré e Pós-dipping Frente Amostras de *Staphylococcus* spp. Isoladas de Mastite Bovina.** Pesquisa Veterinária Brasileira 29(1):71-75.

Martins, P.F. & Andrade, H.V. 2011. **Identificação de Resíduos de Antibióticos na Recepção de Leite Cru Pré-Beneficiado como Perigo Potencial para Implantação do Plano APPCC em Laticínios.** FAZU em Revista, Uberaba, n.8, p. 108-114.

Disponível em: < <http://www.revista.inf.br/veterinaria14/artigos/RCEMV-AnoVIII-Edic14-Art08.pdf>>

Pedrini, S.C.B. & Margatho, L.F.F. 2003. **Sensibilidade de Microrganismos Patogênicos isolados de Casos de Mastite Clínica em Bovinos Frente a Diferentes Tipos de Desinfetantes.** Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.70, n.4, p. 391-395, out./ dez.,

Ramalho, A.C., Soares, K.D.A., Silva, D.F., Barros, M.R.C., Junior, J.W.P., Mota, R.A., Medeiros, E.S. 2012. **Eficácia *in vitro* de desinfetantes comerciais utilizados no pré e Pós-dipping frente à *Staphylococcus* spp. isolados em rebanhos leiteiros.** Pesq. Vet. Bras.32(12);1285-1288.

Ribeiro, Júnior J.C & Beloti, V., 2012. **Matite Bovina e seu reflexo na Qualidade do Leite- Revisão de Literatura.** Revista Eletrônica de Educação e Ciências., 2(2):01-12.

Tabela 1 – Isolados bacterianos oriundos de casos de mastite bovina subclínica e respectiva suscetibilidade frente a antibióticos

Agente	R	AMP	AMO	BAC	CFE	CTF	ENO	GEN	NEO	NOR	PEN	TET	TRI
<i>Staphylococcus coag. Negativa</i>	8	R	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	R	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	R	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R
<i>Staphylococcus coag. Positiva</i>	7	R	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R
<i>Staphylococcus coag. Negativa</i>	9	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R
<i>Staphylococcus sciuri</i>	7	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R
<i>Staphylococcus coag. Positiva</i>	7	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Staphylococcus coag. Positiva</i>	5	R	S	S	R	S	S	R	S	R	S	R	R
<i>Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris</i>	9	R	R	R	R	R	R	R	R	R			S
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	11	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Staphylococcus coag. Positiva</i>	8	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
<i>Staphylococcus coag. Positiva</i>	8	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R
<i>Kocuria kristinae</i>	7	R	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
<i>Staphylococcus coag. Positiva</i>	7	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R
<i>Staphylococcus coag. Positiva</i>	7	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
<i>Staphylococcus coag. Positiva</i>	7	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R
<i>Staphylococcus coag. Positiva</i>	9	S	S	R	R	R	SC	R	R	R	R	R	R
<i>Staphylococcus lentus</i>	12	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	11	R	R	R	R	R	SC	R	R	R	R	R	R
<i>Streptococcus spp</i>	11	R	R	R	R	R	SC	R	R	R	R	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	11	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R
<i>Staphylococcus coag. Positiva</i>	9	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Staphylococcus coag. Positiva</i>	9	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Staphylococcus coag. Positiva</i>	8	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
<i>Staphylococcus coag. Positiva</i>	11	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Kocuria kristinae</i>	10	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R
<i>Staphylococcus coag. Positiva</i>	8	S	S	R	R	R	SC	R	R	S	R	R	R
<i>Staphylococcus coag. Negativa</i>	9	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S
<i>Staphylococcus coag. Positiva</i>	8	S	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R
<i>Staphylococcus coag. Positiva</i>	11	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	R	R	S	R	R	S	R	R	S	R	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R
<i>Staphylococcus coag. Positiva</i>	7		S	S	R		R	R	R	R	S	R	R
<i>Kocuria varians</i>	12	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Tabela 2 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e perfil de suscetibilidade três antissépticos utilizados no pré e pós-dipping frente a 38 isolados bacterianos oriundos de mastite bovina subclínica.

Isolado bacteriano		Cloro		Iodo		Clorexidine	
		CIM	PS	CIM	PS	CIM	PS
1.	<i>Staphylococcus</i> sp. CN	0,078	S	0,625	S	0,625	S
2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,156	S	0,125	S	0,125	I
3.	<i>S. aureus</i>	0,156	I	0,031	S	0,625	S
4.	<i>S. aureus</i>	0,156	I	0,031	S	0,031	S
5.	<i>Staphylococcus</i> sp. CP	0,078	S	0,031	S	0,125	I
6.	<i>Staphylococcus</i> sp. CN	0,019	S	0,125	S	0,625	S
7.	<i>S. sciuri</i>	0,313	R	0,625	S	0,625	S
8.	<i>Staphylococcus</i> sp. CP	0,078	S	0,625	S	0,125	I
9.	<i>Staphylococcus</i> sp. CP	0,078	S	0,5	R	0,125	I
10.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>spp cremoris</i>	0,156	I	1,0	R	0,125	I
11.	<i>S. aureus</i>	0,156	I	R	R	0,5	R
12.	<i>S. aureus</i>	0,078	S	0,25	I	0,031	S
13.	<i>Staphylococcus</i> sp. CP	0,078	S	0,125	S	0,031	S
14.	<i>Staphylococcus</i> sp. CP	0,078	S	0,125	S	0,031	S
15.	<i>Kocuria kristinae</i>	0,039	S	0,25	I	0,031	S
16.	<i>S. aureus</i>	0,039	S	0,125	S	0,625	S
17.	<i>S. aureus</i>	0,078	S	0,625	S	0,625	S
18.	<i>Enterococcus faecalis</i>	0,078	S	0,5	R	0,125	I
19.	<i>S. aureus</i>	0,078	S	0,25	I	0,625	S
21.	<i>Staphylococcus</i> sp. CP	0,078	S	0,25	I	0,625	S
23.	<i>Staphylococcus</i> sp. CP	0,156	I	0,5	R	0,125	I
24.	<i>Staphylococcus</i> sp. CP	0,078	S	0,125	S	0,031	S
25.	<i>S. lentus</i>	0,156	I	0,25	I	0,625	S
26.	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	0,156	I	0,125	S	0,125	I
27.	<i>Streptococcus</i> spp.	0,078	R	0,125	S	0,031	S
28.	<i>S. aureus</i>	0,019	S	0,25	I	0,031	S
29.	<i>Staphylococcus</i> sp. CP	0,078	S	0,125	S	0,031	S

30.	<i>Staphylococcus</i> sp. CP	0,078	S	0,125	S	0,031	S
31.	<i>Staphylococcus</i> sp. CP	0,156	I	0,625	S	0,0078	S
32.	<i>Kocuria kristinae</i>	0,313	R	0,125	S	0,031	S
33.	<i>Staphylococcus</i> sp. CP	0,078	S	0,25	I	0,031	S
34.	<i>Staphylococcus</i> sp. CN	0,313	R	0,25	I	0,625	S
35.	<i>Staphylococcus</i> sp. CP	0,156	I	1,00	R	0,25	R
36.	<i>Staphylococcus</i> sp. CP	0,313	R	0,5	R	0,031	S
37.	<i>S. aureus</i>	0,156	I	0,5	R	0,5	R
38.	<i>S. aureus</i>	0,078	S	0,25	I	0,625	S
39.	<i>Staphylococcus</i> sp. CP	0,078	S	0,625	S	0,031	S
40.	<i>Kocuria varians</i>	0,156	I	0,25	I	0,031	S

PS – Perfil de suscetibilidade; CP – Coagulase positiva; CN – Coagulase Negativa

Tabela 3- Teste de eficiência de antissépticos, valores em % da redução das UFC.

Iodo	SCP		S.aureus		E. faecalis		SCP		K.kristinae	
	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S
30''	89	100	92	99	72	98	92	100	86	99
60''	97	100	93	100	72	99	94	100	90	99
5'	98	100	99	100	95	100	98	100	93	100
15'	100	100	100	100	98	100	99	100	97	100

SCP= Staphylococcus coagulase positivo; L= leite; S= salina; valores expressos em %.

Hipoclorito de sódio	SCP		S.aureus		E. faecalis		SCP		K.kristinae	
	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S
30''	98	95	38	100	56	97	81	99	81	99
60''	99	99	46	100	58	99	75	99	87	98
5'	95	100	47	100	54	100	73	100	93	100
15'	100	100	34	100	55	100	66	100	96	100

SCP= Staphylococcus coagulase positivo; L= leite; S= salina valores expressos em %.

Clorexidine	SCP		S.aureus		E. faecalis		SCP		K.kristinae	
	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S
30''	96	100	72	100	100	100	82	99	79	100
60''	100	100	100	100	100	100	93	100	92	100
5'	100	100	100	100	100	100	100	100	98	100
15'	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

SCP= Staphylococcus coagulase positivo; L= leite; S= salina;; valores expressos em %.

HOME

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

The manuscript should be prepared using standard word processing software and should be printed (font size 12) double-spaced throughout the text, figure captions, and references, with margins of at least 3 cm. The figures should come in the extension tiff, with a minimum resolution of 300 dpi. Tables and legends to figures must be submitted all together in a single file. Figures, must be uploaded separately as supplementary file.

The manuscript should be arranged in the following order:

Running title: with up to 40 characters (letters and spaces)

Title: with up to 250 characters

Author's names: without titles or graduations

Institutional affiliations: full address of the corresponding author only

Summary: up to 200 words (100 words in case of short communications). It should emphasize new and important aspects of the study or observations.

Key words: 3-6 items must be provided. Terms from the Medical Subject Headings (Mesh) list of Index Medicus should be used.

Sponsorships: indicating the sources of financial support and change of address.

Introduction: should set the purpose of the study, give a brief summary (not a review) of previous relevant works, and state what new advance has been made in the investigation. It should not include data or conclusions from the work being reported.

Materials and Methods: should briefly give clear and sufficient information to permit the study to be repeated by others. Standard techniques need only be referenced.

Ethics: when reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's or a national

research council's guide for, or any national law on the care and use of laboratory animals was followed.

Results: should be a concise account of the new information discovered, with the least personal judgement. Do not repeat in text all the data in the tables and illustrations.

In case of describing New Species, should follow:

Name of the new species, authors (when it is the case), sp. nov., (Figs x-y)
[Ex: *An. (Nyssorhynchus) atacamensis* González and Sallum, sp. nov. (Figs 1-4)]

Previous reference to the new species (when it is the case)
[Ex: *An. pictipennis* of Rueda et al. (2008): 448.]

Diagnosis (or *Description*; all stages are described);

Type host (when it is the case);

Site of Infection (when it is the case);

Type-locality;

Type data and depository;

Other material examined (when it is the case);

Distribution;

Host-parasite data (such prevalence and other important data, when it is the same case);

Bionomics;

Etymology;

Taxonomic discussion (or simply DISCUSSION as internal title).

Discussion: should be limited to the significance of the new information and relate the new findings to existing knowledge. Only unavoidable citations should be included.

Acknowledgements: should be short and concise, and restricted to those absolutely necessary.

REFERENCES

Must be accurate. Only citations that appear in the text should be referenced. Unpublished papers, unless accepted for publication, should not be cited. Work accepted for publication should be referred to as "in press" and a letter of acceptance of the journal must be provided. Unpublished data should only be cited in the text as "unpublished observations", and a letter of permission from the author must be provided. The references at the end of the paper should be arranged in alphabetic order according to the surname of the first author. [CLICK HERE \[+\]](#)

FIGURES AND TABLES MUST BE UNDERSTANDABLE WITHOUT REFERENCE TO THE TEXT

Figures: presented in tiff format with a minimum of 300 dpi and photographs must be sharply focused, well contrasted, and if mounted onto a plate, the figures should be numbered consecutively with Arabic numbers. Magnification must be indicated by a line or bar in the figure, and referenced, if necessary in the caption (e.g., bar = 1 mm). Plates and line figures should either fit one column (8 cm) or the full width (16.5 cm) of the page and should be shorter than the page length to allow inclusion of the legend. Letters and numbers on figures should be of a legible size upon reduction or printing. A colour photograph illustrates the cover of each issue of the Journal and authors are invited to submit illustrations with legends from their manuscript for consideration for the cover.

Tables: should supplement, not duplicate, the text and should be numbered with Roman numerals. A short descriptive title should appear above each table, with any explanations or footnotes (identified with a, b, c, etc.) below.

Technical Notes: Technical Notes should communicate rapidly single novel techniques or original technical advances. The entire note should occupy no more than three printed pages including figures and/or tables (it means around 10 double-spaced typed Word file maximum). The text must not be divided into sections. Therefore, the state of art must be very briefly presented; results must be rapidly presented and discussed at a time. Complementary tables and figures may be published as supplementary data. References must be limited to few essential ones and cited at the end of the note, using the same format as in full papers. A brief summary and three key words must be provided.

Short communications: should communicate rapidly single results or techniques. They should occupy no more than three printed pages including figures and/or tables. They should not contain excessive references. References should be cited at the end of the paper using the same format as in full papers. A brief summary and three key words must be provided.

Alternative format: manuscripts may be submitted following the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produced by the International Committee of Medical Journal Editors also known as the Vancouver Style. In this case, authors should follow the guidelines in the fifth edition (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47, or at the website <http://www.acponline.org/journals/resource/unifreqr/htm>) and will be responsible for modifying the manuscript where it differs from the instructions given here, if the manuscript is accepted for

publication.

Authors should also follow the Uniform Requirements for any guidelines that are omitted in these Instructions.

In case of clinical trials it's mandatory to inform the registration number of the REBEC platform.

A statement that the data/results of the manuscript are not plagiarism and have not been published elsewhere.

ONCE A PAPER IS ACCEPTED FOR PUBLICATION, THE AUTHORS MUST PROVIDE:

an affidavit, provided by the Editorial Office, signed by all authors. Authors from different countries or institutions may sign in different sheets containing the same basic statement;

a **copyright** assignment form, provided by the Editorial Office, signed by the corresponding author.

Page charges: there will be no page charges.

Proofs: one set of page proofs will be supplied for the author to check for typesetting accuracy, to be returned by the stipulated date. No changes to the original manuscript will be allowed at this stage.