



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**PESQUISA DE MASTITE CLÍNICA E SUBCLÍNICA, CONTAGEM DE  
CÉLULAS SOMÁTICAS, SUSCEPTIBILIDADE A  
ANTIMICROBIANOS E RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM  
AMOSTRAS DE LEITE DE BÚFALAS (*Bubalus bubalis*) DA  
BAIXADA MARANHENSE**

NARA ANDRÉA FRANCO SANTOS

São Luis – MA, Brasil

2013

NARA ANDRÉA FRANCO SANTOS

**PESQUISA DE MASTITE CLÍNICA E SUBCLÍNICA, CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS, SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS EM AMOSTRAS DE LEITE DE BÚFALAS (*Bubalus bubalis*) DA BAIXADA MARANHENSE**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção do título de Mestre em Ciência  
Animal

**Área:** Sanidade Animal

**Orientadora:** Prof. PhD. Francisca Neide costa

São Luis – MA, Brasil

2013

Santos, Nara Andréa Franco.

Pesquisa de mastite clínica e subclínica, contagem de células, susceptibilidade a antimicrobianos e resíduos de antibiótico em amostras de leite de búfalas da Baixada maranhense / Nara Andréa Franco Santos– São Luís, 2013.

...106 f.

Monografia (Mestrado) – Curso de Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2013.

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em: \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2013 pela  
banca examinadora composta pelos seguintes membros:

---

**Prof.<sup>a</sup> Dsc. Lúcia Maria Coelho Alves**  
**1º membro**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dsc. Lenka de Moraes Lacerda**  
**2º membro**

---

**Profa. PhD. Francisca Neide Costa**  
**Orientadora**

*“Não me pergunte do que sou capaz. Apenas dê-me a lição”*

À minha família, com amor dedico.

## AGRADECIMENTOS

Esse é o momento de expressar meus sinceros agradecimentos a muitos amigos e familiares. Esta não foi uma caminhada breve, mas uma travessia que parecia sem fim, principalmente pelas dificuldades pessoais de toda ordem que ocorreram neste período. E, ao invés de me deterem, me impulsionaram com mais força.

Agradeço inicialmente a Deus pela presença constante em minha vida e dando coragem e fé para não desistir.

Agradeço aos meus pais Nonato e Janilde e meu querido irmão Danillo, pelos esforços para minha formação e por me estimularem nas horas mais difíceis.

Agradeço à Universidade Estadual do Maranhão pela oportunidade de estudo e pesquisa.

Agradeço à minha orientadora, Professora Francisca Neide Costa, por ter dado a oportunidade deste trabalho. Por várias vezes confiou na minha capacidade de realizá-lo, ainda que aliada a outras tarefas e me incentivou nos estudos desde a época de graduação. Seus ensinamentos e experiência profissional serão valiosos na minha caminhada. Muito obrigada!

Agradeço às professoras Lenka de Moraes Lacerda e Lúcia Maria Coelho Alves pelo apoio desde o início desta pesquisa, pelos materiais de estudo fornecidos e o carinho em mim depositado! Agradeço também por terem aceitado participar da minha banca, pois seus ensinamentos serão de supra importância no meu futuro profissional.

Agradeço aos meus familiares, em especial meu avô Laurino Franco e madrinha querida Fátima Santos por todo o amor demonstrado ao longo destes anos.

Agradeço aos meus queridos e fiéis amigos de longas datas, Ana, Lianne, Nilson, Rafaele, Játyna, Fabiane e Viviane e peço desculpas pelos momentos ausentes muitas vezes ocasionados pela realização deste trabalho.

Agradeço aos meus queridos amigos eternizados em meu coração, Míryan Fabianne e meu companheiro de pesquisa Fernando Douglas pelo enorme carinho e confiança! Guardarei para sempre a amizade conquistada.

Agradeço a todos os colegas de mestrado, em especial Monique Maia pela ajuda e companheirismo.

Agradeço a todos do laboratório de Microbiologia da UEMA (segunda casa), em especial a Dona Ruthe, “mãe do Laboratório” e Gabriel Leôncio pela ajuda fornecida e muitos momentos de alegria.

Agradeço à Secretária de Mestrado Francisca pela oportunidade de orientação no seu curso de graduação e por sempre lembrar de mim!

Agradeço ao seu Ricardo, motorista da UEMA que também fez parte desta pesquisa, e a mim forneceu ajuda em todas as viagens.

Agradeço à essa pessoa tão doce e prestativa, Dona Socorro, obrigada pelo carinho!

Agradeço à Ilderlane Lopes pelos ensinamentos no Laboratório e pela amizade sincera.

Agradeço a todos do grupo de pesquisa, em especial Eline, e peço desculpas pela ausência devido ao trabalho.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma com a minha pesquisa e deixo aqui meus eternos agradecimentos. Muito obrigada!

SANTOS, N. A. F; COSTA, F. N. **Pesquisa de mastite clínica e subclínica, contagem de células somáticas, susceptibilidade a antimicrobianos e resíduos de antibióticos em amostras de leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) da Baixada maranhense** [Research of clinical and subclinical mastitis, somatic cell count, antimicrobial susceptibility and antibiotic residues in milk samples from buffalo (*Bubalus bubalis*) of Maranhão Lowlands]. 2013.106f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luis, 2013.

## RESUMO

Objetivou-se neste trabalho pesquisar mastite clínica e subclínica, a contagem de células somáticas, susceptibilidade a antimicrobianos e resíduos de antibióticos em amostras de leite bubalino. Foram avaliadas 304 búfalas de 10 propriedades situadas nos municípios de Viana, Arari, Cajari, Matinha e Vitória do Mearim, da Baixada Maranhense, utilizando-se os testes da caneca telada e *California Mastitis Test* (CMT). Dos 1.204 quartos mamários avaliados, apenas 1 (0,09%) apresentou mastite clínica e 31 (2,57%) apresentou mastite subclínica. Foram colhidas 31 amostras positivas para mastite clínica e subclínica e realizadas análises microbiológicas para o isolamento e identificação dos micro-organismos. A pesquisa de resíduo de antibióticos foi realizada utilizando-se os kits comerciais Deltotest SP- NT, Eclipse – 50 e Twinsensor BT- 20. A susceptibilidade antimicrobiana das cepas isoladas de leite foi avaliada pelo método de difusão em disco. Das amostras positivas, isolou-se *Staphylococcus* sp. (93,54%), seguido de *Corynebacterium* sp. (41,93%), Enterobactérias (38,70%), *Streptococcus* sp. (32,25%) e *E. coli* (32,25%). Em 1 (3,22%) não houve crescimento microbiano. Os antimicrobianos que apresentaram maior eficácia aos *Staphylococcus* coagulase positivo foram cloranfenicol e norfloxacina com 100% de sensibilidade, e aos *Staphylococcus* coagulase negativo foram norfloxacina (91,6%), gentamicina e norfloxacina com 86,1%. Já em relação aos *Staphylococcus aureus*, 100% dos isolados mostraram-se sensíveis a novobiocina e 94,1% a norfloxacina. O leite de búfalas de seis propriedades da Baixada Maranhense apresentou resíduo de antimicrobianos. Os resultados indicam que são precisos cuidados preventivos relacionados à transmissão desses agentes patogênicos pela ingestão do leite e seus derivados contaminados. O leite produzido na Baixada Maranhense pode representar riscos à população e necessita-se de adoção de medidas de prevenção e controle da mastite baseado no perfil de sensibilidade antimicrobiana dos micro-organismos causadores da doença.

**Palavras- chave:** micro-organismos; contaminantes; saúde pública.



SANTOS, N. A. F.; COSTA, F. N. Research of clinical and subclinical mastitis, somatic cell count , antimicrobial susceptibility and antibiotic residues in milk samples of buffaloes (*Bubalus bubalis*) Baixada Maranhão [Pesquisa de mastite clínica e subclínica, contagem de células somáticas, susceptibilidade a antimicrobianos e resíduos de antibióticos em amostras de leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) da Baixada maranhense]. 2013. 106f. Dissertation (Master of Animal Science) - University of Maranhão, São Luís, 2013.

## ABSTRACT

The objective of this research work clinical and subclinical mastitis, somatic cell count, antimicrobial susceptibility and antibiotic residues in samples of buffalo milk. 304 buffaloes were evaluated 10 properties located in the municipalities of Viana, Arari, Cajari, Matinha and Victory Mearim , the low lands , using tests mug screened and *California Mastitis Test* (CMT). The 1204/4 mammary evaluated, only 1 (0.09 %) had clinical mastitis and 31 (2.57 %) had subclinical mastitis. We collected 31 samples positive for clinical and subclinical mastitis and microbiological analysis for the isolation and identification of micro -organisms. The residue antibiotics search was performed using commercial kits Delvotest SP-NT, Eclipse - Twinsensor 50 and BT-20. The antimicrobial susceptibility of strains isolated from milk was evaluated by disk diffusion. Positive samples, isolated *Staphylococcus* sp. (93.54 %), followed by *Corynebacterium* sp. (41.93 %), Enterobacteriaceae (38.70 %), *Streptococcus* sp. (32.25 %) and *E. coli* (32.25 %). In 1 (3.22 %) showed no microbial growth. Antimicrobials that showed greater efficacy for *Staphylococcus* coagulase positive were chloramphenicol and norfloxacin with 100 % sensitivity, and norfloxacin were coagulase negative *Staphylococcus* (91.6 %), gentamicin and norfloxacin with 86.1 %. In relation to *Staphylococcus aureus*, 100 % of the isolates were sensitive to novobiocin and 94.1 % to norfloxacin. The buffalo milk six properties in the low lands presented antimicrobial residue. The results indicate that preventive care are needed regarding the transmission of these pathogens through ingestion of contaminated milk and dairy products. Milk produced in low lands can pose risks to the population and the need to adopt measures to prevent and control mastitis based on the profile of antimicrobial susceptibility of micro - organisms causing disease.

Keywords: micro - organisms, and contaminants; public health.

## SUMÁRIO

	p.
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
Referências.....	25
2. ARTIGO I	
Introdução.....	35
Material e Métodos.....	38
Resultados e Discussão .....	41
Conclusões.....	50
Referências.....	51
3. ARTIGO II	
Introdução.....	60
Material e Métodos.....	61
Resultados e Discussão.....	62
Conclusões.....	64
Referências.....	64
4. CONCLUSÕES.....	70
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
APÊNDICES.....	73
ANEXOS.....	100

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO I

p.

<b>Tabela 1.</b> Resultado dos testes caneca telada, CMT e isolamento bacteriano em amostras de leite de búfalas da Baixada Maranhense.....	43
<b>Tabela 2.</b> Número de amostras positivas de leite de búfala, por faixa de contagem de UFC/mL de Bactérias aeróbias mesófilas, bolores e leveduras e <i>Staphylococcus</i> sp., 2013.....	46
<b>Tabela 3.</b> Frequência de micro-organismos isolados em leite de búfalas da Baixada Maranhense segundo o resultado na contagem de células somáticas, 2013. ....	48

### ARTIGO II

<b>Tabela 1.</b> Frequência de amostras de leite de búfalas contaminadas por resíduo de antimicrobianos provenientes de propriedades leiteiras da Baixada Maranhense.....	71
<b>Tabela 2.</b> Frequência relativa (%) da sensibilidade intermediária (I) e resistência (R) “ <i>in vitro</i> ” dos isolados de 72 cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo, 23 de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo e 17 de <i>Staphylococcus aureus</i> , isoladas de leite de búfalas com mastite, frente aos antimicrobianos, 2013.....	72

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO I

p.

**Figura 1.** Distribuição de porcentagem de células somáticas em leite de búfalas da Baixada Maranhense nos diferentes escores em que: **escore 1 (traços)**=16.000 a 380.000 cél./mL; **escore 2 (fracamente positivo)**=420.000 a 1.025.000 cél./mL; **escore 3 (positivo)**=1.322.000 a 1.961.000 cél./mL; **escore 4 (fortemente positivo)**=2.292.000 a 4.141.000 cél. /mL..... 45

**Figura 2.** Frequência dos agentes etiológicos isolados das amostras de leite de búfalas, provenientes de propriedades leiteiras da Baixada Maranhense, 2013..... 46

### ARTIGO II

**Figura 1.** Frequência de amostras de leite de búfalas contaminadas com resíduos de antimicrobianos frente aos testes Delvotest SP, Eclipse 50 e Twinsensor BT 20, provenientes de propriedades leiteiras da Baixada Maranhense..... 71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

AGED- Agência Estadual de Defesa Agropecuária

CINa<sup>+</sup>- Cloreto de Sódio

CMT- *California Mastitis Test*

CCS- Contagem de Células Somáticas

CBT- Contagem Bacteriana Total

PAMvet- Programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

SCN- *Staphylococcus* coagulase negativo

SCP- *Staphylococcus* coagulase positivo

LMR- Limites máximos de resíduos

MHA- Ágar Mueller Hilton

OMS- Organização Mundial de Saúde

BHI- Caldo Cérebro-Coração

TSI- Ágar Tríplice Açúcar Ferro

VM- Vermelho de metila

VP- Voges – Proskauer

## **1. REVISÃO DE LITERATURA**

## INTRODUÇÃO

Existem no mundo cerca de 174.027.155 búfalos, sendo que a maioria destes encontra-se no continente asiático. A Índia possui o maior rebanho, com aproximadamente 98.000.000 animais, seguida do Paquistão com 26.300.000 e da China, com 22.745.250. Na América do Sul, destaca-se o Brasil com um contingente maior que o de toda Europa e ocupando a décima primeira posição mundial (BERNARDES, 2007), segundo o IBGE, o efetivo de bubalinos, em 2011, foi de 1,3 milhão de cabeças.

De acordo com estudos realizados, o rebanho bubalino no Brasil tem aumentado cerca de 12,7% ao ano, mostrando ser uma alternativa à pecuária tradicional, principalmente devido à sua alta rusticidade e adaptabilidade às condições do país. Os búfalos concentram-se no Norte e Nordeste do país, sendo os maiores efetivos registrados no Pará (38,0%), Amapá (18,4%) e Maranhão (6,5%) (SILVA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2003). É importante destacar, que o Brasil se encontra em posição bastante privilegiada com relação à bubalinocultura, posto que detém o maior rebanho da espécie do Ocidente e dispõe de exemplares com produtividade leiteira comparável aos melhores espécimes (BERNARDES, 2007).

O Maranhão possui o 3º maior rebanho bubalino do Brasil, com cerca de 80 mil bubalinos, dos quais mais de 18.500 cabeças estão nos pastos de Viana, município com maior rebanho do estado, segundo dados da Agência de Defesa Agropecuária do Maranhão – AGED (2011). A produção de leite no Brasil aumentou de 16,5 bilhões de litros em 1994 para mais de 25 bilhões de litros em 2005. Estima-se que a produção de leite de búfalas no país seja de 92,3 milhões de litros, produzidos por cerca de 82.000 búfalas em 2.500 rebanhos e que existam pelo menos 150 indústrias produzindo derivados de leite de búfalas, que transformam anualmente 45 milhões de litros de leite em 18,5 mil toneladas de derivados, gerando um faturamento bruto da ordem de U\$ 55 milhões aos laticínios e de cerca de U\$ 17 milhões aos criadores (SILVA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2003).

O leite é um alimento que possui um perfeito balanço de nutrientes, fornecendo ao homem macro e micronutrientes indispensáveis ao crescimento, desenvolvimento e

manutenção da saúde. Como fonte de proteínas, lipídeos, carboidratos, minerais e vitaminas, torna-se um dos alimentos mais vulneráveis à deterioração por microorganismos, estes contaminantes podem causar modificações organolépticas, que limitam a durabilidade do leite e seus derivados, além de problemas econômicos e de saúde pública (BHERMER, 1999; FREITAS et al., 2002). A qualidade é um dos maiores problemas da cadeia do leite, interferindo negativamente na produção e rendimento de derivados (SANTOS & RODRIGUES, 2003). Devido à importância que representam na alimentação humana, o leite e seus derivados estão entre os alimentos mais testados e avaliados em relação à qualidade no Brasil (BUZI et al., 2009).

Além da sua maior rusticidade, o que permite a sua criação em regiões alagadas, que são inadequadas para bovinos a espécie bubalina tem maior resistência às ectoparasitoses, apresentam menor frequência de mastite, são menos exigentes quanto à qualidade das pastagens e gramíneas, e conseqüentemente apresentam menor custo de produção (AMARAL & ESCRIVÃO, 2005).

Apesar do elevado valor nutritivo e da importância tecnológica do leite de búfala, sua produção e consumo ainda são muitos baixos, quando comparados com o leite de vaca. Este comportamento pode estar relacionado à pouca divulgação das características do leite e dos poucos estudos que têm sido realizados a respeito da sua composição química, propriedades físico-químicas e qualidade microbiológica. No entanto, apesar da baixa produção, estima-se que houve um acréscimo de 48,52% na produção mundial de leite de búfalas no período de 1992 a 2002 (AMARAL et al., 2005). O leite de búfala apresenta alto valor nutricional, altos níveis de gordura, proteínas e minerais (em especial o cálcio), podendo ser utilizado tanto para o consumo *in natura*, como matéria-prima para elaboração de produtos lácteos, que podem variar conforme a cultura de cada região (TEIXEIRA et al., 2005).

OLIVEIRA et al. (2004) afirmam que 44% do leite consumido no Brasil é proveniente do mercado informal, sendo comercializado sem qualquer tratamento térmico ou controle laboratorial. Portanto, a transmissão dos patógenos da mastite e suas toxinas via leite e produtos lácteos corresponde a um risco à saúde do consumidor. Segundo Prata (2001), todo leite é um excelente meio de cultura para o



desenvolvimento de micro-organismos devido à alta quantidade de água livre, riqueza de nutrientes, concentração de gases gerando um ambiente aeróbico e pH próximo do neutro.

A contaminação do leite cru afeta a qualidade, a vida de prateleira e a segurança dos produtos lácteos processados (FONSECA & SANTOS, 2000). Segundo Dingwell et al. (2004), a qualidade do leite está diretamente relacionada com saúde, alimentação e manejo dos animais, com a qualidade da mão-de-obra, manejo adequado dos equipamentos e utensílios utilizados durante a ordenha e transporte até a indústria. Todos esses fatores influenciam a sua composição original (proteína, gordura, etc.) e as características de sabor, cheiro e viscosidade, certificando ou não a qualidade do produto.

A mastite 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, além da queda na qualidade do produto final com diminuição no rendimento industrial para fabricação de derivados e alterações na composição do leite mamático (LANGONI, 1999; SILVA, 1999), ou até pela perda total da capacidade secretora da glândula mamária. Esta enfermidade é consequência da interação de fatores relacionados ao animal, patógenos e ambiente (BRITO & BRITO, 2000; BRADLEY, 2002) e tem por características um processo inflamatório da glândula mamária relacionadas à agressões físicas, químicas, térmicas ou microbianas, podendo se manifestar na forma clínica ou subclínica.

Philpot & Nickerson (1991) apontam que 90% das mastites são causadas por bactérias. Além destes patógenos, fungos, leveduras, algas e vírus, além de estresse e ferimentos físicos também podem estar envolvidos na etiologia da doença, porém a ocorrência é baixa. Segundo Santos et al. (2004), a colonização da glândula mamária por bactérias patogênicas resulta em eventos que conduzem a alterações na composição do leite.

De acordo com a forma de manifestação, a mastite pode ser dividida em dois grupos. A forma clínica que apresenta sinais evidentes, tais como, edema, hipertemia, endurecimento e dor da glândula mamária e/ou aparecimento de

grumos, pus ou alterações das características organolépticas do leite (BRADLEY, 2002) e a forma subclínica que se caracteriza por alterações na composição do leite, porém, não ocorrem mudanças visíveis no aspecto do leite ou do úbere (PERSSON WALLER et al., 2003), entre as principais alterações destaca-se o aumento da contagem de células somáticas, o aumento dos teores de ClNa<sup>+</sup>, proteínas séricas e diminuição do percentual de caseína, cálcio, gordura e lactose do leite (CULLOR et al., 1994; GIANOLA et al., 2004), fazendo com que haja menor rendimento na produção de seus derivados, além de diminuir o tempo de prateleira do produto (BRADLEY, 2002). Segundo Philpot & Nickerson (1991) para cada caso clínico de mastite devem existir entre 15 a 40 casos subclínicos.

Oliveira et al. (2012) relatam que a mastite subclínica apresenta uma maior importância epidemiológica por alastrar-se silenciosamente pelo rebanho sem que sejam percebidas alterações macroscópicas à inspeção do úbere ou de sua secreção. No que diz respeito às mastites clínicas, Bradley (2002) aponta estas como as causas mais comuns de morte entre vacas leiteiras adultas e ressalta a sua gravidade nas questões de bem-estar animal, já que quadros de hiperalgesia estão vinculados a episódios agudos de mastite clínica.

Segundo Busato et al. (2000) e Freitas et al. (2005) o prejuízo acarretado pela mastite constitui cerca de 25% de todas as doenças de importância econômica, sendo que a mastite clínica representa 18% do prejuízo total por causar morte ou descarte prematuro e que a redução na produção total é representada principalmente pela mastite subclínica (82%). A mastite continua sendo um grande problema para a indústria leiteira, apesar das inúmeras pesquisas voltadas para o controle desta enfermidade.

Além da sua importância em saúde pública, fatores como perdas de produção leiteira, custos de tratamento dos casos clínicos, descarte e morte prematura dos animais, somados aos prejuízos da indústria por redução na qualidade e rendimento na fabricação de derivados são responsáveis pelo elevado impacto econômico das mastites (OLIVEIRA et al., 2012). Freitas et al. (2005) afirmam que a elevada ocorrência e as perdas econômicas decorrentes principalmente da diminuição da

produção láctea, fazem com que esta enfermidade seja considerada a mais dispendiosa nas propriedades leiteiras.

No caso das formas clínicas, o diagnóstico é realizado pelo uso da caneca de fundo preto ou telada onde visualizam - se as alterações macroscópicas do leite, enquanto a mastite subclínica pode ser detectada através do *California Mastitis Test* (CMT) e Contagem de Células Somáticas (CCS). Estes, juntamente com a Contagem bacteriana total (CBT) são testes importantes que devem ser feitos pelo menos uma vez por mês (COSTA et al., 2000 & ANDRADE et al., 2000).

O CMT é um dos testes mais usuais para o diagnóstico da mastite subclínica, sendo um indicador indireto da contagem de células somáticas no leite. Este consiste na coleta de leite dos quartos mamários, individualmente, em uma bandeja apropriada, adicionando-se um detergente aniônico neutro, que atua rompendo a membrana das células e liberando o material nucléico (DNA), que apresenta alta viscosidade (NICKERSON, 1998).

As células somáticas são compostas basicamente por dois tipos de células principais: células de descamação do epitélio secretor e leucócitos de origem do sangue, sendo que estas se apresentam com elevadas concentrações nos casos de mastite. A CCS é um teste rápido e facilmente obtido a fim de determinar a qualidade do leite e avaliar a saúde da glândula mamária. A infecção intramamária é o fator que mais afeta a CCS do leite. Quando os micro-organismos da mastite invadem um quarto do úbere e começam a se multiplicar, ou quando o número de micro-organismos aumenta significativamente em um quarto já infectado, o organismo direciona os leucócitos do sangue para o interior da glândula mamária, com intuito de combater a agressão tecidual (BARBALHO & MOTA, 2001; GIANOLA et al., 2004).

A Contagem Bacteriana Total (CBT), significa a contagem do número de colônias presentes em dada amostra de leite, bem como a taxa de multiplicação microbiana (CARVALHO et al., 1995). A determinação da contagem bacteriana no leite é importante para a avaliação da higiene de ordenha, da saúde dos animais e das condições de estocagem e transporte do leite cru, sendo uma importante ferramenta

no controle de qualidade do mesmo. Além disto, o leite com elevada contagem bacteriana representa risco para a saúde do consumidor pelo potencial de veicular micro-organismos e toxinas microbianas (ALVES, 2006). Segundo Fonseca & Santos (2000), a CBT do leite é dependente da concentração bacteriana inicial e da taxa de multiplicação dos micro-organismos, estando estas variáveis relacionadas com higiene de ordenha, saúde da glândula mamária, limpeza dos utensílios e equipamentos e qualidade da água.

A substituição da Instrução Normativa 51 pela de número 62, que entrou em vigor em 1º de janeiro de 2012, veio com o objetivo de aumentar os prazos e limites de Contagem Bacteriana Total (CBT) e Contagem de Células Somáticas (CCS), para que os produtores de leite bovino que não se encontravam nos padrões da normativa anterior tivessem mais tempo para se adequar. A Instrução Normativa nº51 (BRASIL, 2002) preconizava os limites legais de CCS para o leite cru refrigerado, estipulando diferentes prazos para as diversas regiões do país. O limite inicial, que entrou em vigor em julho de 2005 nas Regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste era de 1.000.000 céls./mL. Os valores máximos propostos foram reduzidos para 750.000 céls./mL em 2008, nas regiões citadas. Em 2011, para todas as regiões do país, o padrão oficial passou a ser 400.000 céls./mL.

A etiologia da mastite é complexa e multivariada o que torna necessária a identificação dos micro-organismos que causam a infecção da glândula mamária, tanto para o controle e prevenção, quanto para o monitoramento de rebanhos (RIBEIRO et al., 2003; DIAS, 2007). Além de causar prejuízos econômicos para produtores de leite e indústrias de laticínios, os micro-organismos envolvidos na etiologia da mastite podem causar importantes doenças no homem, como intoxicação estafilocócica, listeriose, campilobacteriose, dentre outras (PHILPOT & NICKERSON, 1991).

O exame microbiológico é considerado o método padrão para determinação da saúde do úbere e para o diagnóstico da mastite, sendo que o seu principal objetivo é oferecer resultados rápidos e seguros ao veterinário, para que ele possa identificar os problemas do rebanho. Além disso, análises microbiológicas são complementares e indispensáveis em um programa de controle desta enfermidade, por possibilitarem

o isolamento e a identificação do seu agente etiológico (BUSATO et al., 2000; DIAS, 2007). Desse modo, medidas específicas de controle direcionadas para o ambiente, ou para a higiene da ordenha, podem ser indicadas de acordo com o padrão de infecção encontrado (FERNANDES et al., 2005).

As búfalas são consideradas menos susceptíveis à mastite do que as vacas, embora os micro-organismos envolvidos na infecção sejam semelhantes (LÁU, 1994). A susceptibilidade das búfalas em relação à mastite é muito reduzida quando comparada à vaca, possivelmente devido à espessura da camada do epitélio e queratina, melhor organização da musculatura do esfíncter do teto (SAINI et al., 1994; OLIVEIRA et al., 2007), além do tipo de células e grau de atividade celular intramamária (DELLA LIBERA et al., 2004), maior atividade da enzima lactoperoxidase e maior concentração de lactoferrina no leite (BATHIA et al., 1994; KAPRONEZAI, 2004). No entanto o hábito da espécie de adentrar em terrenos alagadiços pode favorecer a infecção mamária por micro-organismos ambientais, particularmente fungos, enterobactérias e algas (RIBEIRO et al., 2003).

As perdas econômicas devido à mastite bubalina são elevadas e usualmente ocorre reduzindo a produção de leite e aumentando os custos com tratamento e honorários veterinários, além do descarte do leite contaminado (HAMZA & CHOUDHURI, 1994; SINGH & SINGH, 1994).

Convém lembrar que a qualidade da matéria prima é essencial para a fabricação de um bom produto e apesar do leite bubalino possuir uma qualidade superior em relação ao leite de vaca, com derivados feitos com leite de búfala não é diferente, pois um leite com baixas contagens microbiológicas e baixa contagem de células somáticas garante um produto de melhor qualidade, refletindo na maior aceitabilidade pelo consumidor, durabilidade do produto e, por fim, maior rendimento industrial. Em contrapartida, o leite com elevada contagem de células somáticas tem reflexo negativo no rendimento dos derivados do leite, além da durabilidade e as características sensoriais ficarem prejudicadas (TEIXEIRA et al., 2005).

Os micro-organismos envolvidos na ocorrência de mastite são classificados, com base nas fontes de infecção e vias de transmissão, em contagiosos e ambientais. A

maior frequência de mastite em animais de produção está relacionada aos micro-organismos contagiosos, representados principalmente pelos gêneros *Staphylococcus* (*S. aureus*), *Streptococcus* (*S. agalactiae*) e *Corynebacterium* (*C. bovis*). Dentre os ambientais, assumem importância as enterobactérias (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes*), *Nocardia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, algas (*Prototheca zopfii*), fungos e leveduras (SILVA et al., 2000).

Dentro do grupo de coliformes fecais, a *E. coli* é a melhor indicadora de contaminação fecal direta ou indireta conhecida até o momento, nas fezes humanas e de animais, cerca de 95% dos coliformes existentes são *Escherichia coli* (SILVA et al., 2000; HAJDENWURCEL et al., 2002). A presença desta bactéria tem um significado importante, uma vez que existem linhagens patogênicas, com base nos fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiológicas para o homem e animais (FRANCO & LANFGRAF, 1996). Quanto às intoxicações alimentares de origem fúngica, sabe-se que algumas espécies de bolores produzem determinados metabólicos tóxicos, designados por micotoxinas, os quais são prejudiciais à saúde.

Embora a mastite possa ser causada por inúmeros micro-organismos os *Staphylococcus* são reconhecidos como sendo os agentes etiológicos isolados com maior frequência em vários países do mundo, destacando-se entre eles o *Staphylococcus aureus*, um coco Gram-positivo, coagulase positivo, beta-hemolítico e classificado como um micro-organismo mesófilo. Apresenta crescimento em temperaturas entre 7,0°C e 47,5°C, patógeno das mastites classificadas como contagiosas, sendo considerado o principal agente responsável pela intoxicação estafilocócica pela ingestão de alimentos que apresentam a toxina pré-formada (SÁ et al., 2004).

As enterotoxinas estafilocócicas (A, B, C, D e E), são imunologicamente distintas, produzidas entre 10°C e 46°C, as taxas de isolamento são variáveis de acordo com diferentes autores, entretanto, tem sido considerada como de maior significado nas infecções intramamárias (FRANCO & LANDGRAF, 1996). Quanto à sua participação nas mastites, sejam clínicas ou subclínicas, encontraram-na em 23,5% e 76,5% dos casos, respectivamente (SILVA et al., 2000; HAJDENWURCEL et al., 2002).

Segundo Guedes et al. (2007) a partir de elementos que passam do sangue para as células especializadas da glândula durante o processo de lactação na glândula mamária, podem passar também medicamentos ou drogas veterinárias que foram administrados para o controle de alguma doença. Dessa forma, no leite é possível que estejam presentes resíduos de substâncias administradas aos animais ou usadas no ambiente da fazenda, tais como, antibacterianos, antiparasitários, desinfetantes, detergentes e herbicidas (BRITO et al., 2001).

Um fato agravante da presença destas substâncias no leite é que a maior parte é resistente à pasteurização, entre as quais algumas não são inativadas mesmo quando submetidas a temperaturas acima de 100°C (HOTTA, 2003). Brito (2006) afirma que a pasteurização e a esterilização comercial (UHT) não inativam os antimicrobianos supostamente presentes no leite.

Os antibióticos têm sido bastante utilizados nas fazendas e até em muitos casos, de maneira indiscriminada, seja para fins terapêuticos, principalmente visando a cura de mastites, ou ainda incorporados à alimentação animal como suplemento dietético. A presença de resíduos de antimicrobianos representa a principal contaminação química em leite e produtos lácteos. Desta forma, além dos altos custos com o tratamento há uma preocupação crescente com a presença de resíduos de antibióticos no leite gerando uma busca de métodos alternativos para a abordagem clássica dos antibióticos (COSTA et al., 1996).

A persistência de resíduos de antimicrobianos no leite varia com o produto e depende de vários fatores como por exemplo, dose e via de administração, excipiente utilizado e a solubilidade, entre outros. Antibióticos do grupo dos betalactâmicos, principalmente a penicilina, são os mais utilizados no tratamento da mastite, em virtude dos efeitos bactericidas e bacteriostáticos sobre um amplo espectro de bactérias gram-positivas e negativas sendo assim os mais frequentemente detectados no leite (COSTA, 2006; NERO et al., 2007).

O desenvolvimento de reações alérgicas ou tóxicas, além de resistência bacteriana nos indivíduos que ingerem o leite contaminado com resíduos de antibióticos têm sido motivo de grande preocupação com relação aos riscos

oferecidos aos consumidores. De acordo com Fonseca e Santos (2000) cerca de 5 a 10% da população é hipersensível à penicilina e apresentam reações alérgicas. Sendo assim, trata-se de um problema de saúde pública que merece consideração especial, pois os efeitos tóxicos de resíduos de antibiótico no leite à saúde humana favorecem o desenvolvimento de formas de resistência de micro-organismos patogênicos (BRITO, 2006).

Segundo Biacchi et al. (2004) e Nunes et al. (2007) dentre os problemas gerados pela existência de resíduos de antibióticos no leite estão: o aparecimento de cepas bacterianas resistentes devido à utilização inadequada, ocorrência de reações alérgicas, repercussões em nível de tecnologia de alimentos e, consequências econômicas para os produtores.

Para a indústria o principal problema ocasionado por resíduos de antibióticos é a interferência no crescimento das culturas iniciadoras durante a elaboração de queijos e leites fermentados, alterando os fatores de qualidade e impedindo a manutenção do padrão de identidade e qualidade dos produtos (FAGUNDES, 1997). Portanto, a presença de antibióticos no leite, mesmo em pequenas quantidades pode gerar perdas na produção de derivados lácteos, causando prejuízos econômicos à indústria (BRITO, 2005).

Existem vários kits comerciais disponíveis para a pesquisa de resíduos de antimicrobianos em leite e são, na sua maioria, qualitativos ou semi-quantitativos, sendo mais conhecidos como testes de triagem. No Brasil, a Instrução Normativa nº. 62, de 29 de dezembro de 2011, exige a pesquisa periódica de antibióticos em leite, cuja responsabilidade é das indústrias e, afirma ainda que, análises devem ser realizadas somente por laboratórios oficiais ou credenciados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- MAPA.

Verifica-se na atualidade que apesar da disponibilidade de vários antimicrobianos para tratamento da mastite, o problema de resistência dos micro-organismos a estes se acentuou pelo uso indiscriminado e inadequado, particularmente no Brasil (COSTA, 1996).



Como consequência, tanto as drogas consideradas clássicas no arsenal terapêutico, como aquelas de introdução recente no comércio, vem se tornando ineficientes. Neste sentido, este quadro tende a se agravar, principalmente nos casos de patógenos, que tanto infectam animais como humanos. Mesmo quando estes não são coincidentes, sempre há possibilidade de transferência dessa resistência entre bactérias, inclusive em espécies diferentes. O insucesso de um tratamento também pode relacionar-se à capacidade de sobrevivência intracelular de algumas bactérias e também a alterações anatomopatológicas induzidas por certas infecções impedindo o acesso do medicamento no foco (BARRAGY, 1994).

Estudos apontam para um aumento no padrão de resistência principalmente dos *Staphylococcus sp.*, este fato têm contribuído para a seleção de bactérias resistentes a antibióticos, o que torna cada vez mais imprescindível que a escolha do medicamento a ser utilizado seja baseada no conhecimento do perfil de sensibilidade das cepas isoladas frente aos antimicrobianos (ANDRADE et al., 2000, COSTA, 2006).

Apesar do crescente interesse pela criação de búfalos no Brasil, fato que tem proporcionado uma maior utilização do leite das fêmeas dessa espécie, são poucas as informações disponíveis sobre a mastite em bubalinos. No Estado do Maranhão não há estudos sobre a prevalência de mastites clínica e subclínica no rebanho bubalino leiteiro. Diante do exposto e considerando a escassez de informações sobre a qualidade do leite de búfalas; o potencial que o estado tem para a bubalinocultura leiteira e ainda, a importância da qualidade do leite para a saúde humana, é que se propôs a realização deste trabalho, com os seguintes objetivos:

- Diagnosticar mastites clínica e subclínica no Estado do Maranhão através dos testes da caneca telada e CMT;
- Pesquisar os micro-organismos causadores de mastite bubalina;
- Realizar a Contagem Bacteriana Total (CBT);
- Quantificar células somáticas, *Staphylococcus sp.*, Bolores e leveduras nas amostras de leite confirmadas com mastite;

- Detectar resíduos de antimicrobianos nas amostras de leite *in natura*, utilizando os testes Delvotest SP-NT; Eclipse 50 e Twinsensor – BT 20;
- Avaliar a sensibilidade de cepas de *Staphylococcus* sp. isolados das amostras de leite frente aos antimicrobianos comumente usados no tratamento das doenças do rebanho leiteiro;
- Orientar os ordenhadores sobre boas práticas na produção leiteira;
- Elaborar um Manual de Boas Práticas na produção de leite com ênfase em higiene e qualidade da ordenha.

## REFERÊNCIAS

ALVES, C., Efeito de variações sazonais na qualidade do leite cru refrigerado de duas propriedades de Minas Gerais. **Dissertação**. 63p. UFMG. Belo Horizonte, 2006.

AMARAL, F. R.; CARVALHO, L. B.; SILVA, N.; BRITO, J. R. F. Qualidade do leite de búfalas: composição. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n.2, p.106-110, abril/jun. 2005.

AMARAL, F. R.; ESCRIVÃO, S. C. Aspectos Relacionados à Búfala Leiteira. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, MG, v. 29, n. 2, p. 11–117, abril/jun. 2005. Disponível em: <http://www.cbra.org.br>. Acesso em: 03 de jan. de 2013.

ANDRADE, M. A.; DIAS FILHO, F. C.; MESQUISTA, A. J.; ROCHA, P. T. Sensibilidade “*in vitro*” de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. **Ciência Animal Brasileira**, v.1, n.1, p.53-57, 2000.

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

BARRAGY, T. B. Bovine mastitis In: **Veterinary Drug therapy New York: Lea e Febiger**, 1994, p.655-687.

BATHIA, K. L.; VALSA, C. Lactoferrin level in buffalo milk. In: BUFFALO WORLD CONGRESS, 1994, São Paulo, 4. **Proceedings...** São Paulo: Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos, 1994. v.2. p.162.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite**, SP: 13<sup>o</sup> ed. Editora Noel, 1999.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.293-298, jul./set. 2007.

BIACCHI, N. C.; JORGE, A. O. C.; BUENO, M. Detecção de resíduos de antibióticos em leite bovino na região do Vale do Paraíba, São Paulo. **Revista Biociência**, Taubaté, v. 10, n. 1-2, p. 47-49, jan./jun. 2004.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel, em conformidade com os ANEXOS a esta Instrução Normativa. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 de setembro de 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 31 dez. de 2011. Seção 1, p. 6.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P. **Mastite bovina**, São Paulo: Manole, 2000, p. 114- 129.

BRITO, M. A. V. P. **Resíduos de antimicrobianos no leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005. 28 p.

BRITO, M. A. V. P. **Resíduos de antibióticos no leite: um problema que tem solução**. Juiz de Fora: Embrapa, 2006. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br>. Acesso em: 12 dez. 2012.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; MATOS, L. L.; HOLANDA JUNIOR, E. V.; MADALENA, F. H. Qualidade do leite. In: **Produção de leite e sociedade: uma análise crítica da cadeia do leite no Brasil**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2001. p. 61-74.

BUSATO, A.; TRACHSEL P.; SCHALLIBAUM, M.; BLUM, J. W. Udder health and risk factors for subclinical mastitis in organic dairy farms in Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**, v.44, n.3-4, p.205-220, abril, 2000.

BUZI, K. A.; PINTO, J. P. A. N.; RAMOS, P. R. R.; BIONDI, G. F. Análise microbiológica e caracterização do queijo mussarela elaborado a partir de leite de búfala. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** [online], vol. 29, n. 1, p. 07, 2009.

CARVALHO, A. L. SILVA, E R.; RIBEIRO, R. L. **Qualidade do leite do Centro-Oeste**, Goiânia: Editora da UFG, 1995.

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

COSTA, E. O, MANGERONA, A. M., BENITS, N. R. MELVILLE, P. O.; PARDO, R. B.; RIBEIRO, O. R.; WATANABE, A. Avaliação de campo de quatro tratamentos

intramamários de mastite clínica bovina. **A hora Veterinária**, v.16, n.93, p.19-21, 1996.

COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2006. p. 501-515.

CULLOR, J. S.; TYLER, J. W.; SMITH, B. P. Distúrbios da glândula mamária. In: SMITH, B.P. (Ed.) **Tratado de Medicina Interna dos Grandes Animais**. São Paulo: Manole, 1994. v.2. p.1041-1060.

DELLA LIBERA, A. M. M. P.; ARAÚJO, W. P.; KITAMURA, S. S. Citologia do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) híidas criadas no Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, p.1087-1092, 2004.

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

DINGWELL, R. T., LESLIE K. E., SCHUKKEN, Y. H., SARGEANT, J. M., TIMMS, L. L., DUFFIELD, T. F., KEEFE, G. P., KELTON, D. F., LISSEMORE, K. D.; CONKLIN, J. Association of cow and quarter-level factors at drying-off with new intramammary infections during the dry period. **Preventive Veterinary Medicine**. v.63, p.75-77, 2004.

FAGUNDES, C. M. **Inibidores e controle de qualidade do leite**. Pelotas: Universitária, 1997. 128 p.

FERNANDES, S. A. A.; MATTOS, W. R.; MATARAZZO, S. V.; TANHATI, H.; OTAVIANO, A. R.; LIMA, A. L. F.; RUIZ PESCE, M. L. Avaliação da produção e qualidade do leite de rebanhos de São Paulo. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, n. 346/347, v.60, p. 53- 58, 2005.

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

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Ateneu, 1996, 182 p.

FREITAS, J. A.; OLIVEIRA, J. P.; SUMBO, F. D.; Características físico-químicas e microbiológicas do leite fluido exposto ao consumo na cidade de Belém, Pará. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n.10, p. 89-96, 2002.

FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JUNIOR, J. W.; STAMFORD, T. L. M.; RABELO, S. S. A.; SILVA, D. R.; SILVEIRA FILHO, V. M.; SANTOS, F. G. B.; 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 do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.2, p.171-177, 2005.

GIANOLA, D., HERINGSTAD, B., KLEMETSDAL, G., CHANG, Y. M. Longitudinal analysis of clinical mastitis at different stages of lactation in Norwegian cattle. **Livestock Production Science**, v.88, n.3, p.251-261, 2004.

GUEDES, R. S.; ALVES, E. U.; BRUNO, R. L. A.; GONÇALVES, E. P.; BRAGA JÚNIOR, J. M.; MOURA, M. F.; ROCHA, M. S. Effect of substrate and of temperature in germination of seeds of *Cereus jamacaru* DC. **Resumos...** IV International Congress on Cactus Pear and Cochineal and VI General Meeting of FAO - CACTUSNET, 2007.

HAJDENWURCEL, J. R.; BRANDÃO, S. S. C.; LERAYER, A. L. S.; **Nova legislação comentada de produtos lácteos**. São Paulo: Fonte comunicações e Editora, 2002. 327 p.

HAMZA, P. A.; CHOUDHURI, P. C. Chemoprophylactic studies on mastitis in buffaloes. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 47, n.9, p.723-726, 1994.

HOTTA, J. M. Monitoramento de resíduos de antimicrobianos em diferentes pontos da cadeia produtiva do leite, comparando diferentes métodos de detecção. 2003. 90

f. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

KAPRONEZAI, J. Estudo de provas microbiológicas e celulares em amostras de leite provenientes de fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) no Estado de São Paulo. 2004. 82f. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

LANGONI, H. Complexidade etiológica na mastite bovina In: Encontro de Pesquisadores em Mastites, III, 1999. Botucatu, SP. **Anais...** Botucatu, 1999, p.3-18.

LÁU, H. D. Important economic diseases in buffaloes. In: World Buffalo Congress, 4., **Anais...**, São Paulo: Associação Brasileira de criadores de búfalos, 1994, p.209-220, 1994.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BERLOTI, V.; BARROS, M. A. F.; FRANCO, B. D. G. M. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 391-393, abr./jun. 2007.

NICKERSON, S. C. Estratégia para combater mastite bovina. In: Simpósio internacional sobre qualidade do leite, 1., Curitiba – PR: **Anais...** Curitiba – PR, 1998. p. 20-27.

NUNES, M. T.; D`ANGELINO, J. L.; FRANCO, B. D. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite, em fazendas produtoras e no leite pronto para consumo. **Revista Higiene Alimentar**, v. 21, p. 57-61, mar., 2007.

OLIVEIRA, J. M.; VANDERLEI, D. R.; MORAES, W. S.; BRANDESPIM, D. F.; MOTA, R. A.; OLIVEIRA, D. A. F.; MEDEIROS, E. S.; JÚNIOR, J. W. P. Fatores de risco associados à mastite bovina na microrregião Garanhuns, Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.32 n.5, p.391-395, Mai., 2012.

OLIVEIRA, V. V., MOTA. I. A.; FONSECA, A. A. F., MEIRELLES, F. S., SILVA, F. F. Utilização do *Whiteside* modificado e *California Mastitis Test* no diagnóstico da mastite subclínica em búfalas e sua relação com o exame microbiológico. **Ciência Animal**, v.14, n.1, p.39-45, 2004.

OLIVEIRA, V. V., MOTA. I. A. FONSECA, A. A. F., MEIRELLES, F. S., SILVA, F. F. Mastite subclínica bubalina por *Aspergillus fumigatus*. **Revista Medicina Veterinária**, Recife, v.1, n.2, p.73-77, jul-dez, 2007.

PERSSON WALLER K., COLDITZ I.G., LUN S; OSTENSSON K. 2003. Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxin induced bovine mastitis. **Research in Veterinary Science**, v.74, n.1, p.31-36, 2003.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Mastitis: Counter Attack**. Naperville: Babson Bros, 1991. 150p.

PRATA, L. F. **Ciência do Leite**. Jaboticabal: FUNEP, 2001.

RIBEIRO, M. E. R.; PETRINI, L. A.; AITA, M. F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF J.; WALDYR, G.; JORGE F.; SCHRAMM, R. C.; MARTINS, P. R.; BARBOSA, R. Relação entre Mastite Clínica, Subclínica Infeciosa e não Infeciosa em Unidades de Produção Leiteiras na Região Sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 9, n. 3, p.287-290, jul-set, 2003.

SÁ, M. E. P.; CUNHA, M. S. R. S.; ELIAS, A. O.; VICTORIA, C.; LANGONI, H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.41, n.5, p.321-326, 2004.

SAINI, S. S. I.; A; VICTORIA, D. F.; CUNHA, F. J. Prevalence and etiology of subclinical mastitis among crossbred cows and buffaloes in Punjab. **Indian Journal of Dairy Science**, v.47, p.103-106, 1994.



SANTOS, A. F. R.; RODRIGUES, M. A. M. Resíduos inibidores em leite UHT. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 104-105, p. 174-175, jan./fev. 2003.

SANTOS, J. E. P.; CERRI RL, B. M. A.; HIGGINBOTHAMGE, K. J. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 80, n.1, p. 31-45. 2004.

SILVA, M. S. T.; LOURENCO, Jr. J.B; MIRANDA, H. A; ERCHESEN, R; FONSECA, R. F. S. R; MELO, J. A; COSTA, J. M. **Programa de incentivo a criação de búfalos por pequenos produtores – PRONAF**. Belém, PA: CPATU, 2003.

SILVA, M. V. M.; SARMENTO, A. M.C.; FRANCA, A. P. **Resíduos de antibióticos no leite e seus efeitos na saúde pública: uma preocupação constante**. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 35. Gramado, v. 35, p. 568-570, 2008.

SILVA, N. Diagnóstico de mastite em animais de importância econômica. In: Encontro de Pesquisadores em Mastites, III, 1999. Botucatu, SP. **Anais...** Botucatu, 1999, p. 51-55.

SILVA, N.; NETO, R. C.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; **Manual de métodos microbiológicos da água**. Campinas: ITAL, Núcleo de Microbiologia, 2000.99 p.

SINGH, P. J.; SINGH, K. B. A study on economic losses due to mastitis in India. **Indian Journal of Dairy Science**, v.47, n.4, p.265-272, 1994.

TEIXEIRA, L. V., BASTIANETO, E.; OLIVEIRA, D. A. A. Leite de búfala na indústria de produtos lácteos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n.2, p.96-100, abril/jun. 2005.

## **2. ARTIGO I**

*Conforme as normas de publicação da  
Revista Ciência Animal Brasileira*

# MASTITE EM BÚFALAS LEITEIRAS DA BAIXADA MARANHENSE: FREQUÊNCIA, ETIOLOGIA E CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS (CCS)

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a frequência, a contagem de células somáticas (CCS) e a etiologia da mastite em rebanhos bubalinos da Baixada Maranhense. Foram avaliados 1.204 quartos mamários de búfalas leiteiras pertencentes a dez propriedades situadas em municípios da Baixada Maranhense. Amostras de leite de animais positivos nos testes da caneca telada e *California Mastitis Test* (CMT) foram submetidas às análises microbiológicas. A Contagem de células Somáticas foi realizada através do equipamento eletrônico DeLaval Cell Counter®, para Contagem Bacteriana Total (CBT), determinação de *Staphylococcus* sp. e bolores e leveduras foram utilizados os meios Ágar Padrão para Contagem (PCA), Ágar Baird-Parker e Ágar Sabourad, respectivamente. Para identificação bacteriana foram utilizados os meios Ágar sangue enriquecido com 5% de sangue ovino e Ágar MacConkey e observadas as características morfológicas das colônias além das características morfotintórias à técnica do Gram e provas bioquímicas. Dentre as amostras positivas no exame microbiológico, isolaram-se *Staphylococcus* sp. (93,54%), seguido de *Corynebacterium* sp. (41,93%), Enterobactérias (38,70%), *Streptococcus* sp. (32,25%) e *E. coli* (32,25%). Dos isolados de *Staphylococcus* sp. obteve-se *Staphylococcus* coagulase positivo (SCP) em 15 amostras (48,38%), *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) em 22 (67,74%) amostras e *Staphylococcus aureus* em 13 amostras (16%). As propriedades leiteiras visitadas não apresentavam condições adequadas de higiene para a atividade.

**Palavras-chave:** leite bubalino; qualidade; segurança alimentar

---

## MASTITIS IN DAIRY BUFFALOES OF BAIXADA MARANHENSE: FREQUENCY, ETIOLOGY AND SOMATIC CELL COUNT (CCS)

### ABSTRACT

This work aimed to evaluate the frequency, somatic cell count (SCC) and etiology of mastitis in buffalo herds of low lands. 1204/4 were evaluated breast dairy buffaloes belonging to ten properties located in cities of low lands. Samples from animals positive test mug screened and *California Mastitis Test* (CMT) were subjected to microbiological analyzes. The Somatic cell count was performed using electronic equipment DeLaval Cell Counter ® for Total Bacterial Count (TBC), determination of *Staphylococcus* sp. and yeasts and molds were used for Standard Count Agar (PCA), Baird-Parker Agar and Agar Sabourad respectively. To identify bacterial media were tested blood agar enriched with 5% sheep blood and MacConkey Agar and observed the morphological characteristics of the colonies beyond morfotintórias the Gram technique and biochemical tests. Among the positive samples in microbiological examination, isolated *Staphylococcus* sp. (93.54%), followed by *Corynebacterium* sp. (41.93%), Enterobacteriaceae (38.70%), *Streptococcus* sp. (32.25%) and *E. coli* (32.25%). Of *Staphylococcus* sp. obtained coagulase positive (SCP) in 15 samples (48.38%), coagulase-negative *Staphylococcus* (SCN) 22 (67.74%) and *Staphylococcus aureus* samples in 13 samples (16%). The dairy farms visited had no adequate conditions of hygiene for the activity.

Keywords: buffalo milk; quality; food safety

## INTRODUÇÃO

A criação de búfalos no Brasil vem crescendo cerca de 12,7% ao ano, ocupando de forma bastante satisfatória os ambientes pouco favoráveis aos bovinos. O rebanho bubalino brasileiro atinge hoje cerca de 3,5 milhões de animais, sendo que a finalidade principal da criação de búfalos em algumas regiões é a produção leiteira (BERNARDES, 2007).

O Estado do Maranhão tem particularidades a favor da bubalinocultura, principalmente na Baixada Ocidental Maranhense e Médio Mearim: clima propício, abundância de água e um solo que favorece pasto de qualidade. Em 27 municípios dessas duas regiões, concentra-se a maioria do rebanho bubalino do Estado, sendo que 18.589 cabeças estão nos pastos de Viana, município com maior rebanho do estado, segundo dados da Agência de Defesa Agropecuária do Maranhão (AGED). No Brasil a bubalinocultura leiteira é de grande importância em pequenas e médias propriedades rurais, garantindo a produtividade e a permanência sustentável do homem na zona rural (AMARAL & ESCRIVÃO, 2005; NASCIMENTO, 2006; CARVALHO et al., 2007).

De acordo com pesquisas realizadas (DUARTE, 2001; MACEDO et al., 2001; FARIAS et al., 2002; ANDRIGHETTO, 2004; COELHO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2004; SILVA et al., 2004), o leite de búfala apresenta elevado valor nutricional devido aos altos níveis de nutrientes, podendo ser consumido tanto na forma *in natura* como na elaboração de produtos lácteos. A maior vantagem do leite bubalino, em relação ao leite de vaca, é a qualidade nutricional, em função dos teores de proteína (3,91% a 4,55%), gordura (4,1% a 10,4%, média de aproximadamente 7%) e minerais, e por ser mais concentrado, possuir menor teor de água e mais matéria seca, apresenta aproveitamento industrial superior. A produção anual de leite de búfala é de aproximadamente 92 milhões de litros, com média diária de 7,3 litros (BERNARDES, 2007; ROSA et al., 2007).

Mastite configura-se num processo de inflamação da glândula mamária proveniente de trauma ou lesão do úbere, irritação química ou, sobretudo, infecção causada por microorganismos, especialmente por bactérias e possivelmente os fungos e leveduras, as algas e mais raramente, os vírus (LANGONI et al., 1995), sendo acompanhada pela redução de secreção do leite e pelo comprometimento da qualidade do leite produzido (PEREIRA et al., 2001; RIBEIRO et al., 2003; BARRETO et al., 2010). Possui epidemiologia abrangente, etiologia variada e apresenta controle complexo na dependência dos agentes envolvidos e do meio ambiente no qual os animais são criados (LANGONI & FONSECA, 1997). O grau de inflamação pode variar desde a forma subclínica até as várias formas clínicas da doença,

dependendo da gravidade com que o úbere reage à causa da irritação (PHILPOT & NICKERSON, 1991), caracterizando-se por alterações química, física, patológica e bacteriológica do tecido glandular e do leite (LIMA JÚNIOR, 1994).

A inflamação da glândula mamária resulta em redução relevante na quantidade e em mudanças na composição do leite. Para os produtores, isto significa menor retorno financeiro devido à diminuição da produção. Para as indústrias, significa numerosos problemas no processamento, diminuição do rendimento, da qualidade e da estabilidade dos derivados do leite, trazendo grandes impactos econômicos negativos (ANDRADE et al., 2009; PHILPOT & NICKERSON, 1991; PEREIRA et al., 2009), podendo ser considerada como um fator limitante para a cadeia produtiva do leite. Segundo Figueiredo et al. (2010) a qualidade do leite é o fator mais importante para o sucesso de sua industrialização e de seus derivados, pois interessa tanto aos laticínios, gerando um aumento significativo no preço do leite, quanto aos consumidores, que por sua vez, adquirem produtos de melhor qualidade.

O diagnóstico precoce da mastite desempenha papel fundamental na erradicação da doença, sobretudo por sua forma subclínica, que passa despercebida entre os animais do rebanho leiteiro. Os testes podem ser realizados no campo ou laboratório: os de campo são mais simples e podem ser realizados diariamente antes da ordenha, destacando-se a caneca telada e o CMT (*California Mastitis Test*). O CMT é um método indireto, que avalia a quantidade de células somáticas do leite, sob a ação de um detergente aniônico capaz de romper a membrana celular; é um método de triagem barato, de fácil execução e interpretação (RIBEIRO et al., 2008; ANDRADE et al., 2009).

Desempenhando forte influência negativa sobre a qualidade e quantidade do leite, a mastite resulta no aumento na contagem de células somáticas (CCS), constituídas principalmente por células de defesa, bacterianas e descamação do epitélio glandular (MULLER, 2002; ANDRADE et al., 2009; HARTMANN et al., 2009). A qualidade microbiológica do leite é de extrema importância para a produção de derivados. Neste caso, as células somáticas e as bactérias contaminantes têm grande influência sobre as características organolépticas e sobre o tempo de prateleira dos produtos derivados (MACHADO, 2008; ANDRADE et al., 2009).

A Contagem Bacteriana Total (CBT) e Contagem de Células Somáticas (CCS), são parâmetros que dependem da adoção de práticas corretas de manejo, como a limpeza dos equipamentos de ordenha e o controle de mastite (SANTOS & FONSECA, 2007), além de serem critérios de qualidade do leite cru, já que a glândula mamária doente produz leite com composição alterada, o que resulta em leite fluido e produtos lácteos de qualidade reduzida (GIGANTE & COSTA, 2008).

Diferentes etiologias são responsáveis pela ocorrência de mastite, desde agentes biológicos de variada natureza até traumatismos e fatores relacionados ao manejo e à lactação (KRUZE, 1998; SILVA et al., 2004). Entre os agentes bacterianos, os mais comumente isolados são o *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli* (CORRÊA & CORRÊA, 1982; FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004). O *Staphylococcus aureus* tem sido apontado como o principal patógeno responsável pela mastite, o qual produz toxinas contribuindo para a patogênese da mastite e também exerce influência em doenças alimentares, mesmo com leite pasteurizado, devido à produção de enterotoxinas termoestáveis sendo, portanto, a espécie de maior relevância para a indústria leiteira e saúde humana (VIANI & LÁZARO, 2003; ZSCHÖCK et al., 2004). Mota et al. (2012) afirmam que os micro-organismos de origem contagiosa são os mais prevalentes na etiologia da mastite, entre esses, o gênero *Staphylococcus* destaca-se por possuir maior frequência em casos clínicos e subclínicos da doença.

A epidemiologia desta enfermidade está vinculada à tríade: animal (hospedeiro), agente etiológico e meio ambiente, fazendo desta uma enfermidade multifatorial (PRESTES et al., 2002, OLIVEIRA et al., 2007). Os fatores de risco relacionados a esta infecção podem ser individuais ou ambientais. Nos fatores individuais, estão incluídos os mecanismos de defesa do animal e a anatomia do teto e do úbere. Os ambientais estão relacionados com o tipo de clima da região, limpeza das instalações, alimentação e virulência dos micro-organismos (WHIST et al., 2006).

A fase de ordenha constitui um dos pontos críticos de maior relevância para os animais e uma séria ameaça para a qualidade do leite (GERMANO & GERMANO, 2008). Várias medidas devem ser tomadas durante o processo, para minimizar a transmissão de agentes mastitogênicos, e diminuir o número de micro-organismos que podem ser transferidos ao leite, depreciando sua qualidade. A mão do ordenhador, as práticas de higiene e as lesões nos tetos são fatores importantes que expõem a superfície do úbere aos micro-organismos patogênicos, sendo estes transmitidos de animais infectados para não infectados durante o processo de ordenha (AMARAL et al., 2004).

Devido à sua prevalência, a mastite vem recebendo maior atenção por parte dos principais grupos de pesquisa do país. As frequências de mastite clínica e subclínica são parâmetros consagrados na avaliação da sanidade da glândula mamária. Logo, constituem os primeiros a serem considerados para a implantação de um programa de controle de qualidade. Ressalta-se que análises microbiológicas são complementares e indispensáveis em um programa de controle desta enfermidade, por possibilitarem o isolamento e a identificação do seu agente

etiológico (BRADLEY, 2002; PERDESEN et al., 2003). Um dos importantes aspectos avaliados no leite é a qualidade microbiológica. Nesta análise, a sua população microbiana é contada ou estimada e usada como parâmetro para se avaliar a saúde do úbere, bem como os cuidados higiênicos relacionados às etapas de obtenção, transporte e armazenamento do leite.

Os dados encontrados a respeito da mastite bubalina são muito variados, o que é normal considerando-se os diversos fatores que atuam sobre a mesma. Dessa forma, quando se observa a frequência e etiologia da doença informada por diferentes autores nota-se a necessidade de realizar trabalhos que promovam o conhecimento da doença, com vistas à divulgação e adoção de padrões para efetivação do controle de qualidade do leite de búfalas (ANDRIGUETTO, 2004; CARVALHO et al., 2007).

Apesar do valor nutritivo e rendimento industrial do leite de búfalas superarem o leite de vacas e ainda do crescimento da exploração no país, pouco se tem feito para regulamentação de normas de padrão de identidade e qualidade desse leite. Pouco se sabe da frequência de mastite clínica e subclínica em bubalinos no país. No Estado do Maranhão não há estudos sobre a prevalência e etiologia desta enfermidade, e não há um programa de controle de qualidade do leite bubalino apesar das condições satisfatórias que a Região oferece para a bubalinocultura leiteira. Com base no exposto, este estudo teve como objetivo verificar a frequência, contagem de células somáticas e a etiologia da mastite bubalina no Estado do Maranhão com o intuito de auxiliar na implementação de medidas de controle e tratamento dessa enfermidade em rebanhos da Baixada Maranhense.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Características das propriedades e população bubalina**

Visando obter um perfil das condições higiênico-sanitárias das propriedades estudadas foi aplicado um questionário junto aos proprietários contendo 25 perguntas relacionadas à propriedade, à produção de leite, ao manejo de ordenha, à sala de ordenha e ao ordenhador (Apêndice A).

Para o presente estudo foram utilizadas búfalas leiteiras de dez propriedades aleatoriamente amostradas com produção diária de até 50 litros de leite (pequenas propriedades) e produção de 100 a 200 litros (médias propriedades), pertencentes aos municípios de Vitória do Mearim, Viana, Arari, Cajari e Matinha da Região da Baixada, estado do Maranhão. Os rebanhos eram compostos por búfalas primíparas e múltíparas, em período médio de lactação. Em todas as

propriedades a ordenha era realizada manualmente, uma vez ao dia, sendo utilizado o sistema de “balde ao pé”. A população bubalina era constituída por animais da raça Murrah e mestiços de Murrah, criadas em sistema semi-intensivo ou extensivo.

### **Seleção dos animais, Teste da caneca telada e *California Mastitis Test* (CMT)**

Foram submetidas 304 búfalas leiteiras a um exame clínico geral da glândula mamária. Após a lavagem dos tetos com água corrente e secagem com papel toalha foram desprezados os três primeiros jatos de leite, para a realização do teste da caneca telada e detecção de mastite clínica e posteriormente o *California Mastitis Test* (CMT), para a detecção de mastite subclínica. A interpretação foi feita de acordo com classificação de cada quarto mamário em escores de 0 a 4: 0 (negativo); 1 (traços), 2 (1+, fracamente positivo), 3 (2+, positivo), 4 (3+, fortemente positivo) (PHILPOT & NICKERSON, 1991). Amostras de leite procedentes de quartos mamários acometidos por mastite clínica ou subclínica foram coletadas e submetidas à provas microbiológicas. Realizou-se as coletas após a lavagem dos tetos com água e desinfecção com álcool 70%, acondicionando-se aproximadamente 5 mL de leite em vidros de tampa rosqueada previamente esterilizados, individualmente identificados quanto ao número do animal e ao quarto coletado. Em seguida, as amostras foram transportadas em caixas de material isotérmico contendo gelo reutilizável ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Campus São Luís - MA.

### **Análises Laboratoriais**

#### **Contagem de Células Somáticas (CCS), Contagem Bacteriana Total (CBT) e Determinação de *Staphylococcus* sp. e bolores e leveduras**

Para a contagem de células somáticas foi utilizado um contador de Células Somáticas Eletrônico DeLaval Cell Counter® (DCC), conforme recomendação do fabricante. A Contagem Bacteriana Total (CBT) foi realizada pelo plaqueamento em profundidade, onde se utilizou a diluição seriada até  $10^{-3}$ . Adicionou-se 1 mL de cada diluição em placas de Petri e inverteu-se o meio Ágar Padrão para Contagem (PCA) e colocadas em estufa a 35°C/48h. A contagem foi realizada em um contador de colônias e o resultado expresso em UFC/mL de leite (SILVA et al., 2007). Os bolores e leveduras foram determinados adicionando-se, em cada placa de Ágar Sabourad, 1 mL de cada diluição ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ), pelo plaqueamento em



profundidade, e inverteu-se o meio de cultura. Em seguida, colocadas em BOD a 28°C por 5 dias, realizando a contagem através de contagem direta em placas. Os resultados foram expressos em UFC/mL da amostra (SILVA et al., 2007). Para a determinação de *Staphylococcus* sp., inoculou-se 0,1 mL das diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  nas placas de Ágar Baird-Parker (BP) e incubadas a 35 - 37°C/48h. Após a incubação, realizou-se a contagem das colônias típicas, e os resultados foram expressos em UFC/mL.

### **Isolamento e identificação das bactérias**

A semeadura das amostras foi realizada com a utilização em placas de Petri contendo Ágar-sangue (5% de sangue desfibrinado de ovino) e em meio de Ágar MacConkey, as placas foram incubadas a 37°C, e a leitura realizada 24, 48, 72 horas. Procedeu-se à identificação dos micro-organismos isolados conforme suas características coloniais e morfotintoriais, produção de hemólise e repique para meio de caldo cérebro-coração (BHI) e Soja Trypticase (TSA) para realização das provas Taxonômicas por meio de provas bioquímicas segundo a chave identificação proposta por Quinn et al. (1994) e Carter et al. (1990). Após a identificação parcial no Ágar MacConkey, colônias típicas de *E. coli* foram incubadas em tubos contendo Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) e a espécie confirmada nas seguintes provas bioquímicas: teste de citrato, teste de indol, teste VM-VP (vermelho de metila e Voges-Proskauer) (VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992). Para a identificação dos isolados de *Staphylococcus* spp. foram realizadas provas bioquímicas como produção de catalase, coagulase livre e DNase segundo Silva et al. (2007). As provas de produção de acetoina, fermentação da maltose e trealose (anerobiose) e do manitol (aerobiose e anaerobiose) foram realizadas de acordo com Mac Faddin (1980). Os isolados foram classificados em *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus* coagulase positivo (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) de acordo com Baird-Parker (1990).

### **Análise Estatística**

A análise estatística utilizada foi do tipo descritiva, através do cálculo da frequência absoluta e relativa e parâmetros de média e proporção, utilizando tabelas que representam a relação entre os micro-organismos isolados e o número de isolamentos (TANAKA, 2000).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 304 búfalas examinadas neste estudo, 1.204 quartos mamários foram avaliados (seis animais apresentavam tetos atrofiados). Apenas 1 (0,09%) quarto mamário apresentou leve alteração no teste da caneca telada, indicando mastite clínica e 31 (2,57%) quartos mamários apresentaram positividade ao CMT (Tabela 1). Resultado semelhante foi obtido por Kapronezai et al. (2005), ao avaliarem o leite de fêmeas bubalinas pertencentes a rebanhos do Estado de São Paulo, onde obtiveram 1 (0,04%) amostra positiva e 261 (99,6%) amostras negativas no teste da caneca telada, enquanto no CMT, 231 (88,2%) amostras apresentaram reação negativa e 31(11,8%) reação positiva.

**Tabela 1.** Resultado dos testes caneca telada, CMT e isolamento bacteriano em amostras de leite de búfalas da Baixada Maranhense.

	CANECA TELADA		CMT		ISOLAMENTO BACTERIANO	
	N	%	N	%	n	%
<b>POSITIVO</b>	1	0,09	31	2,57	30	96,77
<b>NEGATIVO</b>	1.203	99,91	1.173	97,42	1	3,22
<b>TOTAL</b>	1.204	100	1.204	100	31	100

N: número de quartos mamários avaliados; n: número de amostras de leite analisadas; %: Percentual

Segundo Silva & Silva (1994) as búfalas são mais resistentes às infecções mamárias do que os bovinos, e apresentam diferenças quantitativas e qualitativas na celularidade do leite. e Mesquita et al. (2001) e Carvalho et al. (2007) afirmam que a alta porcentagem de quartos mamários negativos no teste de CMT e a baixa contagem de células somáticas nas amostras de leite bubalino podem estar relacionadas com características anatômicas dos quartos mamários das búfalas, que funcionam como barreira mais eficiente contra as infecções, imunidade da glândula mamária e maior concentração de lactoferrina no leite, substância antibacteriana que compete com as bactérias pelo ferro, tornando-o indisponível e impedindo seu crescimento bacteriano.

Segundo Amaral & Escrivão (2005), estudos bioquímicos anteriores já verificaram que a camada de queratina do ducto papilar presente no canal do teto das búfalas é mais espessa se comparada a outras espécies e apresentam substâncias lipídicas com atividade bactericida e bacteriostática, além de proteínas catiônicas prevenindo a multiplicação e movimentação física das bactérias através do ducto papilar. A epiderme do teto destes animais apresenta maior quantidade do pigmento melanina, conferindo melhor proteção contra irritações e

injúrias ambientais e a musculatura é mais espessa e organizada, mais rica em vasos sanguíneos e fibras nervosas, conferindo maior resistência à infecções (CARVALHO et al., 2007).

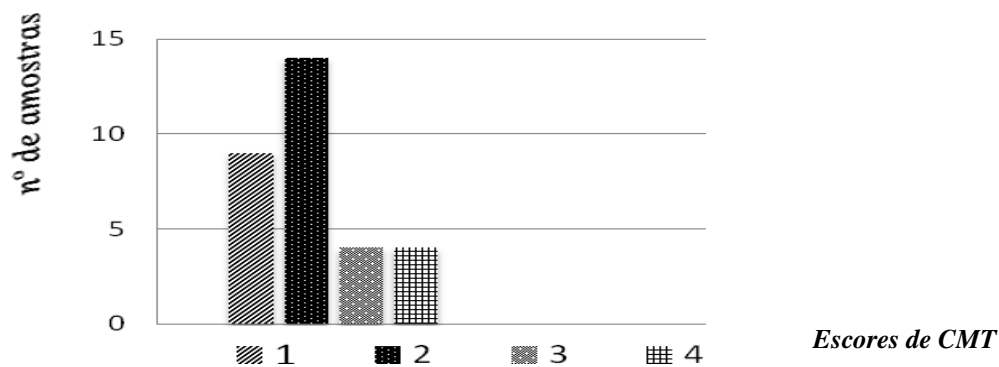
Das 31 amostras de leite analisadas, observou-se que 30 (96,77%) apresentaram crescimento bacteriano, enquanto apenas 1 (3,22%) mostrou-se negativa (Tabela 1). Esta cultura negativa pode estar relacionada, provavelmente, à mastite asséptica ou tratar-se de micro-organismos que exigem condições especiais de meios de cultura para o seu isolamento, tempo de incubação adequado e, também, das características metabólicas, além da baixa concentração e localização intracelular de determinados patógenos e da presença de substâncias inibitórias no leite (LANGONI, 1995; SILVA et al., 2010). Em um estudo realizado por Oliveira et al. (2009) em rebanhos de bovinos leiteiros nos Tabuleiros Costeiros de Sergipe, foi observada uma frequência de 60,8% de amostras positivas submetidas ao microbiológico.

Ainda não há um padrão de qualidade para o leite bubalino. Todavia, a média de CCS neste leite, varia entre 63 e 126,5 mil cél./mL, segundo estudos realizados (CERON-MUÑOZ et al., 2002; JORGE et al., 2005). Tendo como base a Instrução Normativa Nº62 de 2011 do MAPA que trata de padrões microbiológicos para leite bovino, das 31 amostras analisadas neste trabalho, 9 (29,03%) estavam dentro do padrão para contagem de células somáticas (até 400.000 cél./mL) com valores que variaram de 16.000 a 380.000 cél./mL, enquanto 22 (70,97%) apresentaram valores fora do padrão, variando entre 420.000 e 4.141.000 cél./mL. Essa informação é de suma importância para a bubalinocultura leiteira no Brasil já que o leite bubalino é destinado na sua totalidade para a produção de leite e derivados (ANDRIGUETO, 2004) e especialmente para a Região da Baixada Maranhense, servindo como um bom incentivo para programas de controle de qualidade do leite e investimentos na criação de bubalinos no estado.

Amaral (2005) ao analisar o leite de búfalas na Região do Alto do São Francisco-MG encontrou média de 24.000 cél./mL, enquanto neste estudo obteve-se média para a CCS de 976.129 cél./mL. Altas CCS reduzem o rendimento dos queijos e derivados pela redução dos teores de proteína, gordura e sólidos totais, além de provocar a rancidez e alterar o aroma e a textura e representa significativas perdas em produção, devido à formação de tecido cicatricial na região alveolar, em substituição ao epitélio secretor da glândula mamária (BLOWEY & EDMONDSON, 1999; GODKIN, 2000; JORGE et al., 2005).

Em virtude de sua fácil execução e interpretação, o CMT tem sido foco de muitos estudos, nos quais o principal objetivo é determinar o escore que melhor reflita a quantidade de células

somáticas existentes no leite (WINTER & BAUMGARTNER, 1999; JORGE et al., 2005). Foi possível observar que a relação entre o escore 1 e o valor médio obtido foi de 141,11 (x 1000 células/mL), para os escores 2, 3, 4, os valores foram 777,57; 1650,50 e 2875,50 (x 1000 células/mL) respectivamente. Para as diferentes reações do CMT, Silva et al. (2001) obtiveram as médias celulares de 45, 108, 112 (x1000 células/mL) para os escores 1, 2 e 3, respectivamente. O escore de células somáticas facilita a interpretação dos resultados, representando a distribuição das observações como mostra a figura 1.



**Figura 1.** Distribuição de porcentagem de células somáticas em leite de búfalas da Baixada Maranhense, nos diferentes escores em que: **escore 1 (traços)**=16.000 a 380.000 cél./mL; **escore 2 (fracamente positivo)**=420.000 a 1.025.000 cél./mL; **escore 3 (positivo)**=1.322.000 a 1.961.000 cél./mL; **escore 4 (fortemente positivo)**=2.292.000 a 4.141.000 cél. /mL.

A presença de bactérias aeróbias mesófilas foi detectada em 29 (93,5%) amostras. A contagem variou de  $2,0 \times 10$  a  $12 \times 10^4$  UFC/mL. Observa-se na Tabela 2, que apenas 7 (25,58%) amostras apresentaram resultados iguais ou superiores a  $10^4$  UFC/mL para bactérias mesófilas, 24 amostras encontravam-se dentro do padrão estabelecido para leite bovino de  $1 \times 10^4$  UFC/mL. O leite de búfalas da Baixada Maranhense apresentou uma boa qualidade com relação à contagem bacteriana total, o que favorece a produção de derivados do leite. Vianni & LÁZARO (2003) avaliando a qualidade microbiológica do leite *in natura* proveniente de rebanhos bubalinos do estado do Rio de Janeiro, encontraram valor médio de  $7,6 \times 10^4$  UFC/mL para bactérias mesófilas aeróbias provenientes de quartos mamários individuais.

O leite com alta contagem microbiológica altera a coagulação da massa e conseqüentemente a textura de derivados do leite. Essa alteração se reflete diretamente no rendimento da produção, que apresentará onerosa diminuição (TEIXEIRA et al., 2005). A durabilidade e as características organolépticas (como o sabor) do queijo também ficam prejudicados, fazendo com que o consumidor não seja fiel ao produto. Cunha Neto (2003) relata que contagens bacterianas elevadas, acima de  $1,0 \times 10^7$  UFC/mL, podem causar sérios

prejuízos durante o processamento do leite, sobretudo no rendimento de obtenção do queijo tipo *mozzarella*.

**Tabela 2.** Número de amostras positivas de leite de búfala, por faixa de contagem de UFC/mL de Bactérias aeróbias mesófilas, bolores e leveduras e *Staphylococcus* sp., 2013.

Determinações	Faixas de contagens (UFC/mL)							
	≥10		≥10 <sup>2</sup>		≥10 <sup>3</sup>		≥10 <sup>4</sup>	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<b>Bactérias aeróbias mesófilas</b>	2	6,45	9	31,03	11	35,48	7	25,58
<b>Bolores e leveduras</b>	5	16,12	10	32,25	—	—	1	3,22
<b><i>Staphylococcus</i> sp.</b>	7	22,50	7	22,58	10	32,25	5	19,23

UFC = Unidade Formadora de Colônias/ N= número de amostras positivas.

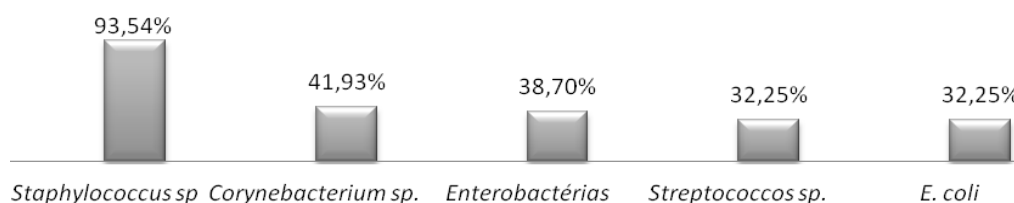
Houve crescimento de bolores e leveduras em 16 do total de 31 amostras analisadas. Em apenas 1 (3,22%) das amostras o valor superou 10<sup>4</sup> UFC/mL como mostra a tabela 2. Os valores obtidos variaram de 1,0 x 10 a 1,9 x 10<sup>4</sup> UFC/mL. Por não existir um limite máximo tolerado na Legislação Brasileira, não se pode dizer que estas amostras não estão aptas a serem consumidas, apenas que as condições de sua obtenção e armazenamento não estiveram adequadas, representando condições higiênico-sanitárias precárias (DEL PRATO, 2001; GERMANO & GERMANO, 2008).

Alguns animais aparentemente sadios apresentam fungos localizados nas tetas que são responsáveis pela causa posterior de mastites subclínicas e disseminação do agente a outros animais no rebanho, atuando como reservatório em potencial, gerando a possibilidade de infecção humana. A grande influência no aparecimento destes fungos colonizando a glândula mamária deve-se também ao ambiente onde se encontram as búfalas, geralmente ambientes úmidos e alagadiços que propiciam o aparecimento destes (OLIVEIRA et al., 2007). Estes micro-organismos nos alimentos podem causar alterações de sabores e odores durante sua multiplicação, ou mesmo alterações de cor em função da produção de pigmentos (BUZI et al., 2009).

Na contagem de *Staphylococcus* sp. variou entre 2,0 x 10 e 2,7 x 10<sup>4</sup> UFC/mL, a RDC n° 12 de 02/01/2001 diz que, para este micro-organismo, o limite de contagem é até 10<sup>3</sup>

UFC/mL do produto. Contudo, para causar intoxicação alimentar este precisa estar acima de  $10^6$  UFC/mL (FRANCO & LANDGRAF, 2008). Mesquita et al., (2001), ao analisarem amostras de leite oriundas da cidade de Pelotas-RS, encontraram contagens maiores que a do presente estudo, onde foi identificado entre  $10^5$  e  $10^6$  UFC/mL, enquanto amostras analisadas por Figueiredo et al., (2010) ultrapassou o valor de  $10^4$  UFC/mL.

As amostras apresentaram contaminação por diversos patógenos da mastite. Quanto a frequência e os agentes etiológicos isolados das amostras positivas ao CMT e caneca telada (Figura 2), verifica-se que dentre os micro-organismos encontrados, prevaleceu os *Staphylococcus* sp. (93,54%), seguido de *Corynebacterium* sp. (41,93%), Enterobactérias (38,70%), *Streptococcus* sp. (32,25%) e *E. coli* (32,25%). Estes achados indicam que a mastite tem etiologia variada e múltipla, corroborando com os resultados encontrados por Kapronezai et al. (2004) em pesquisa realizada no estado de São Paulo, em que a frequência de isolamento de *Corynebacterium* sp. (11,8%) e *Staphylococcus* sp. (7,25%) foi maior do que a dos outros agentes encontrados em leite bubalino. Enquanto Langoni et al. (2001), verificaram que o agente isolado com maior frequência, foi o *Corynebacterium bovis* (31,3%) seguido pelo *Staphylococcus epidermidis* (30,1%) e *Streptococcus agalactiae* (26,5%), se assemelhando aos resultados obtidos por Martins et al. (2010), que em estudo de rebanho bovino da microrregião de Cuiabá-MT, obtiveram os seguintes resultados: *Corynebacterium* spp. (27,60%), *Staphylococcus aureus* (21,51%), *Streptococcus* sp. (0,36%), *E. coli* (0,36%), dentre outros micro-organismos, isolados de manifestações subclínicas.



**Figura 2.** Frequência dos agentes etiológicos isolados das amostras de leite de búfalas, provenientes de propriedades leiteiras da Baixada Maranhense, 2013.

Ressalta-se que os micro-organismos isolados neste trabalho também foram encontrados em amostras que apresentaram baixa Contagem de Células Somáticas, com valores abaixo do limite estabelecido (Tabela 3). Segundo Galiero & Morena (2000), os baixos valores de CCS para leite de búfala quando comparados ao leite bovino não indicam necessariamente a ausência de infecção intramamária, sendo a contagem considerada normal entre 50.000 e 100.000 cél./mL. Carvalho et al. (2007) e Pardo (2007) relataram que o exame microbiológico é a referência mais segura na identificação de quartos acometidos por mastite

subclínica envolvendo micro-organismos. Medeiros et al. (2011) observaram uma maior frequência de *Staphylococcus* coagulase negativo (21,8%) seguido do *Corynebacterium* spp. (16,7%), bactérias Gram negativas (8,8%), *Staphylococcus* coagulase positiva (5,9%) e *Staphylococcus aureus* (1,3%) nas amostras de leite bubalino do estado de Pernambuco, com valores de CCS acima de 400.000 cél./mL e afirmam que ao verificar valores entre 280.000 até 401.000 cél./mL pode-se suspeitar que a amostra seja positiva e solicitar exame microbiológico para confirmar o agente infeccioso envolvido na infecção intramamária e implantar medidas de profilaxia e controle.

**Tabela 3.** Frequência de micro-organismos isolados em leite de búfalas da Baixada Maranhense segundo o resultado na contagem de células somáticas, 2013.

CCS (x 1000 células/mL)	Exame microbiológico															
	Sem Crescimento		<i>Staphylococcus aureus</i>		SCP		SCN		<i>Corynebac- terium sp.</i>		<i>Streptococcus sp.</i>		<i>E. coli</i>		Entero- bactérias	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<b>&gt;400</b>	0	0,00	7	53,84	9	60,00	15	68,18	9	69,23	7	70,00	8	10,00	8	66,66
<b>&lt;400</b>	1	3,22	6	46,15	6	40,00	7	31,81	4	30,76	3	30,00	2	20,00	4	33,33
<b>Total</b>	1	3,22	13	45,16	15	48,38	22	67,74	13	41,93	10	32,25	10	32,25	12	38,70

N= nº de amostras positivas; SCP- *Staphylococcus* coagulase positivo ; SCN- *Staphylococcus* coagulase negativo

Em 29 amostras foi isolado *Staphylococcus* sp., sendo o micro-organismo encontrado com maior frequência neste trabalho, confirmando achados anteriores. *Staphylococcus* coagulase positivo (SCP) foi encontrado em 15 amostras (48,38%), enquanto *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) foi isolado em 22 (67,74%) amostras e *Staphylococcus aureus* em 13 amostras, correspondendo a 45,16% do total. Em estudo realizado por Oliveira et al. (2004), *Staphylococcus* spp. foi isolado em 76 amostras de leite bubalino, correspondendo a 55% do total de amostras cultivadas. Destes, 18 (13%) foram positivos na prova de coagulase. Estes resultados também se assemelham à pesquisa realizada em leite de outras espécies. Analisando o leite bovino de propriedades leiteiras de São Luis-MA, Penha et al. (2008) isolou 35 (14,46%) cepas do grupo *Staphylococcus* coagulase positivo, 65 (26,86%) *Staphylococcus* coagulase negativo e 35 (14,46%) *S. aureus*. Em pesquisa realizada por Silva et al. (2010), a bactéria isolada com maior frequência nas amostras de leite de ovelhas com mastite clínica e subclínica foi o *Staphylococcus* coagulase negativo. Batavani et al. (2003)

estudaram 209 amostras de leite e também relataram o *Staphylococcus* coagulase negativo como a bactéria mais prevalente com taxa de 41%.

O predomínio do *Staphylococcus* sp. como agente causal de mastite indica a ocorrência de falhas de higiene durante a ordenha e alerta para o risco de animais portadores de mastites atuarem como fonte de infecção para o rebanho. As bactérias do gênero *Staphylococcus* spp., continuam sendo os agentes mais frequentemente isolados em rebanhos leiteiros, representando grande importância epidemiológica e clínica nas mastites associadas à falhas no manejo de ordenha, na prevenção e diagnóstico da mastite contagiosa dos rebanhos, em que a transmissão dos agentes causadores é predominantemente causada durante a ordenha, uma vez que o reservatório do gênero *Staphylococcus* é a glândula mamária (LONGO et al., 1994, COSTA, 1995; CHAPAVAL & PIEKARSKI, 2000).

O *S. aureus* é um agente patogênico bastante comum e também responsável por surtos de intoxicação alimentar. Suas peculiaridades quanto ao seu habitat tornam-no largamente distribuído na natureza e facilmente transmissível aos alimentos por manipuladores, na maioria, portadores assintomáticos e pelos animais, principalmente vacas leiteiras com mastite (STAMFORD et al., 2006). Amostras de enterotoxinas produzidas por *S. aureus* têm sido isoladas de leite em pó, cru e pasteurizado, iogurte caseiro, achocolatados e sorvetes, bem como de outros subprodutos lácteos. A fonte de contaminação pode ser tanto do leite proveniente de vacas com mastite, como dos manipuladores envolvidos. A produção de enterotoxinas por esses micro-organismos ocorre entre 10 e 46°C e sua elevada resistência térmica favorece sua sobrevivência no leite submetido a tratamentos térmicos, como a pasteurização (SÁ et al., 2004; STAMFORD et al., 2006).

Alguns investigadores consideram os *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) como patógenos secundários no úbere, mas a importância destes nas infecções intramamárias são ainda um tema de debate já que, por outro lado, outros trabalhos atribuem-lhe grande importância na etiologia da mastite subclínica ou clínica e no aumento de células somáticas das vacas afetadas. Mota et al. (2012) afirmam que os SCN tornaram-se os isolados mais comuns nos casos de mastite bovina em muitos países e, portanto, poderiam ser considerados como patógenos emergentes. Muitas das infecções intramamárias causadas por SCN curam espontaneamente e a prevalência decresce à medida que avança a lactação. Apesar de geralmente as infecções por SCN costumarem ser leves ou do tipo subclínico, demonstrou-se também que podem causar processos mais graves e persistentes provocando um aumento na contagem de células somáticas e uma diminuição na qualidade e produção do leite devido ao dano causado no tecido mamário (SAWANT et al., 2008).



A produção de enterotoxinas não está restrita à espécie *S. aureus*, estudos evidenciaram espécie coagulase negativo capazes de produzir toxinas em condições laboratoriais. Segundo revisão realizada por Fagundes & Oliveira (2004) as enterotoxinas produzidas por *S. aureus* pertencem a uma grande família de toxinas pirogênicas produzidas tanto por bactérias do gênero *Staphylococcus* sp. como *Streptococcus* sp., estas toxinas podem causar choque tóxico e estão comumente associadas à diversas formas de alergias e doenças autoimunes. As toxinas são responsáveis por gastroenterite importantes, ocasionando náuseas, vômitos, contrações abdominais, diarreia, sudorese e cefaléia. A intoxicação geralmente não é letal mais pode evoluir para quadros mais severos, dependendo da susceptibilidade do indivíduo ao ingerir o leite contendo estas toxinas, constituindo um sério problema de saúde pública (BALABAN & RASOOLY, 2000).

Em geral, *Corynebacterium* sp. é considerado um patógeno secundário que infecta principalmente vacas durante a lactação, sem apresentar sinais clínicos e com aumentos moderados na CCS, variando de 200.000 a 400.000 células/mL (ELVINGER & NATZKE, 1992; RADOSTITS et al., 1994), sendo considerado um reflexo da ausência de higiene, particularmente na desinfecção dos tetos. Oliveira et al. (2005) afirmam que esta bactéria é colonizadora oportunista da glândula mamária bubalina, não descartando-se entretanto o poder patogênico da mesma, pois o mesmo agente em humanos ocasiona quadros de bacteremias, o que não impossibilita a ocorrência de mastites de caráter severo na espécie em questão.

A presença de *Escherichia coli* foi observada em 10 (32,25%) amostras de leite e sua presença tem significado importante, por ser um indicador de contaminação fecal e eventual presença de outros enteropatógenos, além disso, existem linhagens patogênicas para homens e animais. As enterobactérias, como *E. coli*, são micro-organismos mesófilos que estão presentes devido à falta de higiene. Apesar de outras enterobactérias encontradas neste trabalho não terem sido classificadas, é preocupante o índice relatado (38,70%), como mostra a tabela 3, uma vez que são considerados agentes ambientais e podem causar mastites agudas. Estes resultados são condizentes com as condições observadas nas propriedades visitadas, uma vez que as mesmas geralmente não adotavam medidas higiênicas corretas no período pré e pós ordenha. Portanto, índice observado destes micro-organismos justifica-se pelas precárias condições de higiene das instalações e ordenha nas propriedades estudadas. Microbiologicamente, a qualidade do leite de búfala está intimamente relacionada aos hábitos do animal e ao manejo de ordenha. Um fator de relevância é o comportamento do animal de

imersão em água à procura de conforto térmico. Tal hábito dificulta a higienização do úbere da búfala (TEIXEIRA et al., 2005).

Analisando as condições higiênico-sanitárias das propriedades visitadas pode-se observar que a limpeza das instalações era realizada em todas as propriedades; no entanto, em apenas três propriedades era realizada a limpeza e desinfecção das instalações da sala de ordenha com a utilização de água, sabão e sanitizante, estas possuíam sala de ordenha arejada com boa ventilação, com corredores adequados para circulação dos animais onde o piso é em alvenaria facilitando assim a desinfecção.

Tanto a limpeza quanto a desinfecção são procedimentos essenciais que garantem maior controle do ambiente em relação às fontes de contaminação, sendo que a não realização de qualquer um deles poderá refletir na qualidade do leite. Segundo Nascimento (2006), o local de ordenha deve ser mantido limpo e seco, devendo a limpeza ser realizada no final de cada ordenha, de modo que a ventilação natural seque o local. Na limpeza é fundamental a remoção das fezes para reduzir a proliferação de moscas e parasitas. Em apenas uma propriedade era realizado o controle de moscas e em duas observou-se acúmulo de dejetos no local de ordenha. Os utensílios e equipamentos de ordenha devem ser limpos e adequadamente desinfetados após cada ordenha (SPARNAMBERG et al., 2009), o que não foi observado nas propriedades visitadas, esta condição justifica as maiores contagens de bactérias aeróbias mesófilas encontradas neste trabalho, uma vez que a contagem bacteriana total do leite pode aumentar significativamente quando em contato com equipamentos nos quais a limpeza e a sanitização são deficientes, pois os micro-organismos proliferam nos resíduos de leite, presentes em recipientes, em borrachas, em junções e em qualquer outro local onde ocorra acúmulo destes resíduos.

Quanto à limpeza do úbere e dos tetos, constatou-se que nenhuma das propriedades utiliza soluções detergentes adequadas, além disso, fazem uso de água de açude e poço artesiano para lavagem, ou seja, água não tratada e não têm nenhum tipo de controle da sua qualidade microbiológica. É fundamental que a água usada para estes fins seja potável, com baixa contaminação por coliformes e outros gêneros bacterianos (GUERREIRO et al., 2005). Em apenas uma propriedade é realizado o pré e o pós-*dipping*. A secagem do úbere e dos tetos dos animais é realizada, em sua maioria, com pano de algodão, e em alguns casos com papel toalha. Sempre antes do início da ordenha, os tetos devem ser lavados com água corrente em abundância, seguindo-se da secagem com papel descartável (BRASIL, 2000).

Segundo Nascimento (2006), a desinfecção dos tetos é fundamental, antes e depois da ordenha. Antes da ordenha é importante para potencializar o efeito redutor da carga

microbiana; após a ordenha, o procedimento também é extremamente importante, pois o esfíncter do teto permanece aberto algum tempo, representando um importante foco para micro-organismos contaminantes entrarem, capazes de iniciar um processo inflamatório local, podendo gerar o aparecimento de mastite. A realização do processo de pós-*dipping* minimiza esse risco, pois o desinfetante em contato com o teto impede o aparecimento de contaminações locais. Outro ponto fundamental é a correta higiene do ordenhador, pois as mãos atuam como veículo transmissor de micro-organismos que podem contaminar o úbere, o leite e todo o material utilizado.

Em apenas uma propriedade é realizado o teste da caneca telada e CMT, Brito et al. (1997) consideram o uso regular destes testes como importante ferramenta para melhoria do estado sanitário do rebanho, se usado para orientar a adoção de medidas para o controle da mastite, ou associado a práticas adequadas de manejo e higiene, e podem ter um papel útil no controle efetivo em programas leiteiros, como teste de triagem para detecção de vacas com mastite subclínica (DINGWELL et al., 2003). A identificação da mastite subclínica nos estágios iniciais permite um controle mais efetivo, e reduz o impacto econômico devido às perdas por descarte do leite contaminado ou com a utilização de medicamentos (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2008).

Somente em duas das dez propriedades avaliadas, o armazenamento do leite após a ordenha é realizado em tanques de refrigeração. A refrigeração do leite, logo após a ordenha, visa diminuir a multiplicação microbiana; sua eficiência, porém é maximizada, caso associado a outros fatores, especialmente de ordem higiênica (FONSECA & SANTOS, 2000).

Vale ressaltar que a produção leiteira requer do produtor mão de obra qualificada e uma melhor escolha de animais para seu rebanho, pois atualmente apenas produzir não é mais suficiente, para fechar a dura concorrência mercadológica, onde consumidores exercem papel principal no mercado (TAVOLARO et al., 2006). Devido a este fator, investir em qualidade tornou-se um papel fundamental para os produtores e indústrias e também para a saúde humana. Nas propriedades visitadas o leite coletado era comercializado localmente e utilizado para o próprio consumo de forma *in natura* ou na produção de queijo, daí a grande necessidade de se obter uma matéria-prima de qualidade.

## CONCLUSÕES

- A mastite está presente em búfalas das propriedades estudadas, necessitando contudo, de estudos futuros, visando evitar as perdas econômicas causadas por essa enfermidade;

- O estudo demonstrou que os *Staphylococcus* spp. foram os micro-organismos mais frequentemente isolados de mastite bubalina na região estudada. Dessa forma, medidas de higiene e prevenção, com manejo correto de pré e pós - *dipping* tornam-se necessárias, uma vez que, estes micro-organismos são os maiores causadores de mastite em diversos rebanhos leiteiros e as propriedades apresentaram condições de higiene insatisfatórias na ordenha.

## REFERÊNCIAS

- AMARAL, F. R.; ESCRIVÃO, S. C. Aspectos relacionados à búfala leiteira. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 29, n.2, p. 111-117, abril/jun. 2005.
- AMARAL, F. R. Fatores que interferem na contagem de células somáticas e constituintes do leite de búfalas. 2005. 46p. **Dissertação de Mestrado**. Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- AMARAL, L. A. A.; GOMES, J. L.; SILVA, M. Avaliação da eficiência da desinfecção de teteiras e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24. n. 4. p.173-177, out/dez, 2004.
- ANDRADE, U. V. C.; HARTMANN, W.; MASSON, M. L. Isolamento microbiológico, Contagem de Células Somáticas e Contagem Bacteriana Total em amostras de leite. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, SP, v.25, n.3, 129-135, 2009.
- ANDRIGUETTO, C. Efeito da monensina sódica na produção, composição do leite e escore de condição corporal de búfalas Murrah no início da lactação. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2004. 37 p. **Dissertação** (Mestrado em Zootecnia)- Universidade Estadual Paulista, 2004.
- BAIRD-PARKER, A. C. 1990. The *Staphylococci*: An introduction. **Journal of Applied Bacteriology**. 19: 15-85.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins: a review. **Internal Journal of Food Microbiology**, v. 61, p.1-10, 2000.
- BARRETO, M. L. J.; RANGEL, A. H. N.; ARAÚJO, V. M.; BEZERRA, K. C.; MEDEIROS, H. R.; OLIVEIRA, J. P. F.; ANDRADE, K. D. Análise de correlação entre a contagem de células somáticas (CCS), a produção, o teor de gordura, proteína e extrato seco total do leite bubalino. **Revista Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v.06, n. 02 abril/junho, 2010. p.47 – 53.
- BATAVANI, R. A.; MORTAZ, E.; FALAHIAN, K.; DAWOODI, M. A. Study on frequency, etiology and some enzymatic activities of subclinical ovine mastitis in Urmia, Iran. **Small Rum. Res.**, v. 50, p.45-50, 2003.
- BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 293-298, 2007.
- BLOWEY, R., EDMONDSON, P. **Control de la mastitis**. Zaragoza: Acribia, 1999.
- BRADLEY, A. J. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. **The Veterinary Journal**, v.164, p.116-128.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal RIISPOA**. Resolução n. 7 de 28 de novembro de 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 31 dez. de 2011. Seção 1, p. 6.

BRITO, J. R. F.; CALDEIRA, G. A. V.; VERNEQUE, R. S.; BRITO, M. A. V. P. Sensibilidade e especificidade do “*Califórnia Mastite Test*” como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação a contagem de células somáticas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.2, p.49-53, 1997.

BUZI K, A.; PINTO, J. P. de A. N.; RAMOS, P. R. R.; BIOND, G. F. Análise microbiológica e caracterização eletroforética do queijo mussarela elaborado a partir de leite de búfala. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.1, p.07-11, Jan./Mar.2009.

CARTER, G. R.; COLE JUNIOR, J. R. **Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology**. 5.ed. San Diego, Califórnia: Academic Press, 1990. p. 201-209.

CARVALHO, L. B.; AMARAL, F. R.; BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. C.; BRITO, J. R. F.; LEITE, R. C. Contagem de células somáticas e isolamento de agentes causadores de mastite em búfalas (*Bubalus bubalis*), **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 1, p. 242-245, 2007.

CERON-MUÑOZ, M.; TONHATI, H.; DUARTE, J. M. C. Contagem de células somáticas e produção de leite em bubalinos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.57, n.324, p.8-10, mai-jun. 2002.

CHAPAVAL, L.; PIEKARSKI, P. R. B. **Leite de Qualidade**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2000. 195p.

COELHO, K. O.; MACHADO, P. F.; COLDEBELLA, A.; CASSOLI, L. D.; CORASSIN, C. H. Determinação do perfil físico-químico de amostras de leite de búfalas, por meio de analisadores automatizados. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n. 3, p. 167-170, jul./set. 2004.

CORRÊA, W. M. C.; CORRÊA, C. N. M. **Mastites**. In: *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos*. São Paulo: Varela, 1982. cap. 10, p.123-134.

COSTA, E. O. Estudo epidemiológico da mastite clínica bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, São Paulo, v. 17, n. 4, p.21-26, 1995.

CUNHA NETO, O. C. Avaliação físico-química e sensorial do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura. **Dissertação - Mestrado**. 71p. Universidade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de São Paulo. Pirassununga. 2003.

DEL PRATO, O. S. **Le paste filate**. In: *Trattato di Tecnologia Casearia*. Itália: Calderinie da gricole, 2001. Cap 17, p.588-641.

DINGWELL, R. T.; LESLIE, K. E.; SCHUKKEN, Y. H.; SARGEANT, J. M.; TIMMS, L. L. Evaluation of the California mastitis test to detect an intramammary infection with a major pathogen in early lactation dairy cows. **Canadian Veterinary Journal**, v.44, p.413-416, 2003.

DUARTE, J. M. C. Efeitos ambientais sobre a produção no dia do controle e características físico-químicas do leite em um rebanho bubalino no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 56, n. 5, p. 16-19,2001.

ELVINGER, F.; NATZKE, R. P. Elements of mastitis control. In: VAN HORN, H. H.; WILCOX, C. J. **Large dairy herd management**. Champaign: American Dairy Science Association, 1992. p.440-447.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.3, n.4, p.1315-1320, jul./ago.2004.

FARIAS, M. H. TONHATI, H.; CERÓN MUÑOZ, M; DUARTE, J. M.; VASCONCELOS, B. F. Características físico-químicas do leite de búfalas ao longo da lactação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 57, n. 324, p. 3-7, 2002.

FIGUEIREDO, E. L.; JUNIOR, J. B. L.; TORO, M. J. U. Caracterização físico-química e microbiológica do leite de búfala “*in natura*” produzido no estado do Pará. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. v. 04, n. 01. P.19-28, 2010.

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

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microrganismos Indicadores. In: **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. Cap. 6. p 93 – 107.

GALIERO, G.; MORENA, C. The meaning of the somatic cell count in buffalo milk. **Bubalus bubalis**, Roma, v.1, n.1, p.26-27, 2000.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 2ed. São Paulo: Varela, 2008. 649 p.

GUERREIRO, P. K.; FAGUNDES, F.G; ANTUNES, N. L.. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Rev. Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 216-222, jan./fev. 2005.

GODKIN, A. Qualidade do leite ao redor do mundo: O papel da CCS. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 2., 2000, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2000. v.2, p.9-16.

GIGANTE, M. L.; COSTA, M. R. **Influência das Células Somáticas nas Propriedades Tecnológicas do Leite e Derivados**, III Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, Recife, CCS Gráfica e Editora, 2008, 373 p.

JORGE A. M.; ANDRIGUETO, C.; STRAZZA, R. B.; CORREA, R. C.; KASBURGO, D. G.; PICCININ, A.; VICTÓRIA, C.; DOMINGUES, P. F. Correlação entre o *California Mastist Test* (CMT) e a Contagem de Células Somáticas (CCS) do leite de Búfalas Murrah. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, p. 2039-2045, 2005.

HARTMANN, W. Características físico-químicas, microbiológicas, de manejo e higiene na produção de leite bovino na região oeste do Paraná: ocorrência de *Listeria monocytogenes*, Curitiba, PR,2009. **Tese de Doutorado**. Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, 2009.

JORGE, A M.; ANDRIGUETTO, C.; STRAZZA, M. A. B; CORREA, R. de C.; KASBURGO, D. G.; PICCININ, A.; VICTÓRIA, C.; DOMINGUES, P. F. Correlação entre *Califórnia Mastitis Test* (CMT) e a contagem de células somáticas no leite de búfalas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.34, n.6, p.2039-2045, 2005.

KAPRONEZAI, J. Estudo de provas microbiológicas e celulares em amostras de leite provenientes de fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) no Estado de São Paulo. 2004. 82f. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

KAPRONEZAI, J., MELVILLE, P., BENITES, N. R. Análise microbiológica, Teste de Tamis e *Califórnia Mastitis Test* realizados em amostras de leite de fêmeas bubalinas pertencentes a rebanhos do estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.2, p.183-187, abr./jun., 2005.

KRUZE, J. La rutina de ordeño y su rol en los programas de control de mastitis bovina. **Archivos de Medicina Veterinária**, v.30, n.2, p.7-16, 1998.

LANGONI, H. Complexidade etiológica na mastite bovina. In: Encontro de Pesquisadores em Mastites, IIL, 1999. Botucatu, SP. **Anais...** Botucatu, p.3-18.

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

LANGONI, H.; FONSECA, P. H. P. Participação da *Listeria monocytogenes* na mastite bovina, importância para a saúde pública. **Higiene alimentar**, v.2, n.50, p. 36-38, 1997.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; MOLERO FILHO, J. R.; BALDINI, S. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite subclínica em búfalos (*bubalus bubalis*). **ARS Veterinaria**, 17(3):213-217, 2001.

LÁU, H.D. 1994. **Important economic diseases in buffaloes**. Proc. World Buffalo Congress, São Paulo, SP, p.209-220.

LIMA JÚNIOR, A. D. et al. Estudo comparativo entre algumas características físico-químicas, celulares e bacteriológicas do leite de cabras reagentes e negativas ao *Califórnia Mastitis Test*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.46, n.3, p. 290-300, 1994.

LONGO, F., BEGUIN, J. C., CONSALVI, P. J., DELTOR, J. C. Quel quês donnés épidémiologiques sur les mammites subcliniques de lavachelaitière. **Revue Médecine Veterinaire**. v.145, n.1, p.43-47, 1994.

MAC FADDIN, J. F. **Biochemical test for identification of medical bacteria**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980. 527p.

MACEDO, M. P.; WECHSLER, F. S.; RAMOS, A. A.; AMARAL, J. B.; SOUZA, J. C.; RESENDE, F. D.; OLIVEIRA, J. V. Composição físico-química e produção de leite de búfalas da raça mediterrâneo no oeste do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia (suplemento)**, v. 30, n. 3, p. 1084-1088, 2001.

MACHADO, P. F. **Pagamento do Leite por Qualidade**, In: III Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, Recife, CCS Gráfica e Editora, 2008, 373 p.

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

MEDEIROS, E. S.; BARBOSA, S. B. P.; JATOBÁ, R. B.; AZEVEDO, S. S.; JUNIOR, J. W. P.; SAUKAS, T. N.; ALBURQUERQUE, P. P. F.; MOTA, R. A. Perfil da contagem de células somáticas na infecção intramamária em búfalas na Região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.31, n.3, p.219-223, março 2011.

MESQUITA, A. J.; TANEZINI, C. A.; FONTES, I. F. **Qualidade físico-química e microbiológica do leite cru bubalino**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2001. 77 p.

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

MÜLLER, E. E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, 2. **Anais...**, p.206-217. Maringá, 2002.

NASCIMENTO, F. **Recomendações básicas para a aplicação das boas práticas agropecuárias e de fabricação na agricultura familiar**- Programa de Agroindustrialização da Agricultura Familiar. Brasília-DF, Embrapa Informação Tecnológica, 2006.

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

OLIVEIRA, A. A. F.; ROCHA, N. S.; LOPES, C. A. M.; SÁ, M. E. P. Isolamento de *Corynebacterium aquaticum* em leite bubalino. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci**, São Paulo, v. 42, n. 4, p.259-261, 2005.

OLIVEIRA, A. A. S.; LOPES, C.; JÚNIOR J. P.; MOTA, R. A; SILVA, L. B. G. S.; ROCHA, N. S.; WANDERLEY, G. Mastite subclínica bubalina por *Aspergillus fumigatus*. **Medicina Veterinária**, Recife, v.1, n.2, p.73-77, jul-dez, 2007.

OLIVEIRA, M. V. V.; MOTA, R. A.; OLIVEIRA, A. A. F.; MEIRELLES, F. S.; SILVA, F. F. Utilização do *whiteside* modificado e *Califórnia mastitis test* no Diagnóstico da mastite subclínica em búfalas e sua relação com o Exame microbiológico. **Ciência Animal**, v.14, n.1, p.39-45, 2004.

PARDO R. B. Conteúdo celular do leite bubalino proveniente de quartos mamários sadios e portadores de mastite. **Tese de doutorado**, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP. 80p, 2007.

PEDERSEN L. H., AALBAEK B., RONTVED C. M., INGVARTSEN K. L., SORENSEN N.S., HEEGAARD P. M. & JENSEN H.E. Early pathogenesis and inflammatory response in experimental bovine mastitis due to *Streptococcus uberis*. **Journal of Comparative Pathology**, v.128, p.156- 164, 2003.

PENHA, D.A B; COSTA, F. N.; NETO, M. V.; OLIVEIRA, R. A. Mastite bovina na Ilha de São Luis, MA: frequência, etiologia e perfil de sensibilidade de bactérias aos antimicrobianos. 2008. 98 f. **Dissertação** – Mestrado em Ciências Veterinárias), São Luis-MA.

PEREIRA, A.V.; RODRIGUES, O. G.; LIMA, E. Q.; OLIVEIRA, K. A.; MOTA, R. A.; MEDEIROS, E. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extrato de Jurema preta (*Mimosa tenuiflora*) e



antibióticos sintéticos utilizados no tratamento de mastite em bubalinos. **Revista de Biologia e farmácia**. v.3, n.1, 2009.

PEREIRA, A. R.; MACHADO, P. F.; SARRIES, G. A. Contagem de células somáticas e características produtivas de vacas da raça holandesa em lactação. **Scientia Agrícola**, v.58, n.4, p. 649-654, 2001.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S. C. **Mastitis: Counter Attack**. Naperville: Babson Bros, 1991. 150p.

PRESTES D. S.; FILAPPI A.; CECIM, M. Susceptibilidade à Mastite, fatores que a influenciam: uma revisão. **Revista FZVA**, Uruguaiana, v.9, n.1, p.118-132, 2002.

QUINN, P. J.; CARTER, M.; MARKEY, B.; CARTER, G. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe Publishing, 1994. 648p.

RADOSTITS, O. M.; LESLIE, K. E.; FETROW, J. **Herd health: food, animal, production, medicine**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1994. 629 p.

RIBEIRO JÚNIOR, E.; SILVA, M. H; VIEGAS, S. A. A ; RAMALHO, E. J.; RIBEIRO, M. D.; OLIVEIRA, S. F. C. *California Mastitis Test* (CMT) e *whiteside* como métodos de diagnóstico indireto da mastite subclínica. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.9, n.4, p. 680-686, out/dez, 2008.

RIBEIRO, M. E. R.; PETRINI, L. A.; AITA, M. F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF JR, W.; GOMES, J. F.; SCHRAMM, R. C.; MARTINS, P. R.; BARBOSA, R. S. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região Sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 9, n. 3, p. 287-290, 2003.

ROSA, B. R. T.; FERREIRA, M. M. G.; AVANTE, M. L.; ZANGIROLAMI FILHO, D.; MARTINS, I. S. **Introdução de búfalos no Brasil e sua aptidão leiteira**. 2007. Disponível em: <<http://www.revista.inf.br/veterinaria08/revisao/08.pdf>> Acesso em: 05 de dezembro de 2012.

SÁ, M. E. P.; CUNHA, M. L. R. S.; ELIAS, A. O.; VICTÓRIA, C.; LANGONI, H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal Veterinary Animal Science**, v.41, n.5, 2004.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**, Barueri, Editora Manole, 2007, 314 p.

SAWANT, B. E. GILLESPIE, S. P. OLIVER, Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine Milk. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.1, p.46-48, 2008.

SILVA, E. R.; PEREIRA, A. R.; MACHADO, P. M. Associação entre o *California Mastitis Test* e a Contagem de Células Somáticas na avaliação da saúde da glândula mamáriacaprina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.1, p.46-48, 2001.

SILVA, N.; SILVEIRA, J. A. S.; PINHEIRO, C. P.; SOUSA, M. G. S.; CARLOS MAGNO C. OLIVEIRA, C. M.; MENDONÇA, C. L.; DUARTE, M. D.; BARBOSA, J. D. Etiologia e perfil de sensibilidade de bactérias isoladas de ovelhas com mastite na região nordeste do estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n. 12, p.1043-1048, 2010.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C. A., SILVEIRA, N. F. A., TANIWAKI, M. H., SANTOS, R. F. S., GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela. 536 p, 2007.

SILVA, L. A. F.; FIORAVANTI, M. C. S.; TRINDADE, B. R. Enfermidades digitais em vacas de aptidão leiteira: associação com mastiteclínica, metrites e aspectos epidemiológico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, n.4, p.217-222, out./dez.2004.

SILVA, I. D.; SILVA, K.F.S.T. Total and differential cell counts in buffalo (*Bubalus bubalis*) milk. **Buffalo J.**, v.10, n.2,p.133-137, 1994.

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

STAMFORD, T.L.M.; SILVA, C.G.M.; MOTA, R.A.; CUNHA NETO, A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.41-45, 2006.

TANAKA, M. **Estatística**. São Paulo: Markron books, 2000.

TAVOLARO, P.; OLIVEIRA, C. A. F.; LEFÈVRE, F. Avaliação do conhecimento em práticas de higiene: uma abordagem qualitativa. **Rev. Interface: Botucatu**. v.10. n. 19. jan/jun, 2006.

TEIXEIRA, L. V., BASTIANETTO, E.;OLIVEIRA, D. A. Leite de búfala na indústria de produtos lácteos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n.2, p.96-100, abril/jun. 2005.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of food**, 3ed. Washington, DC: American Public Health Association (APHA), 1992. p.87.

VIANNI, M. C. E., LÁZARO, N. S. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos em amostras de cocos Gram-positivos, catalase negativos, isoladas de mastite subclínica bubalina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.23, n.2, Rio de Janeiro, Abril/junho, 2003.

ZSCHÖCK, M.; RIBE, K.; SOMMERHÄUSER, J. Occurrence and clonal relatedness of *seclst*-gene positive *Staphylococcus aureus*isolated of quartermilk samples of cows suffering from mastitis. **Letters in Applied Microbiology**, United Kingdon, v.38, p.493-498, 2004.

WINTER, P.; BAUMGARTNER, W. Evaluation of CMT reactions in goat milk.**Deutsche Tierarztl. Wochensche**, v.106, n.1, p.30-34, 1999.

WHIST A. C., OSTERAS O.; SOLVEROD, L. Clinical mastitis in norwegian herds after a combined selective dry-cow therapy and teat-dipping trial. **Journal Dairy Science**. v.89, p.4649-4659, 2006.

### **3. ARTIGO II**

*Conforme as normas de publicação da  
Revista Pesquisa Veterinária Brasileira*

**PESQUISA DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM AMOSTRAS DE LEITE E SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE CEPAS DE *Staphylococcus* spp. ISOLADOS DE CASOS DE MASTITE CLÍNICA E SUBCLÍNICA EM BÚFALAS DA BAIXADA MARANHENSE**

Santos, N. A. F<sup>1</sup>.; Costa, F. N.<sup>2</sup> ; Silva, F. D. S<sup>3</sup>.

**RESUMO**

Este trabalho teve por objetivo pesquisar resíduos de antibióticos em amostras de leite e conhecer a susceptibilidade antimicrobiana “*in vitro*” de cepas de *Staphylococcus* spp. isolados em amostras de leite de búfalas com mastite clínica e subclínica, em 10 propriedades leiteiras da Baixada Maranhense. A pesquisa de resíduo de antibióticos foi realizada em 40 amostras “pool” de leite, utilizando-se os kits comerciais Eclipse 50, Delvotest SP-NT e Twinsensor-BT 20), sendo realizadas de acordo com as recomendações do fabricante. Para o teste de susceptibilidade antimicrobiana, foram utilizadas 112 cepas de *Staphylococcus*, sendo 72 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, 23 cepas de *Staphylococcus* coagulase positivo (SCP) e 17 *Staphylococcus aureus* utilizando a técnica de difusão em discos. Das 40 amostras submetidas a pesquisa de resíduos de antimicrobianos, seis apresentaram positividade nos três testes utilizados, indicando risco para a saúde pública. Os antimicrobianos com maior eficácia contra os *Staphylococcus* coagulase positivo foram cloranfenicol e norfloxacin com 100% de sensibilidade, e aos *Staphylococcus* coagulase negativo foram Norfloxacin (91,6%), gentamicina e norfloxacin com 86,1%. Já em relação a *Staphylococcus aureus*, 100% dos isolados mostraram-se sensíveis a novobiocina e 94,1% a norfloxacin. **TERMOS DE INDEXAÇÃO:** resistência bacteriana, leite “*in natura*”, saúde pública

SEARCH FOR WASTE OF ANTIMICROBIAL IN SAMPLES OF MILK AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF THE STRAINS *Staphylococcus* spp. ISOLATED CASES OF CLINICAL MASTITIS AND SUBCLINICAL BUFFALOES IN THE BAIXADA MARANHENSE

**ABSTRACT**

This work aimed to investigate antibiotic residues in milk samples and know the susceptibility “*in vitro*” of *Staphylococcus* spp. isolated in samples of buffalo milk with clinical and subclinical mastitis in 10 dairy herds in low lands. The search was performed antibiotics residue in 40 samples “pool” of milk, using commercial kits Eclipse 50, Delvotest SP-NT and Twinsensor BT 20) being performed according to the manufacturer's recommendations. For antimicrobial susceptibility testing, we used 112 strains of *Staphylococcus aureus*, 72 coagulase-negative *Staphylococcal* strains, 23 strains of coagulase positive (SCP) and 17 *Staphylococcus aureus* using the disc diffusion technique. Of the 40 samples examined for the presence of antimicrobial residues, six were positive in the three tests used, indicating the risk to public health. Antimicrobials with greater efficacy against *Staphylococcus* coagulase positive were chloramphenicol and norfloxacin with 100% sensitivity, and norfloxacin were coagulase negative *Staphylococcus* (91.6%), gentamicin and norfloxacin with 86.1%. In relation to *Staphylococcus aureus*, 100% of the isolates were sensitive to novobiocin and 94.1% to norfloxacin. **INDEX TERMS:** bacterial resistance, milk “*in natura*”, public health

## 1. INTRODUÇÃO

O leite é considerado como um alimento nobre por possuir uma maior concentração de cálcio, nutriente essencial para a formação e manutenção dos ossos, boa quantidade de fósforo e manganês, que são indispensáveis ao aproveitamento das gorduras e no funcionamento do cérebro, além de ser rico em proteínas e vitaminas, propiciando a formação e manutenção dos tecidos (Brito e Brito, 2004). Além do valor nutritivo, o leite está entre os produtos mais importantes na agropecuária brasileira por sua participação na geração de renda e empregos, principalmente no meio rural. O leite de búfala apresenta altos níveis de nutrientes em sua composição. A maior vantagem do leite desta espécie, em relação ao leite de vaca, é a qualidade nutricional, em função dos maiores teores de proteína, gordura e minerais, e por ser mais concentrado, apresenta aproveitamento industrial superior (Amaral et al., 2005; Teixeira et al., 2005).

Atualmente existe uma preocupação crescente dos consumidores quanto à melhoria da qualidade e sobretudo da segurança alimentar. A presença de contaminantes químicos em alimentos pode causar reações de hipersensibilidade e de toxicidade. O leite pode conter resíduos de substâncias administradas aos animais ou usadas no ambiente da fazenda, tais como, antimicrobianos, antiparasitários, desinfetantes e detergentes, além de herbicidas. Inserido neste contexto, a presença de resíduos de antibióticos tem importância significativa na qualidade sanitária do leite. A presença de antibióticos acima do limite máximo de tolerância aprovado pela Legislação para leite cru, torna-o prejudicial à saúde (Hotta, 2003) e pode ser devido à adição fraudulenta, inibindo o crescimento bacteriano indesejável ou da aplicação de diferentes substâncias antimicrobianas no rebanho leiteiro, para prevenção ou tratamento de doenças, como infecções da glândula mamária e doenças do trato reprodutivo (Fonseca e Santos, 2000).

No rebanho leiteiro, o emprego mais comum de antimicrobianos é no tratamento de mastites. Um fato agravante da presença dessas substâncias no leite é que a maior parte delas é resistente à pasteurização, das quais algumas não são inativadas, mesmo quando submetidas à temperaturas acima de 100<sup>o</sup> C (Hotta, 2003). O leite contaminado por substâncias químicas é considerado adulterado e impróprio para o consumo, pois representa um risco à saúde humana, em função de algumas reações tóxicas, alérgicas, e/ou supressão do sistema imune que estes compostos podem provocar (Lopes et al., 2002). A presença de resíduos de antimicrobianos no leite preocupa as autoridades sanitárias e a população, devido à ocorrência de reações alérgicas à penicilina, potencial carcinogênico de alguns antimicrobianos nitrofuranos e sulfametazina), seleção de estirpes bacterianas resistentes e inibição de fermento láctico na indústria (Machado, 1998).

Os sintomas mais comuns de uma intoxicação alimentar por resíduo de antimicrobianos são: náuseas, vômitos, diarreias, constipação, indigestão, dores de cabeça, erupção cutânea ou urticária, prurido, falta de ar (inclusive ataques de asma), sendo o edema de glote potencialmente fatal. Nos casos mais graves, pode ocorrer o choque anafilático, um colapso dos sistemas respiratório e circulatório de curso grave (Folly e Machado, 2001).

A Instrução Normativa n<sup>o</sup> 62 de 29 de dezembro de 2011, publicada no Diário Oficial da União, aprovou os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Leites tipos "A", "B", "C", leite pasteurizado, leite cru refrigerado, leite cru refrigerado na propriedade rural e seu transporte a granel, estabelecendo parâmetros novos para avaliação da qualidade do leite (BRASIL, 2011). Dentro desses novos parâmetros, deu-se ênfase à detecção de resíduos de inibidores no leite, com destaque para os antibióticos, devido aos riscos à saúde humana, e à própria indústria de laticínios do país.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) implantou no Brasil, em 2003, o programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal (PAMvet), que visa, controlar resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos. O leite foi o primeiro alimento a ser pesquisado por ser muito consumido pela população brasileira. Definiram-se também os seguintes princípios ativos a serem pesquisados: tetraciclina, beta-lactâmicos, sulfas, abamectina, doramectina e ivermectina. Vários métodos analíticos foram desenvolvidos para detecção de antimicrobianos no leite, entre os quais os de inibição microbiana, enzimáticos, aglutinação em látex, receptores microbianos, imunoensaio, eletroforese e cromatografia (IDF4, 1991 citado por Folly e Machado, 2001). Sob a forma de conjuntos reativos, os testes enzimáticos e os testes de inibição microbiana têm sido os mais empregados.

A resistência bacteriana pode ser definida como o fenômeno biológico que possibilita aos micro-organismos a capacidade de multiplicação ou persistência na presença de níveis terapêuticos do antimicrobiano. O uso indiscriminado de antibióticos em animais com mastite vem contribuindo para promoção da geração de formas resistentes de micro-organismos (Pereira e Siqueira-Júnior, 1995; Moreno et al., 1997), tornando-se fator relevante relacionado à segurança alimentar no que diz respeito à resistência bacteriana a antimicrobianos (Miguel, 2010).

As bactérias resistentes a diferentes antibacterianos são encontradas em leite de diversos animais de interesse agropecuário e o gênero *Staphylococcus* predomina entre os mais comuns (Pengov, 2001; Foschino et al., 2002; Devriese et al., 2002). *Staphylococcus* sp. são patógenos relacionados a surtos de intoxicação alimentar, e entre estes micro-organismos encontra-se a espécie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), sendo considerado um grande problema de saúde pública. A presença destes micro-organismos em alimentos pode indicar deficiência de processamento térmico, condições higiênicas inadequadas do processo ou, ainda, refrigeração ineficiente pós preparo (Gandra et al., 2009). O *S. aureus* destaca-se como um dos micro-organismos mais frequentemente associados às mastites em todos os continentes e o agente que isoladamente determina as maiores perdas na pecuária leiteira. No Brasil ele é considerado como o principal agente causal da mastite, com taxas de isolamento variáveis entre 8,3% e 49,23% (Costa, 2008).

Os testes de sensibilidade antimicrobiana são úteis para a verificação do desenvolvimento de resistência dos patógenos, auxiliando o médico veterinário no tratamento de mastite e ajuda a evitar o uso ineficiente de medicamentos. Ressalta-se que o insucesso terapêutico da mastite por resistência dos agentes reduz a taxa de cura dos animais tratados além de elevar os gastos com medicamentos e assistência técnica. A presença dos resíduos de antibióticos no leite e o surgimento de micro-organismos resistentes a vários medicamentos tem sido um dos maiores desafios para os órgãos responsáveis pela saúde pública e para a indústria de alimentos. Neste contexto objetivou-se com este trabalho pesquisar resíduos de antimicrobianos em amostras de leite e susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas da Baixada Maranhense.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local de estudo e características das propriedades**

Para o presente estudo foram avaliadas dez propriedades aleatoriamente amostradas, pertencentes aos municípios de Vitória do Mearim, Viana, Arari, Cajari e Matinha da Região da Baixada, estado do Maranhão. Os rebanhos eram compostos por búfalas primíparas e multíparas. Em todas as propriedades a ordenha era realizada manualmente, uma vez ao dia, sendo utilizado o sistema de “balde ao pé”. A população bubalina era constituída por animais da raça Murrah e mestiços de Murrah, criadas em sistema semi-intensivo ou extensivo. A produção diária de leite era de até 50 litros de leite (pequenas propriedades) e produção de 100 a 200 litros (médias propriedades), sendo o leite destinado para o consumo humano ou fornecido para laticínios.

### **2.2 Pesquisa de resíduos de antibiótico nas amostras de leite bubalino**

Foram analisadas 40 amostras “pool” de leite bubalino, coletadas diretamente de onde era armazenada a produção de leite diária das dez propriedades leiteiras dos municípios de Vitória do Mearim, Cajari, Arari, Viana e Matinha, da Região da Baixada, estado do Maranhão. Sendo que de cada propriedade coletou-se quatro amostras. A coleta foi realizada na hora da ordenha. Para a detecção de resíduos esta pesquisa utilizou-se kits comerciais: Eclipse 50, Delvotest SP-NT e Twinsensor-BT 20, que são kits qualitativos para a detecção de substâncias inibidoras no leite, métodos simples e rápidos que permitem comprovar se o leite contém antibióticos em uma concentração acima dos limites máximos de resíduos (LMR).

#### **2.2.1. Princípio das Técnicas (kits) utilizados**

##### **2.2.1.1 Eclipse 50**

Utilizado para a pesquisa dos antimicrobianos do grupo  $\beta$ -lactâmicos, Sulfonamidas, Tetraciclina, Macrolidas e Aminoglicosídeos. É um teste que se encontra em formato de placa de microtiter cujos recipientes contém um meio de cultivo específico com esporos de *Geobacillus stearothermophilus*. O

princípio desse teste é a inibição do crescimento microbiano, por meio da inoculação de 100µl de amostra de leite nos tubos, seguido de incubação a 65°C em estufa durante 2h e 45 minutos para observação da alteração da coloração do meio de cultura. Os esporos germinam e se multiplicam acidificando o meio e provocando a modificação do indicador, de uma cor azul a amarelo esverdeado (resultado negativo). Se a amostra de leite contiver uma concentração de antibiótico superior ao de detecção do teste, o crescimento do micro-organismo é inibido de modo que não haverá produção de ácido, nem por consequência modificação da cor do meio (resultado positivo).

### 2.2.1.2 Delvotest SP-NT

Teste utilizado para a pesquisa dos antimicrobianos do grupo β-lactâmicos, Sulfonamidas, Tetraciclina, Macrolidas e Aminoglicosídeos. O Delvotest SP-NT contém *Geobacillus stearothermophilus var. calidolactis*, em meio semisólido com indicador, juntamente com todos os nutrientes necessários para o crescimento bacteriano. O teste obedece a seguinte sequência: 1- abertura das ampolas (Delvotest® SP-NT) com retirada da tampa de alumínio, 2- foram adicionados volumes de 0,1 mL das amostras de leite a serem analisadas nas ampolas, 3- estas ampolas permaneceram incubadas em banho-maria a 64°C ± 0,5°C por 3 (três) horas, segundo a recomendação técnica, sempre acompanhadas de controle negativo. Após este período foram realizadas as leituras e considerados positivos os testes que apresentaram cor púrpura e negativo aqueles que apresentaram uma mudança da cor púrpura para amarela, conforme ocorre no controle negativo. Após o período de incubação, ácido suficiente é produzido pelo crescimento e multiplicação das bactérias que utilizam a glicose. A alteração da cor do indicador de pH (púrpura de bromocresol), indica uma amostra livre de antimicrobianos. Se, no entanto, o crescimento e multiplicação da bactéria forem retardados ou inibidos, não ocorre a acidificação do meio e este permanece púrpura. A coloração intermediária entre amarelo e púrpura também é considerada positiva para resíduo de antimicrobiano.

### 2.2.1.3 Twinsensor – BT 20

É um kit baseado em receptores no formato de tira reativa ou “disptick” para a detecção rápida e simultânea de resíduos de antibióticos dos grupos betalactâmicos e tetraciclina em amostras de leite. Possui uma linha “controle”, impressa inicialmente em verde, aparece sempre e está entre as outras linhas do teste, a linha específica de betalactâmicos se localiza abaixo da linha controle, enquanto a linha reativa localiza-se acima das mesmas. Adicionou-se 200 µl de leite ao microtubo do teste e em seguida foi feita a mistura até obter uma amostra homogênea, os microtubos foram incubados por 3 minutos a 40±2°C; logo após esse período de incubação as tiras reativas foram submergidas no microtubo e incubadas durante 3 minutos por 40±2 °C, para em seguida serem realizadas as leituras, conforme recomendação do fabricante.

## 2.4 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Foram testadas um total de 112 cepas, sendo 72 de *Staphylococcus coagulase negativo* (SCN), 23 de *Staphylococcus coagulase positivo* (SCP) e 17 de *Staphylococcus aureus*, previamente isoladas de amostras de leite de búfalas com mastite clínica e subclínica, procedentes de 10 propriedades leiteiras localizadas na Baixada Maranhense. As cepas dos micro-organismos foram isoladas, identificadas e classificadas de acordo com Carter et al. (1990). As colônias de *Staphylococcus* foram submetidas às provas bioquímicas de produção de coagulase livre, DNase, acetoina, fermentação da maltose e trealose (aerobiose) e manitol (aerobiose e anaerobiose), segundo metodologia de Mac Faddin (1980) e Silva et al. (2007). Em seguida, foi realizada a caracterização dos estafilococos em *Staphylococcus coagulase negativo* (SCN), *Staphylococcus coagulase positivo* (SCP) e *Staphylococcus aureus* de acordo com Baird- Parker (1990).

Após o isolamento e identificação, as cepas bacterianas foram submetidas ao teste de sensibilidade *in vitro*, a antimicrobianos, pelo método de difusão em discos em Ágar Müller Hilton, segundo a metodologia de Bauer et al. (1966), sendo testados os seguintes antimicrobianos: cloranfenicol (30 mcg), gentamicina (10 mcg), penicilina (10 mcg), tetraciclina (30 mcg), vancomicina (30 mcg), amoxicilina (10 mcg), norfloxacin (10 mcg), novobiocina (5 mcg), bacitracina (10 mcg), oxacilina (1 mcg), lincomicina (2 mcg), ampicilina (10 mcg), eritromicina (15 mcg), enrofloxacin (5 mcg) e estreptomicina (10 mcg).

## 2.5 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados, utilizando - se análise descritiva de cálculo de frequências absoluta e relativa para os diferentes parâmetros estudados (Sampaio, 1998).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra a ocorrência de resíduos de antibiótico em amostras de leite provenientes de rebanhos bubalinos do Estado do Maranhão. Os dados revelam que, das 40 amostras analisadas, 06 (seis) apresentaram resíduos de antimicrobianos. Esta frequência pode ser atribuída ao uso pouco frequente de antimicrobianos no tratamento de mastite na espécie, de acordo com informações obtidas quando da visita nas propriedades. Este achado pode ser atribuído a diversos fatores, como por exemplo, o produtor, desconhecendo ou ignorando os riscos para a saúde ou agindo de má fé, não quer se desfazer do leite proveniente de vaca tratada, mistura o leite com o leite proveniente de vacas sadias. Este fato, é decorrente da falsa expectativa do produtor, que a diluição resultará em concentrações não detectáveis (Fonseca, 2005). A minimização do uso de antibióticos, facilita a obtenção de produtos de origem animal livres de resíduos de antibióticos e bactérias resistentes que possam transferir essa resistência a bactérias do ser humano (Jackson e Cockcroft, 2007).

De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitário de Produtos de Origem Animal (Brasil, 2000), o leite só deve ser utilizado para o consumo humano após 72 horas da última aplicação do antibiótico, não ressaltando a via de administração. No entanto, alguns autores (Seymour et al.,1988; Suliman et al.,1990) relataram que os resíduos de antibiótico, de alguns princípios ativos, persistem após este período recomendado. Além disso, outros fatores, como a dose, a via de administração, a solubilidade e outros, podem também influenciar (Costa, 1996). A presença de resíduo de antibióticos nas amostras analisadas deve-se provavelmente a não obediência do intervalo de segurança, principalmente no tratamento de mastites e a falta de fiscalização adequada, e apesar de baixa representa o principal ponto crítico de controle de contaminação química do leite e constitui um risco potencial à saúde do consumidor (Folly e Machado, 2001).

As amostras contaminadas com resíduos são provenientes de três das propriedades pesquisadas, ressaltando que essas três propriedades são as que fornecem leite para laticínios, devendo portanto, a matéria prima ser monitorada na recepção nas plataformas dos estabelecimentos. De acordo com os resultados mostrados na figura 1, 6 (15,0%) das amostras de leite analisadas pelo kit Eclipse 50® apresentaram níveis de resíduos antimicrobianos detectáveis. O Devoltest SP também detectou presença de resíduo de antibiótico em 6 (15,0%) das amostras, enquanto o Twinsensor BT detectou apenas 1 (2,5%) amostra positiva para betalactâmico. Esses resultados se assemelham aos obtidos por Nero et al. (2007) que verificaram 6,0 % de amostras de leite bubalino contaminadas por resíduos de antimicrobianos. Camargo e Costa (2010) também encontraram apenas uma amostra positiva no teste Twinsensor BT para  $\beta$ -lactâmicos ao analisar o leite bovino de propriedades leiteiras no estado do Maranhão.

Sabe-se que não existe uma legislação específica, que possa restringir o uso de antibióticos em animais. O risco do consumo de antibióticos (metronidazol, trimetropim, estreptomicina e tetraciclina), por gestantes, se deve ao potencial teratogênico destes que podem causar ototoxicidade e alteração no desenvolvimento ósseo fetal. Para o público infantil, o leite e seus derivados, representam uma importante porção da ingestão diária de alimentos. Estes indivíduos, juntamente com os idosos, são mais vulneráveis e mais sensíveis a uma menor concentração de resíduos ingerida. A criança pode não apresentar sintomas imediatos, mas podem ocorrer consequências futuras. Hipersensibilidade e possível choque anafilático podem ocorrer em indivíduos mais sensíveis, além de alterações nos processos fermentativos (produção de queijos e iogurtes); modificação dos resultados de análises Laboratoriais e desequilíbrio da flora intestinal e efeito teratogênico (Nascimento et al., 2001; Fonseca et al., 2009).

No Brasil, a utilização de testes para a detecção de resíduos de antimicrobianos no leite é uma das exigências das normas oficiais para a produção, beneficiamento e industrialização do leite e uma das preocupações tecnológicas das grandes empresas do setor (Brasil, 2002). Logo, os resultados obtidos neste estudo indicam a necessidade de monitoração e maior controle dos órgãos de vigilância sanitária, no nível de produção e consumo de leite no estado do Maranhão.



Quanto ao perfil de sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus*, apresentados na tabela 2, verifica-se que a norfloxacina, a gentamicina e o cloranfenicol foram os princípios que demonstraram os maiores percentuais de eficácia (sensibilidade), corroborando com Devriese et al. (2002) que relataram a efetiva ação destes antibióticos frente aos agentes causadores de mastite bubalina. Os micro-organismos resistentes não se inibem pela concentrações habitualmente alcançadas no sangue ou tecidos do correspondente antimicrobiano, ou apresentam mecanismos de resistência específicos para o agente estudado (Miguel, 2010).

Quanto ao perfil de resistência antimicrobiana dos *Staphylococcus* sp. (Tabela 2), a resistência dos antimicrobianos utilizados nesta pesquisa variou de 3,8 a 100%; 0,0% a 66,6% e 0,0 a 100% para *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN), *Staphylococcus* coagulase positivo (SCP) e *Staphylococcus aureus* respectivamente. Observa-se que os *Staphylococcus* coagulase positivo foram mais resistentes à ampicilina, novobiocina, lincomicina e penicilina com 83,5% de resistência, enquanto os *Staphylococcus* coagulase negativo apresentaram maior resistência à novobiocina (77,7%) e penicilina (75,0%) e os *Staphylococcus aureus* à oxacilina (83,3%) e penicilina (76,4 %). Estes resultados caracterizam a ocorrência de *Staphylococcus* sp. em leite de búfalas com características de múltipla resistência a vários antimicrobianos. O perfil de resistência apresentado por estas bactérias pode favorecer a persistência de isolados resistentes em rebanhos bubalinos do Estado do Maranhão, caso o manejo nas propriedades não seja adequado e orientado.

Trabalhos que relatam o perfil de resistência de *Staphylococcus* sp. de rebanhos bubalinos são escassos. Contudo, Bonna et al. (2007) analisando o perfil de resistência dos isolados de *Staphylococcus* coagulase negativo (SPC) de leite de búfalas de seis municípios do estado do Rio de Janeiro, observou que os micro-organismos apresentaram menor sensibilidade à penicilina G (28,46%) e à amoxicilina (32,58%). Avaliando os dados existentes em pesquisa realizada em bovinos, no Brasil, Costa et al. (2013) isolaram 33 cepas de SCN de glândulas mamárias de vacas com perfis de resistência dos apresentados no presente trabalho, utilizando os mesmos antibióticos testados (Tabela 2). Os SCN isolados pelos autores demonstraram 27,2%, 36,3%, 90,9%, 3%, 18,1%, 39,4%, 18,2%, 21,2% e 84,8% de resistência frente à tetraciclina, oxacilina, penicilina G, cefalotina, gentamicina, vancomicina, eritromicina, sulfazotrim e ampicilina, respectivamente, destacando-se a maior resistência à penicilina, resultado semelhante ao encontrado neste trabalho.

No presente trabalho 16,6% das cepas de SCP apresentaram sensibilidade intermediária à oxacilina, lincomicina, eritromicina e enrofloxacina como mostra a tabela 2. Correa (2005) analisou 95 cepas de SCP isoladas de leite mastítico bovino e observou resistência à ampicilina (78,94%), penicilina (77,98%) e lincomicina (71,58%). Gandra et al. (2009), em acordo com este estudo, avaliando a resistência/sensibilidade de 11 cepas de *Staphylococcus* coagulase positivo (SCP) isoladas em amostras de embutidos e de queijos coloniais verificaram que 100% das cepas foram resistentes ao antibiótico penicilina e afirmam que cepas com sensibilidade moderada apresentam o potencial para se tornarem resistentes.

Atualmente, muitos dos isolados de *Staphylococcus aureus* têm desenvolvido resistência a mais de 20 diferentes agentes antimicrobianos, tais como a vancomicina, lincomicina, amoxicilina, dentre outros (Luz, 2008). Brito e Brito (2004) comprovaram que os *Staphylococcus aureus* isolados de infecções intramamárias bovinas no Brasil (clínicas e subclínicas) foram sensíveis a eritromicina, gentamicina, norfloxacina e oxacilina, 91% resistentes à tetraciclina e 65% a ampicilina e penicilina. Na Índia, isolou-se um grande número de bactérias do leite de vacas com mastite, principalmente *S. aureus*, resistentes à penicilina e estreptomicina, fato que se deve, segundo os autores citados, à ampla e má utilização da associação desses antibióticos no tratamento da doença, naquele país (Luz, 2008).

Segundo Costa (1996), os problemas ligados à saúde pública são relacionados à seleção de cepas bacterianas resistentes devido ao aumento gradativo das dosagens utilizadas. O uso indiscriminado de medicamentos sem a realização de testes preliminares de sensibilidade “*in vitro*” pode na maioria das vezes resultar em tratamentos inadequados e ocasionar agravamento do processo, determinando o desenvolvimento de resistência microbiana (Cullor, 1993). Como consequência, tanto as drogas consideradas clássicas, como aquelas recentes no comércio, vêm se tornando ineficientes. No entanto, insucesso do tratamento também pode relacionar-se a capacidade de sobrevivência intracelular de algumas bactérias e também à alterações anatomopatológicas induzidas por certas infecções impedindo o

acesso do medicamento no foco (Barragy, 1994 e Pereira et al., 2009). Meng et al. (1998) afirmam que a resistência às drogas está relacionada, principalmente, com o uso excessivo de antibióticos em medicina veterinária e às aplicações sub-terapêuticas de antimicrobianos para a prevenção de doenças, para a promoção do crescimento e eficiência alimentar em animais de produção.

Os *Staphylococcus* sp. apresentam características específicas de dispersão entre os rebanhos, resistência aos fármacos utilizados no tratamento da doença e grau de toxigenicidade que pode ocasionar riscos à saúde pública (Freitas et al., 2005 e Donatele et al., 2002), fazendo-se essencial a seleção do antibiótico específico tanto do ponto de vista da saúde do animal, quanto da produtividade da glândula mamária, ocorrendo geralmente uma tendência de aparecimento de cepas resistentes aos antibióticos usuais (Oliveira, 2008), além da passagem de resíduos dos mesmos para o leite, que se dá após o tratamento de búfalas em lactação.

#### 4. CONCLUSÕES

- O leite de búfalas de seis propriedades da Baixada Maranhense contém resíduo de antimicrobianos;
- Dentre os testes de triagem utilizados para detectar resíduos de antimicrobianos, o Devoltest SP-NT, e Eclipse 50 mostraram-se mais eficientes que o Twinsensor BT 20;
- As cepas de *Staphylococcus* coagulase positivo, *Staphylococcus* coagulase negativo e *Staphylococcus aureus* testadas apresentaram perfil de resistência múltipla, principalmente à penicilina, ampicilina e oxacilina;
- O antimicrobiano de escolha para o tratamento da mastite foi norfloxacin.

#### 5. REFERÊNCIAS

Amaral, F. R.; Carvalho, L. B.; Silva, N.; Brito, J. R. F. Qualidade do leite de búfalas: composição. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n.2, p.106-110, abril/jun. 2005.

Anvisa. **Leis**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>, Acesso em 10 de novembro de 2012.

Baird-Parker, A. C. The *Staphylococci*: An introduction. **Journal of Applied Bacteriology**. v.69, p.15-85, 1990.

Bauer, A.W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C.; Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.

Barragy, T. B. Bovine mastitis In: **Veterinary Drug therapy New York**: Lea e Febiger, p.655-687, 1994.

Bonna, I. C. F.; Santos, A. P. V.; Teixeira, G. N.; Mota, O. V. *Staphylococcus* coagulase-negativos resistentes a drogas isolados de leite de búfalas (*Bubalus Bubalis*). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 14, n. 2, p. 117-121, maio/ago. 2007.

Brasil. **Regulamento de inspeção industrial e sanitário de produtos de origem animal**. Brasília: Ministério da Agricultura, 2000.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 31 dez. de 2011. Seção 1, p. 6.

Brito, J. R. F.; Brito, M. A. V. P. **Qualidade do leite brasileiro e os desafios para atendimento das exigências internacionais**. In: Zoccal, R. et al. Leite: uma cadeia produtiva em transformação. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2004. p.235-243.

Camargo, S. C. A; Costa, F. N. Utilização do Delvotest SP-NT, Eclipse 50 e Twinsensor-BT 20 na detecção de resíduos de antimicrobianos em amostras de leite *in natura* provenientes de quatro bacias leiteiras do Estado do Maranhão. 2010. 116f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias- Universidade Estadual do Maranhão, São Luis, MA).

Carter, G. R.; Cole Junior, J. R. **Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology**. 5. ed. San Diego, California: Academic Press, 1990. p. 201-209.

Correa, I.; Correa, M. G. P.; Marin, J. M. Antimicrobial susceptibility of strains of coagulase positive *Staphylococcus* isolated from mastitic bovine milk. **ARS Veterinária**, v.21, p.69-76. 2005.

Costa, E. O. Resíduo de Antibiótico no Leite: um risco à saúde do consumidor. **Revista Higiene Alimentar**, v. 10, n. 44, p. 15-16, jul./ago. 1996.

Costa, G. M. Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais/ Geraldo Márcio da Costa. 2008. 123 p. **Tese** (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Costa, G. M.; Barros, R. A.; Custódio, D. A. C.; Pereira, U. P.; Figueiredo, D. J.; Silva, N. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**. v.80 n.3, July/Sept. 2013.

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

Devriese, L. A.; Baele, M.; Vanechoutte, M. Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* chromo genes isolates from intramammary infections of dairy cows. **Veterinary Microbiology**, v.87, n.2, p.175-82, 2002.

Donatele, D. M.; Motta, O. V.; Folly, M. M. Antimicrobial profile of coagulase positive *Staphylococcus* spp. strains from cows with subclinical mastitis in northern and northwestern regions of Rio de Janeiro, Brazil. **Napgama**, v.5, n.2, p.3 - 6, 2002.

Folly, M. M., Machado, S. C. A. Detecção de Resíduos de Antibióticos utilizando-se métodos de inibição microbiana, enzimática imuno-ensaios no leite pasteurizado comercializado na região norte do Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.1, p.95-98, 2001.

Fonseca, C. S. P. Qualidade do leite cru de tanques refrigeradores de Minas Gerais. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, 2005. 67 p. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais).

Fonseca, G. P.; Cruz, A. G.; Faria, J. A. F.; Silva, R.; Moura, M. R. L.; Carvalho, L. M. J. Antibiotic residues in Brazilian UHT Milk: a screening study. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 451-453, abr./jun. 2009.

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

Foschino, R.; Invernizzi, A.; Barucco, R.; Stradiotto, K. Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goats milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year. **Journal of Dairy Research**. v.69, p.213-225, 2002.

Freitas, M. F. L.; Lima, K. J. Ribeiro, M. Perfil da Sensibilidade *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no Agreste do Estado de Pernambuco **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.2, p.171-177, 2005.

Gandra, T. K. V.; Oliveira, M. G.; Banani, M. T.; Silva, W. P. **Perfil de resistência/sensibilidade a antibióticos em cepas de Estafilococos coagulase positiva isoladas em embutidos e de queijos**, In: Congresso de Iniciação Científica, 2009.

Hotta, J. M. Monitoramento de resíduos de antimicrobianos no leite em diferentes pontos da cadeia produtiva do leite, comparando diferentes métodos de detecção. 2003. 50 f. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Jackson, P. G. G.; Cockcroft, P. D. **Handbook of Pig Medicine**. Philadelphia: Saunders, 2007. 296p.

Lopes, M. O.; Carraro, C. N. M.; Veiga, D. R.; Candido, L. M. B.; Furtado, F. O. J. Levantamento do uso e detecção de resíduos de antimicrobianos no leite produzido na Região Metropolitana de Curitiba-PR. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, v. 57, n. 327, p. 233-235, 2002.

Luz, I. S.; Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região agreste de Pernambuco. 126 p. **Dissertação** - Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Recife, 2008.

Mac Faddin, J. F. **Biochemical test for identification of medical bacteria**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980. 527p.

Machado, S. C. A. Utilização de métodos rápidos de análise para determinação da incidência da contaminação por resíduos de antibióticos no leite pasteurizado comercializado na região norte-noroeste do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Norte Fluminense, 1998. 67 p. **Dissertação** (Mestrado em Ciências e Tecnologias Agropecuárias).

Meng, J.; Zhao, S.; Doyle, M. P.; Joseph, S.W. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM isolated from animals, food and humans. **Journal of Food Protection**, v.61, n.11, p. 1511-1514, 1998.

Miguel, P. R. R. Incidência de contaminação no processo de obtenção do leite e suscetibilidade a agentes antimicrobianos, 2010. **Monografia**. Pós Graduação em Zootecnia, Universidade do Oeste do Paraná.

Moreno, G.; Lopes, C. A. M.; Frederico, A. Incidence and characterization of mastitic bovine milk antimicrobial multi-drug resistant bacteria in middle west region of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.14, p.207-210, 1997.

Nascimento, G. G. F.; Maestro, V.; Campos, M. S. P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.14, n. 2, p. 119-124, mai./ago.2001.

Nero, L. A.; Mattos, M. R.; Beloti, V.; Barros, M. A. F.; Netto, D. P.; Pinto, J. P. A. N.; Andrade, N. J.; Silva, W. P.; Franco, B. D. G. M. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and chemical residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 211-215, 2004.

Oliveira, N. J. Antibióticos promotores de crescimento na produção animal. In: 4º Encontro de zootecnista do norte de Minas: novas perspectivas mercadológicas, 2008, Montes Claros. **Anais....** Montes Claros: Núcleo de Ciências Agrárias da UFMG, 2008, p. 89-115.

Pereira, A. V.; Rodrigues, O. G.; Lima, E. Q.; Oliveira, K. A.; Mota, R. A.; Medeiros, E. S. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extrato de Jurema preta (*Mimosa tenuiflora*) e antibióticos sintéticos utilizados no tratamento de mastite em bubalinos. **Revista de Biologia e Farmácia**. v.3, n.1, 2009.

Pereira, M. S. V.; Siqueira-Júnior, J. P. Antimicrobial drug resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from cattle in Brazil. **Letters in Appl. Bacteriol.** 20, 391-395, 1995.

Pengov, A. The role of coagulase-negative *Staphylococcus* spp. And associated somatic cell counts in the ovine mammary gland. **J DairySci**, v.84(3), p.572-574, 2001.

Sampaio, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 185p.

Seymour, E. H., Jones, G. M., Mcgilliard, M. L. Persistence of residues in milk following antibiotic treatment. **Journal Dairy Science**, v.71, p.2292-2296, 1988.

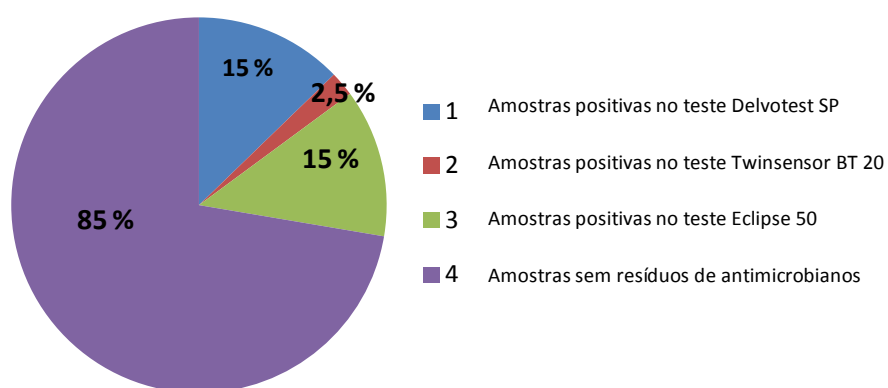
Silva, N., Junqueira, V. C. A., Silveira, N. F. A., Taniwaki, M. H., Santos, R. F. S., Gomes, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela. 536p, 2007.

Suliman, H. B., Shaddad, S. A., Shommein, A. M., Abdelraraheim, A. I., Ibrahim, M. E. M. Antibiotic residues in milk following treatment of bovine mastitis. **Bulletin of Animal Health and Production in Africa**, v.38, p.65-67, 1990.

Teixeira, L. V., Bastianeto, E.; Oliveira, D. A. A. Leite de búfala na indústria de produtos lácteos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n.2, p.96-100, abril/jun. 2005.

**Tabela 1.** Frequência de amostras de leite de búfalas contaminadas por resíduo de antimicrobianos provenientes de propriedades leiteiras da Baixada Maranhense.

Resíduos de antimicrobianos	Nº de amostras	%
Ausência	34	85,0
Presença	06	15,0
Total	40	100,0



**Figura 1.** Frequência de amostras de leite de búfalas contaminadas com resíduos de antimicrobianos frente aos testes Delvotest SP, Eclipse 50 e Twinsensor BT 20, provenientes de propriedades leiteiras da Baixada Maranhense.

**Tabela 2.** Frequência relativa (%) da sensibilidade intermediária (I) e resistência (R) “*in vitro*” dos isolados de 72 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo, 23 de *Staphylococcus* coagulase positivo e 17 de *Staphylococcus aureus*, isoladas de leite de búfalas com mastite, frente aos antimicrobianos, 2013.

Antimicrobianos	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo (%)			<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo (%)			<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> (%)		
	S	SI	R	S	SI	R	S	SI	R
<b>Amoxicilina</b>	55,5	0,0	44,4	33,3	0,0	66,6	33,3	0,0	66,6
<b>Norfloxacina</b>	91,6	8,9	1,3	100,0	0,0	0,0	94,1	0,0	5,8
<b>Novobiocina</b>	16,6	5,5	77,7	16,6	0,0	83,5	100,0	0,0	0,0
<b>Bacitracina</b>	38,8	8,3	51,3	33,3	0,0	66,6	41,1	17,6	29,4
<b>Oxacilina</b>	33,3	1,3	63,8	16,6	16,6	66,6	17,6	0,0	82,3
<b>Lincomicina</b>	26,3	8,3	63,8	0,0	16,6	83,5	29,4	17,6	52,9
<b>Tetraciclina</b>	61,1	34,1	34,7	33,3	0,0	66,6	82,3	15,8	2,7
<b>Cloranfenicol</b>	65,2	15,2	19,4	100,0	0,0	0,0	79,5	5,8	23,5
<b>Gentamicina</b>	86,1	0,0	13,8	83,5	0,0	16,6	82,3	0,0	15,8
<b>Ampicilina</b>	40,2	0,0	59,7	16,6	0,0	83,5	23,5	0,0	76,4
<b>Eritromicina</b>	48,6	12,5	3,8	33,3	16,6	50,0	29,4	29,4	41,1
<b>Enrofloxacina</b>	86,1	5,5	8,3	66,6	16,6	16,6	70,5	23,5	0,0
<b>Vancomicina</b>	43,0	5,5	51,3	33,3	0,0	66,6	47,0	0,0	52,9
<b>Estreptomicina</b>	76,3	1,3	20,8	50,0	0,0	50,0	64,7	0,0	29,4
<b>Penicilina</b>	25,0	0,0	75,0	16,6	0,0	83,3	23,5	0,0	76,4

S-sensível; SI- sensibilidade intermediária; R- resistente

## CONCLUSÕES

- A mastite clínica e subclínica está presente nas búfalas leiteiras da Baixada Maranhense, com predominância da mastite subclínica;
- Os agentes microbiológicos isolados dos casos de mastite bubalina foram: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *E. coli* e outras Enterobactérias;
- Foi encontrado resíduo de antibióticos nas amostras de leite, sendo necessária a conscientização tanto dos produtores quanto do mercado consumidor, enfatizando todos os prejuízos causados;
- As cepas de *Staphylococcus* coagulase positivo, *Staphylococcus* coagulase negativo e *Staphylococcus aureus* apresentaram multiresistência aos antimicrobianos testados;
- O princípio de escolha para o tratamento das mastites em bubalinos causada por *Staphylococcus* foi norfloxacin.



## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Apesar do maior valor nutritivo e rendimento industrial do leite de búfala quando comparado com o leite de vacas e do crescimento de sua exploração no país, pouco se tem feito para regulamentação de normas de padrão de identidade e qualidade do leite bubalino, o que dificulta a realização de medidas de controle e fiscalização aliada à falta de padrões a serem seguidos.

Especial orientação e apoio devem ser dados aos produtores de leite para prevenir e controlar as infecções intramamárias nos rebanhos, visando melhorar a qualidade do leite consumido e atender à população consumidora deste produto de forma satisfatória. Para tanto, é necessária uma série de medidas de controle em todas as etapas da cadeia de produção, assim como é fundamental a realização de análises microbiológicas periódicas.

Ressalta-se a importância dos agentes isolados nesses estudos estarem envolvidos na transmissão da doença para o homem, sendo indispensáveis os cuidados preventivos relacionados à transmissão desses agentes patogênicos pela ingestão do leite e seus derivados contaminados;

Há necessidade de implantar o programa de monitoramento de resíduos e a sensibilização dos produtores e Médicos Veterinários quanto ao uso dos antimicrobianos no tratamento das infecções dos animais.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A

### QUESTIONÁRIO Nº \_\_\_\_\_

#### RELATIVO À PROPRIEDADE:

1. Nome da propriedade: \_\_\_\_\_

2. Endereço: \_\_\_\_\_

3. Nome do proprietário: \_\_\_\_\_

4. Nº total de animais: \_\_\_\_\_

#### RELATIVO À PRODUÇÃO DE LEITE:

5. Nº de animais em lactação: \_\_\_\_\_

6. Volume médio de leite: \_\_\_\_\_ litros/ dia

7. Tipo de ordenha: ( ) mecânica ( ) manual

Horário da coleta: \_\_:\_\_ horas

Dia da coleta: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

#### RELATIVO AO MANEJO DE ORDENHA

8. Realiza pré e pós – *dipping* ? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, o que utiliza? \_\_\_\_\_

9. Utiliza pano na secagem das tetas? ( ) Sim ( ) Não

10. Realiza limpeza e desinfecção das instalações? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, o que utiliza? \_\_\_\_\_

11. Utiliza a caneca telada e CMT para diagnóstico de mastite antes da ordenha?

( ) Sim ( ) Não

Se sim, qual a frequência ? \_\_\_\_\_

12. Utiliza a antibioticoterapia no tratamento de mastite? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, o que utiliza? \_\_\_\_\_

13. Realiza a antibioticoterapia em vacas secas?  Sim  Não

Se sim, o que utiliza? \_\_\_\_\_

14. Onde é armazenado o leite ordenhado? \_\_\_\_\_

15. Qual é a origem da água utilizada na sala de ordenha? \_\_\_\_\_

#### RELATIVO À SALA DE ORDENHA

16. Faz controle de moscas?  Sim  Não

17. Excesso de umidade?  Sim  Não

18. Acúmulo de dejetos?  Sim  Não

19. Qual o tipo de piso? \_\_\_\_\_

#### RELATIVO AO ORDENHADOR

20. Fardamento completo e limpo?  Sim  Não

21. Unhas curtas, sem esmalte e limpas?  Sim  Não

22. Lavas as mãos antes da ordenha?  Sim  Não

23. Sabe o significado de CCS?  Sim  Não

Responsável pelo preenchimento do questionário \_\_\_\_\_

## APÊNDICE B

### Diagnóstico da mastite clínica e subclínica em búfalas pertencentes a propriedades leiteiras da Baixada Maranhense



Realização do teste da caneca telada.



Resultado negativo no teste da caneca telada.



Resultado positivo no teste da caneca telada.



Realização do teste CMT.



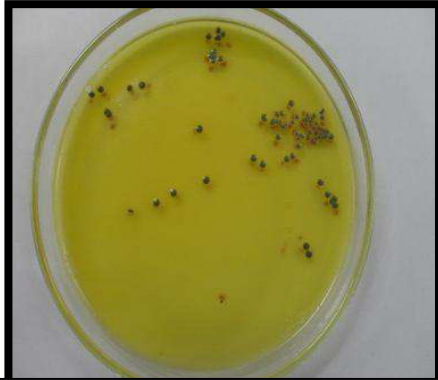
Resultado negativo no CMT.



Resultado positivo no CMT.

## APÊNDICE C

Isolamento e identificação dos micro-organismos em amostras de leite oriundas de búfalas com mastite.

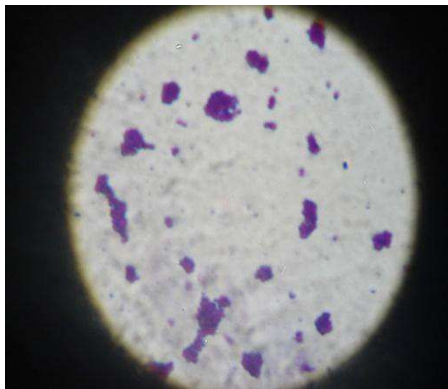


Crescimento de *Staphylococcus* em Ágar Baird- Parker

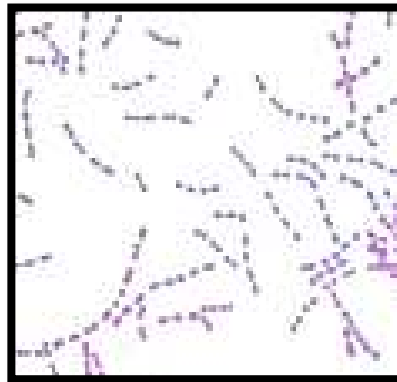


Crescimento em Ágar Sangue (com hemólise)

*Staphylococcus* sp.



*Streptococcus* sp.



*Corynebacterium* sp.



*Escherichia coli*

## APÊNDICE D

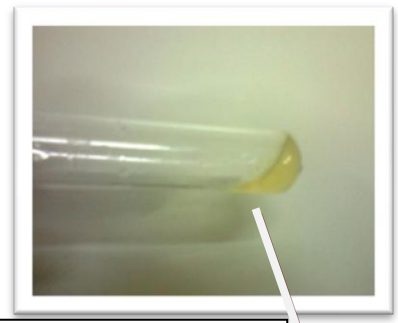
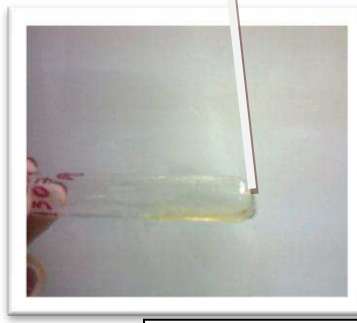
Provas Bioquímicas realizadas para a confirmação das cepas de *Staphylococcus* coagulase positivo, *Staphylococcus* coagulase negativo e *Staphylococcus aureus*

Catalase  
positiva



Prova de catalase

Coagulase  
negativa



Prova de coagulase livre

Coagulase  
positiva



Prova de Voges - Proskauer (resultado negativo à esquerda e positivo à direita)



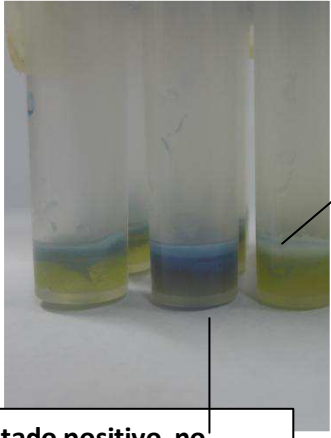
Fermentação do manitol em aerobiose



Fermentação dos açúcares em anaerobiose

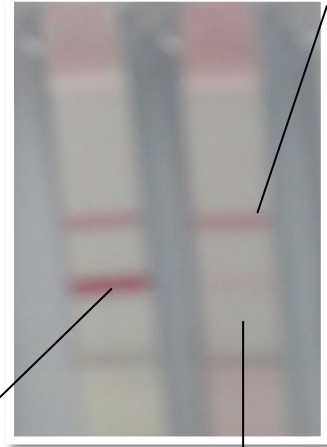
## APÊNDICE E

Testes realizados para a pesquisa de antibióticos nas amostras de leite coletivas de propriedades leiteiras da Baixada Maranhense e antibiograma realizado com cepas de *Staphylococcus*



Resultado positivo no teste Delvotest SP - NT

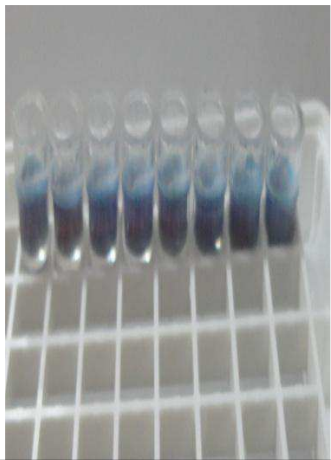
Resultado negativo no teste Delvotest SP - NT



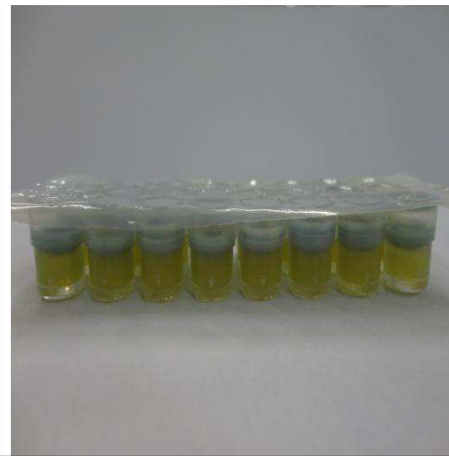
Linha controle

Resultado positivo no teste Twinsensor -BT 20

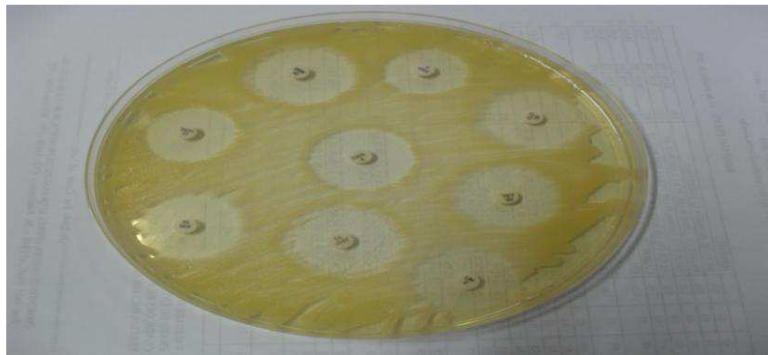
Resultado negativo no teste Twinsensor -BT 20



Resultado positivo no teste Eclipse 50



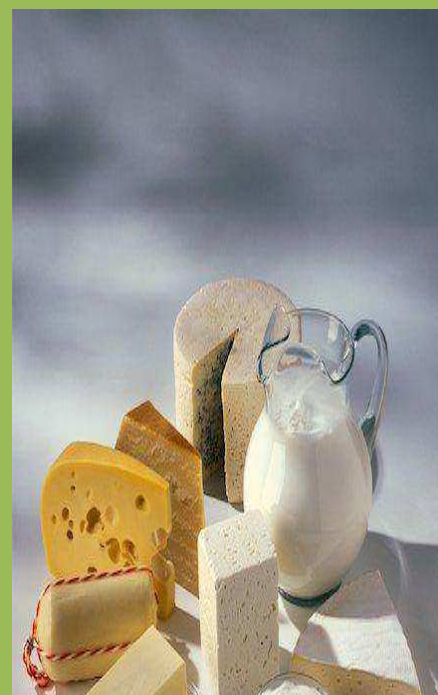
Resultado negativo no teste Eclipse 50



Antibiograma



# MANUAL DO ORDENHADOR



Esta é uma publicação integrante da conclusão do Curso de Mestrado em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão- UEMA, da aluna Nara Andréa Franco Santos.

## **Equipe de elaboração e colaboradores**

### **Nara Andréa Franco Santos**

Médica Veterinária – Aluna do Mestrado em Ciência Animal- UEMA.

e-mail: narandrea\_fs@hotmail.com

### **Profa. PhD. Francisca Neide Costa**

Departamento de Patologia- UEMA

### **Profa. Dsc. Lúcia Maria Coelho Alves**

Departamento de Patologia- UEMA

### **Profa. Dsc. Lenka de Moraes Lacerda**

Departamento de Patologia- UEMA

### **Fernando Douglas Santos Silva**

Graduando do Curso de Medicina Veterinária-UEMA

**São Luís-MA**

**2013**

## SUMÁRIO

01.	Apresentação.....	03
02.	O que é leite de qualidade.....	04
03.	Características de um bom ordenhador.....	05
04.	Mastite ou mamite.....	06
05.	Contagem de Células Somáticas (CCS).....	08
06.	Manejo correto da ordenha.....	09
07.	Referências.....	18

## **Apresentação**

Com o aumento do consumo e da produção do leite, surgiu a necessidade de melhoria na qualidade do leite fornecido à população, que cada vez mais exigente, busca um produto saudável. Atenta a esta realidade, este Manual do ordenhador visa a melhoria das condições de vida de produtores de leite, pois possibilita a manutenção deles na cadeia produtiva do leite com um produto de qualidade.

Desenvolvido e validado a partir de pesquisa realizada em propriedades bubalinas pertencentes à Região da Baixada Maranhense, a elaboração deste manual representa a soma de esforços entre produtores, ordenhadores, alunos, e professores da Universidade Estadual do Maranhão-UEMA, para disponibilizar um material de apoio, acessível e aplicável na busca de um produto de qualidade. Sentindo a ausência de trabalhos sobre a obtenção de leite de qualidade no Estado do Maranhão, decidimos publicar o presente trabalho. Foi redigido em linguagem simples e reforçado com imagens fotográficas para permitir fácil entendimento do seu conteúdo.

Boa leitura e Bom Trabalho!

*Nara Andréa Franco Santos*

*Médica Veterinária- UEMA*

## O QUE É LEITE DE QUALIDADE?

É aquele leite produzido por búfalas sadias e bem alimentadas, que conserva as qualidades nutritivas ao longo de todas as etapas de sua obtenção e não apresenta riscos para a saúde humana quando consumido.

### FATORES QUE AFETAM A QUALIDADE DO LEITE:

- *presença de colostro\*;*
- *falta de higiene na ordenha e nos equipamentos usados;*
- *leite com mastite;*
- *demora no processo de resfriamento do leite;*
- *alimentação da búfala em produção.*

*\*Colostro – É o leite grosso, amarelado e cremoso, obtido na primeira ordenha após o parto. É muito rico em substâncias de defesa (anticorpos), as quais permitem ao bezerro recém-nascido defender-se do ataque de doenças.*



## ***CARACTERÍSTICAS DE UM BOM ORDENHADOR***

**O ordenhador deve ser cauteloso no manejo com as búfalas e realizar a mesma rotina durante todas as ordenhas. Um bom ordenhador deve adotar alguns procedimentos importantes para ajudar obter leite de qualidade, dentre eles:**

- **apresentar bons hábitos de higiene (roupa limpa, botas de borracha, cabelos e unhas cortadas);**
- **lavar as mãos antes e durante a ordenha e sempre que sujar as mãos;**
- **apresentar bom nível de conhecimento técnico.**



Fonte: [www.google.com.br](http://www.google.com.br)

## MASTITE OU MAMITE

É a inflamação da glândula mamária provocada por bactérias ou pancadas. Leite com alta contagem de células somáticas pode indicar que a vaca está com mastite. Quanto à forma de manifestação (grau de inflamação) a mastite pode ser clínica ou subclínica.

**Mastite é a doença mais importante que acomete as búfalas leiteiras, sendo uma doença que afeta diretamente o bolso do produtor e, deve ser olhada com mais cuidado, pois que é muito contagiosa. Uma búfala contaminada, poderá ser um fator de risco transmitindo essa doença para todo o rebanho**

**Mastite clínica:** é aquela possível de ser observada a olho nu. Observa-se inchaço, endurecimento e aumento de temperatura do quarto mamário afetado.

**Mastite subclínica:** é aquela que não pode ser observada a olho nu, ou seja, os sinais de inflamação não são observados.

### Atenção!

**Para cada caso de mastite clínica, estima-se a existência de 40 casos de mastite subclínica.**



**O úbere sadio produz leite de qualidade!**

## **Contagem de Células Somáticas (CCS)**

As células somáticas do leite são compostas principalmente de leucócitos (células “brancas” presentes no sangue e responsáveis pela defesa do organismo e que aumentam de número na presença de infecções) e também células provenientes da substituição natural do epitélio mamário. O número de células somáticas presentes no leite quantifica a reação inflamatória do úbere em resposta a traumas (pancadas e chifradas), a danos decorrentes de uma ordenha inadequada e à mastite. No final da lactação ocorre um aumento natural na CCS.

### **Fatores que causam aumento anormal da CCS:**

- Sala de ordenha suja e condições de estresse;
- Mastite e traumas;
- Problemas na ordenha (manual ou mecânica) devida à conformação dos tetos e úbere;
- Desequilíbrio alimentar;
- Funcionamento inadequado da ordenhadeira mecânica.



## **PREJUÍZOS CAUSADOS PELA MASTITE**

- ***Búfalas com mamite chega a produzir até 25% menos leite do que quando ela está sadia;***
- ***Ocorrem perdas também com desclassificação e descarte de leite, gastos com antibióticos e serviços veterinários, perdas de tetos e descartes e mortes de animais;***
- ***A mudança na composição do leite causada pela mastite afeta sua qualidade e interfere nos processos de fabricação dos produtos lácteos como o queijo e iogurte.***

### **CONTROLE DA MASTITE**

Para o controle da mamite é preciso esforço e dedicação!

A prevenção rigorosa consiste em:

- ordenha higiênica, cuidadosa e completa, evitando deixar leite no úbere;
- desinfetar os tetos antes (*pré-dipping*) e depois (*pós-dipping*) da ordenha;
- assegurar que animais comprados não estejam com mamite;
- descartar vacas que repetem mastite;

Para um tratamento correto, é preciso:

- Tratar todos os casos de mamite, consultando um profissional especializado. O tratamento deve ser feito imediatamente após a ordenha;
- Fazer anotações, identificando as vacas e os tetos que apresentaram mamite clínica ou subclínica, registrando a data de ocorrência, o nome do antibiótico e a data de sua aplicação.

# Manejo correto da ordenha

## Procedimentos iniciais:

- **Conduza os animais com tranquilidade para que se tenha um animal calmo, o que facilita o manejo e a descida do leite;**

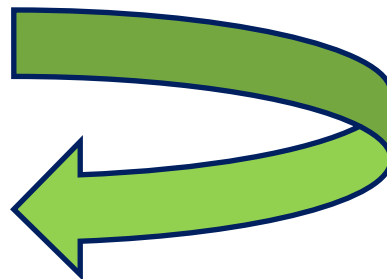


[www.google.com](http://www.google.com)

- **Reúna o material necessário: Balde, latão, filtro, caneca de fundo escuro, papel-toalha, balde com água clorada, corda ou peia e banquinho;**



Fonte: [www.google.com](http://www.google.com)



- **Verifique se os vasilhames usados para a ordenha estão limpos e secos;**
  
- **Use roupa limpa, ideal para a ordenha, botas de borracha e boné ou touca para cobrir os cabelos, evitando que eles caiam no leite;**
  
- **Prenda o banquinho próprio para ordenha à altura do quadril;**
  
- **Amarre as búfalas;**
  
- **Coloque o bezerro para apoiar;**  
**Isso ajuda na liberação de hormônios envolvidos no processo de descida do leite.**
  
- **Lave bem as mãos com água e sabão, as unhas devem estar sempre aparadas e limpas;**



[www.google.com](http://www.google.com)

Sabe-se que as búfalas sentem prazer de ficar em ambientes alagados, muitas vezes chegando ao curral muito sujas. Caso isso aconteça, é de extrema importância que se banhem essas búfalas antes da ordenha. Esse procedimento proporciona a esses animais conforto térmico, maior higiene, espanta ou elimina as moscas, além de aumentar a produção e a qualidade do leite. As búfalas na hora da ordenha devem estar enxutas. A umidade excessiva nos úberes, na hora da ordenha, facilita a contaminação dos tetos e do leite por bactérias.

## O que fazer antes de iniciar a ordenha

1º - **Teste de mastite clínica**, com a caneca de fundo escuro (também chamada de caneca telada), para observação de possíveis alterações no leite como coloração, grumos, pus e sangue;

Retire os três primeiros jatos de leite de cada teto em uma caneca de fundo escuro e observe o seu aspecto.



O leite alterado não pode ir para o latão ou tanque. O leite acumulado na caneca durante a ordenha deve ser descartado.



Resultado negativo no teste da caneca telada.

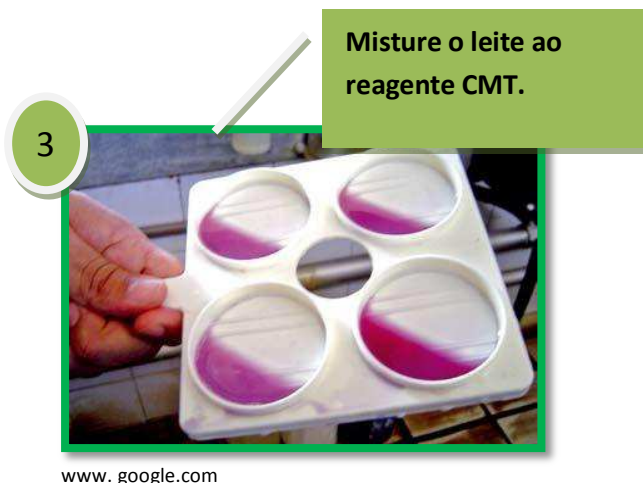
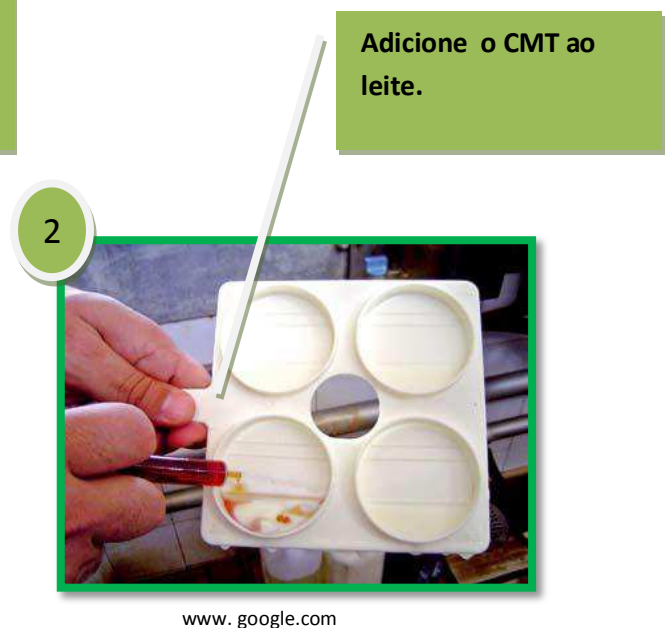
Se estiver alterado, com presença de grumos, pus, amarelo ou aquoso, é sinal de **mastite clínica**.



Mastite clínica é facilmente identificada na caneca telada!

## 2º - Teste de mastite subclínica

O teste conhecido como *California Mastitis Test* (CMT) é um teste que estima a contagem de células somáticas (CCS) do leite, é de fácil execução, barato e realizado nos quatro tetos. Este teste deve ser realizado mensalmente. Caso haja ocorrência frequente de mastite clínica, o CMT deve ser realizado de 15 em 15 dias. No entanto não deve ser usado no período de colostro e/ou no final da lactação, quando naturalmente ocorre um aumento fisiológico de leucócitos. A sequência de fotos abaixo mostra como deve ser feito este teste.



Resultado positivo para mastite subclínica: formação gelatinosa

**2° - Pré-dipping:** irá proporcionar melhor qualidade no leite. O sanitizante usado nos tetos das búfalas deve demorar tempo suficiente para matar as bactérias ali existentes (mínimo de 30 segundos). Posteriormente, seque bem os tetos com papel toalha, pois gotas de água podem cair no leite durante a ordenha e contaminá-lo.



Fonte: WWW. google. com



De preferência usar uma folha de papel toalha para cada teto, nunca esfregando esse de baixo para cima. Terminado esses procedimentos, inicie a ordenha manual ou coloca-se o conjunto de teteiras (no caso de ordenha mecânica).

### **3° - Retire o leite**

A retirada do leite deve ser de forma constante e sem interrupção. Utilize balde semi-aberto ou meia-lua, em bom estado de conservação e limpeza e evite que sujeiras caiam no balde durante a ordenha.

### **4° - pós- dipping**

Desinfete as tetas com produto apropriado, adquiridos para esta finalidade em lojas de produtos veterinários. Pode-se utilizar soluções a base de iodo glicerinado 0,5 a 1%, clorexidine 0,5 a 1%, hipoclorito a 4% ou ácido sulfônico a 1,94 %.

## **IMPORTANTE:**

**O LOCAL DE ORDENHA DEVE SER LIMPO, SECO, AREJADO E DISTANTE DE CHIQUEIROS, GALINHEIROS E FOSSAS, QUE FAVORECEM A PROLIFERAÇÃO DE MOSCAS.**

**DIARIAMENTE REMOVA OS ESTERCOS E LAVE A SALA DE ORDENHA COM ÁGUA CORRENTE, LAVE E DESIFENTE OS BALDES E OS LATÕES AO FINAL DA ORDENHA, MANTENDO-OS DE BOCA PARA BAIXO, EM LOCAL LIMPO E SECO.**

### **5° - Coe o leite**

Coe o leite utilizando filtro de nylon, aço inoxidável, alumínio, ou plástico atóxico, nunca em pano. O latão e o filtro devem estar em bom estado de conservação e limpeza.



Fonte: [www.google.com](http://www.google.com)

### **6° - Forneça alimentação para as búfalas após a ordenha**

O orifício dos tetos permanece aberto e micro-organismos podem entrar na glândula mamária e causar mastite. O orifício se fecha completamente depois de duas horas.

## 7° - Resfrie o leite

Entregue ou coloque o leite o mais rápido possível para resfriar. O leite deve ser refrigerado máximo, três horas após a ordenha. De acordo com a legislação (Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura, e Abastecimento-MAPA, 2011), o leite deve ser conservado em tanque de refrigeração em temperatura de 4°C.



Fonte: [www. google.com](http://www.google.com)

**Leite resfriado paralisa a multiplicação das bactérias, assim a qualidade do leite é mantida!**



As bactérias estão presentes na água, no ar, na terra, no capim, nos pêlos e nos tetos da búfala, nas fezes, na urina, na roupa e nas mãos do ordenhador, nos insetos e nos equipamentos de ordenha sujos. Algumas estragam os alimentos, é o caso das que se alimentam do leite. O leite atacado pelas bactérias fica com sua qualidade ruim.





## **9° - Realize a limpeza do local de ordenha, equipamentos e utensílios**

Mantenha o local de ordenha sempre limpo e seco. Terminada a ordenha lave cuidadosamente os latões, baldes e coadores. Equipamentos e utensílios mal lavados são causas importantes da contaminação do leite na fazenda. Não deixe restos de leite secarem no balde ou nos latões.

*Diariamente, antes de colocar o leite no tanque de resfriamento, faça a desinfecção do tanque com uma solução clorada. Em seguida, enxágüe muito bem para escorrer toda a água e eliminar completamente o resíduo da solução clorada. O tanque deve estar completamente seco antes de receber novo carregamento de leite.*

### **Ordenha mecânica**

As búfalas aceitam bem a ordenhadeira mecânica sendo utilizados os mesmos equipamentos desenvolvidos para o gado bovino devendo, porém, ser respeitadas as recomendações do fabricante do equipamento de ordenha com relação à limpeza, manutenção e troca de peças, principalmente componentes plásticos e de borracha, sujeitos a desgaste natural.

## **IMPORTANTE:**

**Antibióticos são medicamentos usados para tratar doenças infecciosas causadas por bactérias. A infecção mais comum tratada com antibiótico em vacas é a mamite. Quando se aplica antibiótico em uma búfala, o leite que ela produz passa a conter resíduos desse antibiótico durante um determinado tempo. Durante esse tempo, o leite não deve ser aproveitado ou vendido. É muito importante seguir as informações do fabricante quanto ao período de carência do produto.**

**O leite com antibiótico não deve ser aproveitado, porque pode causar alergias em quem beber o leite; desenvolver resistência em bactérias causadoras de doenças; prejudicar o crescimento dos fermentos usados na fabricação de queijos e iogurtes, trazendo prejuízos às indústrias e ao produtor.**

## **Você sabia?**

***A contaminação do leite durante a ordenha e as condições de armazenamento (tempo e temperatura) até chegar na indústria de laticínios são os principais fatores da perda de qualidade do leite.***

***Experiências têm mostrado que medidas simples podem reduzir de 40 até 85% a contaminação microbiana inicial do leite.***

### **ATENÇÃO!**

**Não mande para o laticínio:**

- 1. leite de búfalas com mastite;**
- 2. leite de búfalas tratadas com medicamentos que possam ser eliminados pelo leite;**
- 3. leite que fica na caneca telada de fundo preto;**
- 4. colostro.**

## **REFERÊNCIAS**

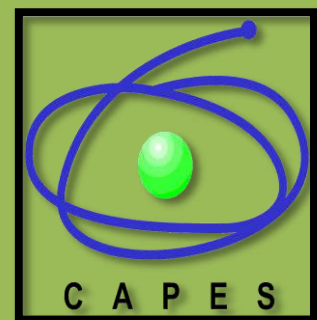
ALVARES, B. L. Limpeza de equipamentos de ordenha e tanques. **Rev. Balde Branco**, 2006. Disponível em: < [WWW.cienciadoleite.com.br](http://WWW.cienciadoleite.com.br) >. Acesso em: 20 maio de 2012.

BRITO, J. R. F. et al. **Segurança e qualidade do leite**. In: SANTOS, C. A. dos et al (ed). EMBRAPA Gado de Leite: 30 anos de pesquisa e conquistas para o Brasil. Juiz de Fora: EMBRAPA, 2006. p. 155 – 172.

BRITO, J. R. F. et al. **Mastite de A à Z**. In: DIAS, J. C.; BRITO, J. R. F. Sanidade animal. Juiz de Fora: EMBRAPA, [19--] p. 7 – 14.

DÜRR, J. W. **Como produzir leite de alta qualidade**. Brasília: SENAR, 2005.

## REALIZAÇÃO:



**ANEXOS**

# ANEXO A

## NORMAS DA REVISTA



CIÊNCIA ANIMAL  
BRASILEIRA



### DIRETRIZES PARA AUTORES

Os trabalhos podem ser redigidos em português, inglês. Os nomes dos autores, bem como a filiação institucional de cada um dos mesmos, devem ser inseridos nos campos adequados a serem preenchidos durante a submissão, e não devem aparecer no arquivo. Ciência Animal Brasileira sugere que o número máximo de autores por artigo seja de 6 (seis). Artigos com número superior a 6 (seis) serão considerados exceções e avaliados pelo Conselho Editorial e, se necessário, solicitada a correção. O não atendimento de tal proposta pode implicar em recusa de sua publicação. Sugere-se um número máximo de 20 páginas e as figuras, gráficos e tabelas devem ser colocados no corpo do texto onde forem citados. É importante ressaltar que pesquisas feitas com animais devem citar a aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais da instituição onde foi realizada a pesquisa. A falta dessa aprovação impede a publicação do artigo. Os textos devem ser organizados da seguinte forma:

Para submissões em português:

**Título em português:** Fonte Times New Roman 14, caixa alta, centrado, negrito; **Resumo:** Fonte Times New Roman 11, espaço 1, justificado, com um máximo de 200 palavras;

**Palavras-chave:** idem, e no máximo 5 palavras chave;

**Título em inglês:** Fonte Times New Roman 12, caixa alta, centrado;

**Abstract** (e não Summary): Fonte Times New Roman 11, espaço 1, justificado;

**Keywords:** idem

**Introdução:** Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

**Material e Métodos:** Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

**Resultados e Discussão:** Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5 (Preferivelmente evitar a separação destes tópicos)

**Conclusões:** Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

**Agradecimentos:** (opcional) Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

**Referências:** (e não bibliografia) Usar fonte Times New Roman 11, espaço 1 entre linhas e colocar espaço 6 pontos acima e abaixo do parágrafo. As referências devem estar em ordem alfabética pelo sobrenome do primeiro autor, seguindo a NBR 6023, da ABNT. Não colocar nenhum tipo de recuo no parágrafo.

Para as submissões em língua inglesa, a tipografia e espaçamentos são os mesmos, na seguinte sequência:

**Título em inglês (Title);**

**Abstract;**

**Keywords;**

**Título em português (obrigatório);**

**Resumo em português (obrigatório);**

**Palavras-chave;**

**Introduction;**

**Material and Methods;**

**Results and Discussion;**

**Conclusions;**

**Acknowledgments (opcional)**

**References**

**Artigos do tipo Nota Científica, Relato de Caso e similares** não estão sendo aceitos para submissão. **Artigos de Revisão de Literatura** somente serão publicados quando solicitados por convite do Conselho Editorial.

A utilização de referências a partir de resumos simples ou expandidos e trabalhos completos em anais de eventos é, em muitas ocasiões, de difícil recuperação. Solicitamos que os autores reduzam ao máximo o número desse tipo de citação e, quando o fizer, obrigatoriamente, citem as páginas eletrônicas para recuperação desses documentos.

Com relação às teses, dissertações, monografias e documentos semelhantes também deve ser seguido o mesmo procedimento, pois existe o cadastro nacional de teses da CAPES e os bancos locais das universidades que publicam esses



documentos no formato .pdf. Documentos dessa natureza com mais de cinco anos de conclusão costumam ser de difícil resgate. Além do mais, costumam gerar artigos em revistas científicas e técnicas, cujo acesso, normalmente, é mais fácil. Solicita-se, também, priorizar referências de periódicos, e não de livros-texto. O editor científico pode solicitar essas informações no momento de sua editoração. Seu atendimento agilizará a sua publicação. O processo de resgate fácil das informações é o ponto principal de uma referência bibliográfica, técnica ou eletrônica.

### **Exemplos de referências**

#### Trabalho em Periódicos:

PRADO, O.P.P.; ZEOULA, L.M.; MOURA, L.P.P. FRANCO, S. L.; PRADO, I. N. do; JACOBI, G. Efeito da adição de própolis e monensina sódica na digestibilidade e características ruminais em bubalinos alimentados com dietas a base de forragem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.9, p.2055-2065, 2010.

#### Livros:

BURLEY, R.W.; VADEHRA, D.V. **The Avian Egg**: Chemistry and Biology. John Wiley and Sons, New York, NY, 372p, 1989.p 68–71.

## CONDIÇÕES PARA SUBMISSÃO

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista.
2. Os autores devem estar cientes de que são os responsáveis diretos por todo o conteúdo de seu artigo.
3. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapasse os 2MB). No arquivo da submissão, excluir apenas os nomes e identificação dos autores, todos os outros elementos (título em português e em inglês, resumo, palavras chave, abstract e keywords) devem permanecer no arquivo. O preenchimento do cadastro inclui todos os autores envolvidos (máximo de 6 autores), selecionando o contato principal. Atentar para o item 6 destas normas.
4. Todos os endereços de URLs no texto (Ex.: <http://www.ibict.br>) estão ativos e prontos para clicar.
5. O texto está em espaço 1,5 com linhas numeradas; usa uma fonte de 12-pontos Times New Roman; emprega itálico ao invés de sublinhar (exceto em endereços URL); com figuras e tabelas inseridas no texto, e não em seu final.
6. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em **Diretrizes para Autores**, na seção Sobre a Revista.
7. A identificação de autoria deste trabalho foi removida do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista,

caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos). Os nomes de TODOS os autores, com sua respectiva identificação institucional, foi cadastrada nos metadados da submissão, usando a opção incluir autor. Em caso de citação de autores, "Autor" e ano são usados na bibliografia, ao invés de Nome do autor, título do documento, etc.

8. Nos casos de artigos que envolvam pesquisa com animais, é obrigatória a inserção da aprovação pelo Comitê de Ética da instituição de origem do trabalho

## DECLARAÇÃO DE DIREITO AUTORAL

Autores que publicam nesta revista concordam com os seguintes termos:

- a. Autores mantêm os direitos autorais e concedem à revista o direito de primeira publicação, com o trabalho simultaneamente licenciado sob a **Licença Creative Commons Attribution** que permite o compartilhamento do trabalho com reconhecimento da autoria e publicação inicial nesta revista.
- b. Autores têm autorização para assumir contratos adicionais separadamente, para distribuição não-exclusiva da versão do trabalho publicada nesta revista (ex.: publicar em repositório institucional ou como capítulo de livro), com reconhecimento de autoria e publicação inicial nesta revista.
- c. Autores têm permissão e são estimulados a publicar e distribuir seu trabalho online (ex.: em repositórios institucionais ou na sua página pessoal) a qualquer ponto antes ou durante o processo editorial, já que isso pode gerar alterações produtivas, bem como aumentar o impacto e a citação do trabalho publicado (Veja **O Efeito do Acesso Livre**).

## POLÍTICA DE PRIVACIDADE

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou à terceiros.

## ANEXO B

### NORMAS DA REVISTA

#### PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <[jurgen.dobereiner@terra.com.br](mailto:jurgen.dobereiner@terra.com.br)>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word. Havendo necessidade (por causa de figuras “pesadas”), podem ser enviados em CD pelo correio, com uma via impressa, ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Caixa Postal 74.591, Seropédica, RJ 23890-000. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

**Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br)) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.**

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peerreview*).

**NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (*page charge*) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.**

**1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:**

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor(es)** deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o **ABSTRACT** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o **RESUMO** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br)).

## **2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:**

a) os trabalhos devem ser submetidos **segundo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br))**. A digitalização deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2 cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso)**;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”;** a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada **isenta do uso de caixa alta**, com os nomes científicos em itálico (grifo), **e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

**3. As Figuras** (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) **originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica**. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

**4. As legendas explicativas das Figuras** conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e **serão apresentadas no final do trabalho.**

**5. Os Quadros deverão ser** explicativos por si mesmos e **colocados no final do texto.** Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. **Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro;** as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.