

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

CARLA AUGUSTA DE MENEZES

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE
Staphylococcus spp. ISOLADOS DA MASTITE BOVINA**

ROLIM DE MOURA

2017

CARLA AUGUSTA DE MENEZES

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE
Staphylococcus spp. ISOLADOS DA MASTITE BOVINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Ciências Ambientais, sob a orientação da Dra. Juliana Alves Dias.

ROLIM DE MOURA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Fundação Universidade Federal de Rondônia
Gerada automaticamente mediante informações fornecidas pelo(a) autor(a)

M543c Menezes, Carla Augusta de.

Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos de
Staphylococcus spp. isolados da mastite Bovina / Carla Augusta de Menezes. -
- Rolim de Moura, RO, 2017.

51 f. : il.

Orientador(a): Prof.^a Dra. Juliana Alves Dias

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Ambientais) - Fundação
Universidade Federal de Rondônia

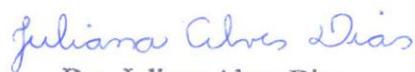
1. Mastite bovina.. 2. Resistência a antimicrobianos. . 3. Staphylococcus
spp.. I. Dias, Juliana Alves. II. Título.

CDU 637.12

**Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus* spp.
isolados da mastite bovina**

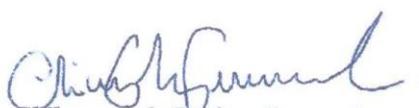
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Ciências Ambientais, sob a orientação da Dra. Juliana Alves Dias.

APROVADA: 31 de julho de 2017.



Dra. Juliana Alves Dias

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Orientadora)



Dr. Cléberston de Freitas Fernandes

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Membro Interno)



Prof^a. Dra. Audrey Bagon

Faculdades Integradas Aparício Carvalho (Membro Externo)

Dedico aos meus maiores incentivadores meu filho Adiv Lucas, a minha sobrinha Maria Júlia e *in memoriam* a Iracema Rodrigues Silva.

AGRADECIMENTOS

A Deus...

A minha família pelo amor incondicional.

Ao Dr. José Roberto Vieira Junior, em especial, desde o nosso primeiro contato e por apresentar-me a oportunidade de conhecer novas descobertas para minha construção profissional. Apoiando-me e acolhendo-me com paciência em todos os momentos que precisei de uma palavra de conforto. Suas sábias lições de afeto, dedicação, paciência e compreensão são os principais adjetivos que o qualificam positivamente. Obrigado por contribuir para a realização desse sonho. Sou grata de coração, muito obrigada!

A Dra. Deusilene Souza Vieira Dallacqua, pelo carinho.

A Dra. Juliana Alves Dias, pela oportunidade e valiosos ensinamentos.

A Dra. Luciana Gatto Brito pelo carinho e incentivo, exemplo profissional.

Ao Dr. Victor Mouzinho Spinelli, pelo profissionalismo, paciência, cumplicidade em seus ensinamentos.

Aos estagiários, doutorandos e mestrandos pelas boas risadas na sala dos estagiários e cochichos na biblioteca.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação Ciências Ambientais - PGCA, em especial a Clariana, Iara, Izabela, Charly, Taína, Elize, Cristina, Naiara, Karine.

As minhas amigas Denise Oliveira, Letícia Andrade, Mariana Garcia e Cássya

Fonseca, pela compreensão, carinho, incentivo e momentos de descontração nesse período do mestrado.

Ao longo desse tempo pela família formada e pessoas especiais que contribuíram com carinho e ternura.

Aos funcionários da Embrapa pelo apoio e incentivos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais – PGCA pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Rondônia pela oportunidade e parceria.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

A todos os amigos incomuns um salve galera!

...Fazer valer a pena tudo o que a gente conquistou...

(Anderson Freire)

RESUMO

A mastite bovina é a doença infecciosa mais frequente e economicamente relevante em rebanhos leiteiros. Dentre os patógenos causadores de infecção intramamária no Brasil, o gênero *Staphylococcus* spp. é o mais prevalente e responsável por grandes perdas prejuízos à pecuária leiteira. Infecções causadas por *Staphylococcus* spp. podem ter longa duração, com tendência a se tornarem crônicas, com baixa taxa de cura e grande perda na produção de leite. O uso de antibióticos para tratamento dos casos clínicos e na terapia da vaca seca constitui componente essencial das estratégias estabelecidas para o controle da mastite. Entretanto, o uso incorreto e indiscriminado de antimicrobianos é um dos principais fatores que influenciam no aumento da resistência. Estudos avaliando a resistência do gênero *Staphylococcus* spp. isolados de mastite em diferentes regiões do Brasil, demonstraram resultados variados e com aumento crescente do padrão de resistência. Considerando a importância socioeconômica da pecuária leiteira para o estado de Rondônia e os estudos demonstrando a importância do gênero *Staphylococcus* spp. na epidemiologia da mastite, este trabalho teve o objetivo de identificar o perfil de resistência de *Staphylococcus* spp. isolados de rebanhos leiteiros localizados nas três principais microrregiões produtoras de leite do estado. Dos 161 animais avaliados, foram obtidos 68 isolados de *Staphylococcus aureus*, 29 *Staphylococcus* spp. coagulase negativo (SCN) e 11 *Staphylococcus* spp. coagulase positivo (SCP). Os resultados demonstraram frequência de resistência que variaram de 0 a 13,8% para *S. aureus*, 0 a 72,7 % SCP e 0 a 31,0% SCN, sendo a maior para penicilina, seguido da ampicilina e tetraciclina. Dos isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes, foram observados dois padrões de resistência prevalentes, ampicilina e penicilina (n=12) e penicilina, ampicilina e tetraciclina (n=7). Os resultados demonstram maior frequência de resistência para tetraciclina e betalactâmicos, antibióticos amplamente utilizados para o controle da mastite no estado.

Palavras-chave: Mastite bovina. Resistência a antimicrobianos. *Staphylococcus* spp.

ABSTRACT

Bovine mastitis is the most frequent and economically relevant infectious disease in dairy cattle. Among the pathogens that cause intramammary infection in Brazil, the genus *Staphylococcus* spp. is the most prevalent and responsible for large losses to dairy farming. Infections caused by *Staphylococcus* spp. can be long, with a tendency to become chronic, with low cure rate and great loss in milk production. The use of antibiotics for the treatment of clinical cases and the treatment of dry cow constitutes an essential component of the established strategies for the control of mastitis. However, the incorrect and indiscriminate use of antimicrobials is one of the key factors that influence the increase in resistance. Studies evaluating the resistance of the genus *Staphylococcus* spp. isolates from bovine mastitis in different regions of Brazil have demonstrated varying results and with increasing resistance pattern. Considering the socioeconomic importance of dairy farming to the state of Rondônia and the studies demonstrating the importance of the genus *Staphylococcus* spp. in the epidemiology of mastitis, the objective of this study was to identify the profile of resistance of *Staphylococcus* spp. isolates from dairy cattle located at the three main producing milk regions in the state. Of 161 animals evaluated, 68 isolates of *Staphylococcus aureus*, 29 coagulase-negative *Staphylococcus* spp. (CNS) and 11 coagulase-positive *Staphylococcus* spp. (CPS) were obtained. The results showed a frequency of resistance that ranged from 0 to 13.8% for *S. aureus*, 0 to 72.7 % for CPS and 0 to 31.0% for CNS, being the largest for penicillin, followed by ampicillin and tetracyclines. From the isolates of *Staphylococcus* spp. strains, two patterns of resistance prevalent were observed: ampicillin and penicillin (n=12) and, penicillin, ampicillin and tetracycline (n=7). The results show a higher frequency of resistance to tetracyclines and betalactams, antibiotics that are widely used for the control of mastitis in the state.

Key words: Bovine mastitis. Resistance to antimicrobial agents. *Staphylococcus* spp.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Produção de leite (milhões de litros) dos estados da região Norte, 2015..... | 14 |
| Figura 2 - Produção de leite (milhões de litros) das principais microrregiões produtoras de leite do estado de Rondônia, 2015..... | 14 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Requisitos microbiológicos e de contagem de células somáticas no leite cru refrigerado para a região Norte, de acordo com a IN 51..... | 16 |
| Tabela 2 - Percentual de amostras que atenderam os padrões mínimos exigidos para os indicadores higiênico-sanitários, estabelecidos na IN 51..... | 17 |
| Tabela 3 - Vigência e limites para os requisitos microbiológicos e contagem de células somáticas no leite cru refrigerado para a região Norte, de acordo com a IN 62..... | 17 |
| Tabela 4 - Características das propriedades leiteiras avaliadas, Rondônia, 2014..... | 29 |
| Tabela 5 - Características do manejo da ordenha e controle da mastite nas propriedades avaliadas, Rondônia, 2014..... | 30 |
| Tabela 6 - Variação da contagem de células somáticas (x 1.000/mL) de acordo com a presença de isolamento de <i>S. aureus</i> , SCP e SCN em amostras de leite, Rondônia, 2013..... | 31 |
| Tabela 7 - Classificação de sensibilidade e resistência dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva e negativa a onze antimicrobianos, Rondônia 2014..... | 32 |
| Tabela 8 - Padrão de resistência a antimicrobianos de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase negativo e positivo isolados de mastite bovina, Rondônia, 2014..... | 33 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP – Ampicilina
CCS – Contagem de Células Somáticas
CCSLT – Contagem de Células Somáticas Leite de Tanque
CFE – Cefalexina
CFT - Ceftiofur
CLI - Clindamicina
CMT – California Mastitis Test
CTB – Contagem de Total de Bactérias
ENR – Enrofloxacina
ERI – Eritromicina
GEN – Gentamicina
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDARON – Agência de Defesa Sanitária Agrosilvopastotil do Estado de Rondônia
IDF – International Dairy Federation
IN 37 – Instrução Normativa número 37
IN 51 - Instrução Normativa número 51
IN 62 – Instrução Normativa número 62
IN 7 – Instrução Normativa número 7
LQL – Laboratório de Qualidade do Leite
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NEO – Neomicina
NMC – National Mastitis Council
OXA – Oxacilina
PEN – Penicilina
RBQL - Brasileira de Controle de Qualidade do Leite
RBQL – Rede Brasileira de Qualidade do Leite
SCN – *Staphylococcus* coagulase negativo
SCP – *Staphylococcus* coagulase positivo
TET - Tetraciclina

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO GERAL..... | 13 |
| 1.1 Produção de leite..... | 13 |
| 1.2 Qualidade do leite..... | 15 |
| 1.3 Mastite bovina e CCS..... | 17 |
| 1.4 Epidemiologia da mastite bovina..... | 19 |
| 1.5 Medidas de prevenção e controle da mastite..... | 20 |
| 1.6 Resistência a antimicrobianos..... | 20 |
| 2 OBJETIVO..... | 22 |
| 3 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE <i>Staphylococcus</i> spp. ISOLADOS DE MASTITE BOVINA EM REBANHOS LEITEIROS DE TRÊS MICRORREGIÕES DO ESTADO DE RONDÔNIA..... | 23 |
| RESUMO..... | 23 |
| ABSTRACT..... | 24 |
| 3.1 Introdução..... | 25 |
| 3.2 Material e Métodos..... | 26 |
| 3.2.1 População estudada..... | 26 |
| 3.2.2 Coleta de amostras e dados..... | 26 |
| 3.2.3 Análise microbiológica e testes de susceptibilidade a antimicrobianos..... | 26 |
| 3.2.4 Determinação da contagem de células somáticas..... | 27 |
| 3.2.5 Análise de dados..... | 27 |
| 3.3 Resultados..... | 28 |
| 3.4 Discussão..... | 33 |
| 3.5 Conclusão..... | 36 |
| 4 CONCLUSÕES GERAIS..... | 37 |
| REFERÊNCIAS..... | 38 |
| ANEXO..... | 46 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Produção de Leite

A produção de leite no Brasil tem apresentado crescimento desde a década 90. Em 2015, a produção de leite brasileira foi de 35 bilhões de litros, colocando o Brasil em sexta posição no *ranking* mundial de produção de leite atrás de países como União Europeia, Índia, Estados Unidos, China e Rússia (IBGE, 2015).

A região norte do Brasil é formada por sete unidades da federação, com uma área de 3.853.676.948 Km², que representa 45% do território brasileiro. É uma fronteira emergente de produção de leite no país, caracterizada pela produção de base familiar (IBGE, 2006), o qual é responsável por 73% da produção total. Deste grupo se destacam os produtores tradicionais e assentados da reforma agrária, o qual remete à importância econômica e social da atividade na região.

Nas últimas duas décadas, a produção de leite na região tem demonstrado crescente expansão. No período de 1990 a 2000, a produção anual de leite estimada em 555 milhões de litros atingiu o volume de 1,0 bilhão de litros. Em 2003 a produção foi de 1,5 bilhão e 1,8 bilhão de litros em 2015, representando 5,2 % da produção nacional. O estado de Rondônia é o maior produtor da região com uma produção de 817 milhões de litros, seguido pelo estado do Pará e Tocantins com produção de leite (em litros) de 567 milhões e 323 milhões, respectivamente (IBGE, 2015). Os dados de produção dos estados da região Norte estão apresentados na Figura 1. A microrregião de Ji-Paraná destaca-se como maior produtora de leite do estado e região norte, seguida das microrregiões de Porto Velho e Cacoal (Figura 2).

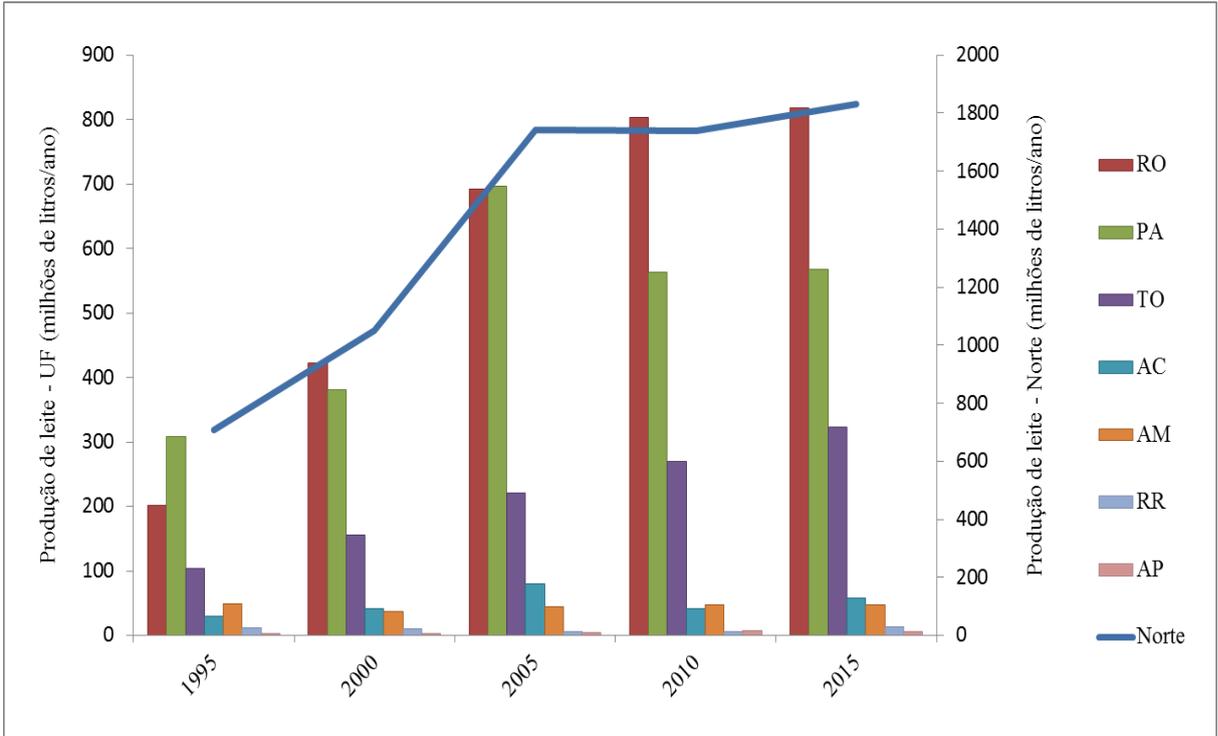


Figura 1 - Produção de leite [...] milhões de litros dos estados da região Norte, conforme o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2015) [...].

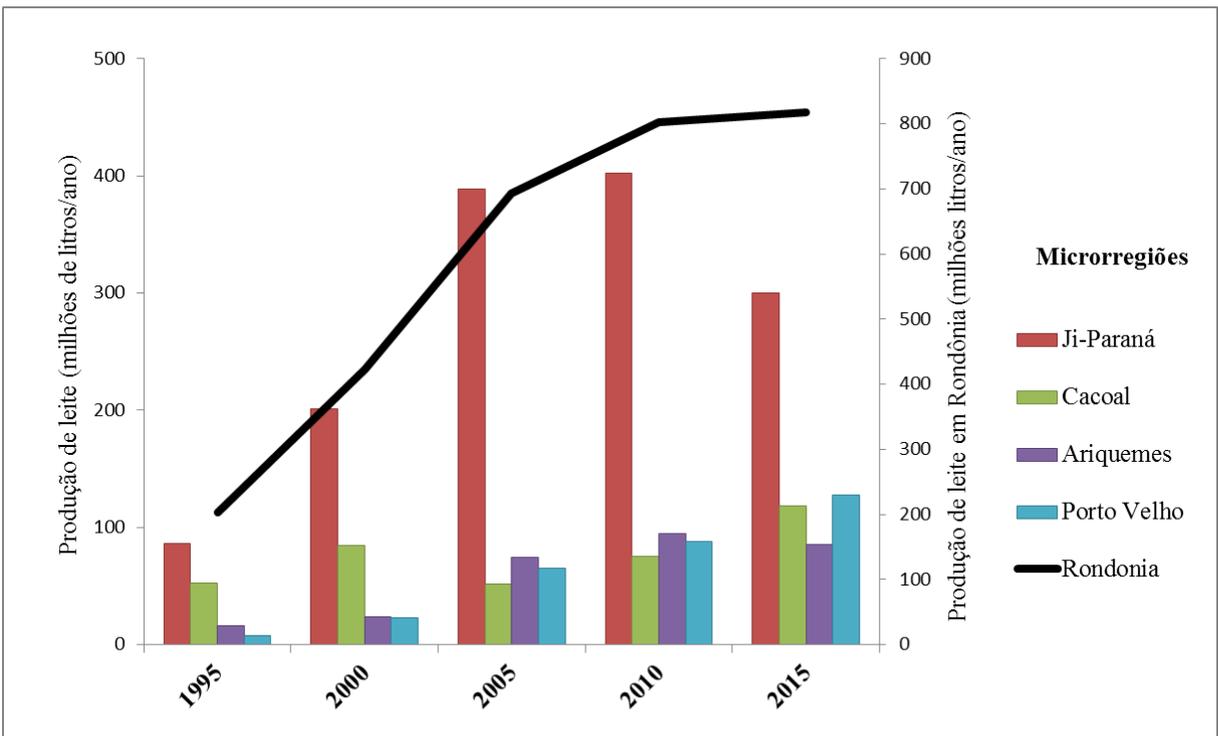


Figura 2 - Produção de leite [...] milhões de litros das principais microrregiões produtoras de leite do estado de Rondônia, conforme o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2015) [...].

A produção de leite no estado de Rondônia possui importância social e econômica e constitui uma importante fonte de geração e distribuição de renda. A produção de leite é caracterizada como de base familiar, onde 34 mil produtores estão diretamente envolvidos com esta atividade (IDARON, 2013). A produção média por propriedade é de 65,8 litros/dia e os animais apresentam produtividade média de 3,3 litros/vaca/dia (IBGE, 2015). De acordo com os dados do Idaron (2013), 84% dos produtores produzem menos de 100 litros de leite/dia e as propriedades são caracterizadas por baixo padrão tecnológico, baixa adoção de boas práticas agropecuárias, baixo padrão genético e longo intervalo entre partos (CARVALHO, 2012; DIAS et al., 2013; IDARON, 2013; SEBRAE, 2015).

1.2 Qualidade do Leite

Dentro dos aspectos envolvendo a cadeia produtiva, a qualidade do leite é um ponto de extrema importância devido a fatores como, a garantia de alimento seguro e com qualidade nutricional para o consumidor, aumento da vida de prateleira e rendimento industrial de derivados lácteos. A expansão da pecuária leiteira observada nos últimos anos no Brasil não correspondeu à melhoria da qualidade da matéria prima. A baixa qualidade do leite e a desestruturação da cadeia produtiva foram alvo de discussões em vários grupos de pesquisa e instituições no país. Em 1996, por iniciativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e de representantes da comunidade científica foi criado o “Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite” – PNQL (OLIVEIRA et al., 2000).

Este programa teve início em função de resultados obtidos em diversos estudos, que comprovaram as perdas econômicas significativas da cadeia produtiva do leite em decorrência, principalmente, de elevada acidez do leite e do alto índice de incidência de mastite nos rebanhos brasileiros. Além destes fatores, foram consideradas as perdas no transporte, na transformação da matéria-prima e a rápida deterioração dos produtos acabados devido à baixa qualidade do leite (OLIVEIRA et al., 2000).

A partir disso, em 2002, com o objetivo de padronizar o leite produzido no país, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou a Instrução Normativa 51 (IN51), que determina as normas de produção, identidade e qualidade do leite, além de regulamentar a coleta de leite cru refrigerado na propriedade e seu transporte a granel ao laticínio (BRASIL, 2002). Neste mesmo ano, foi instituída a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite (RBQL) pela Instrução Normativa 37 (IN

37), com a instalação de Laboratórios de Qualidade do Leite (LQL) em alguns estados do Brasil com a finalidade de avaliar e monitorar os indicadores de qualidade do leite dos rebanhos brasileiros dando suporte à implantação da IN 51.

A qualidade do leite é avaliada por parâmetros de composição (gordura, proteína, extrato seco desengordurado) e por padrões higiênico-sanitários que refletem a saúde dos animais, com ênfase na mastite, ausência de resíduos químicos e obtenção e armazenamento do leite em condições adequadas de higiene e refrigeração. No aspecto higiênico-sanitário dois parâmetros são universalmente adotados: a contagem total de bactérias (CTB) e a contagem de células somáticas (CCS).

A CCS é reconhecida como indicador de qualidade higiênico sanitário do leite cru, sendo utilizada para avaliar a saúde da glândula mamária. Os requisitos definidos na IN 51 para a contagem de células somáticas estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Requisitos microbiológicos e de contagem de células somáticas no leite cru refrigerado para a região Norte, de acordo com a IN 51

| Requisitos | Vigência e Limites | | |
|--|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | 01.07.2007 a 01.07.2010 | 01.07.2010 a 30.06.2012 | A partir de 01.07.2012 |
| Contagem de Células Somáticas – células/mL | 1.000.000 | 750.000 | 400.000 |
| Contagem Total de Bactérias- UFC/mL | 1.000.000 | 750.000 | 100.000 |

Fonte: Adaptado de: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Tipo B, Tipo C e Cru refrigerado. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção I, p. 13. 2002.

De acordo com a IN 51 para a região Norte, as amostras de leite cru de tanques devem ser encaminhadas mensalmente para análise dos indicadores higiênico-sanitários em laboratório de qualidade do leite pertencentes à RBQL. A análise destes resultados demonstrou que, o percentual de amostras de leite que atendem os limites de CCS e CTB não sofreram alterações significativas desde o início da vigência da IN51 (MAPA, 2011). Em 2007, cerca de 10 e 25% dos produtores analisados pelos laboratórios da RBQL não atendiam aos padrões de 1.000.000 para CCS e CTB, respectivamente. Em 2009, um levantamento feito pela RBQL mostrou que, de aproximadamente 1,7 milhão de amostras, 21% e 42% não atenderam ao limite de 750.000 de CCS e CTB, respectivamente. Na Tabela 2 estão demonstrados os resultados da avaliação dos indicadores de qualidade do leite realizada no período de 2007 a 2010 em laboratórios pertencentes à RBQL (média nacional).

Tabela 2 - Percentual de amostras que atenderam os padrões mínimos exigidos para os indicadores higiênico-sanitários, estabelecidos na IN 51

| Ano de Avaliação | CCS (Células/mL) | CTB (UFC/mL) |
|------------------|------------------|--------------|
| 2007 | 82,2 | 55,7 |
| 2008 | 81,6 | 56,1 |
| 2009 | 78,4 | 57,6 |
| 2010 | 77,1 | 63,8 |
| Média | 79,8 | 58,3 |

Fonte: Adaptado de: MAPA, relatório dos laboratórios da Rede de Brasileira de Qualidade do Leite (RBQL) 2011. Disponível em: <<http://www.cbql.com.br/rede-brasileira-laboratorio-controle-qualidade-leite.php>>. Acesso em: 10 de abril de 2017.

Considerando esta situação, foi instituída a Instrução Normativa nº 62 (IN 62) (BRASIL, 2011), que define limites e prazos gradativos para os indicadores higiênico-sanitários, e mais quatro anos para o atendimento do menor limite estabelecido para o país. A tabela 3 mostra os limites e prazos para atendimento da Contagem Total de Bactérias e Contagem de Células Somáticas definidos pela IN 62 para as regiões Norte e Nordeste.

Tabela 3 - Vigência e limites para os requisitos microbiológicos e contagem de células somáticas no leite cru refrigerado para a região Norte, de acordo com a IN 62

| Requisitos | Vigência e limites | | | |
|--|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | 01.07.2010 a 31.12.2012 | 01.01.2013 a 30.06.2015 | 01.07.2015 a 30.06.2017 | A partir de 01.07.2017 |
| Contagem de Células Somáticas – células/mL | 750.000 | 600.000 | 500.000 | 400.000 |
| Contagem Total de Bactérias- UFC/mL | 750.000 | 600.00 | 300.000 | 100.000 |

Fonte: Adaptado de: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Dispõe sobre regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2011.

A IN 62 foi alterada em 2016, sendo publicada a Instrução Normativa nº 7 (IN 7), que prorroga o prazo de atendimento ao menor limite dos indicadores higiênico-sanitários para 01/07/2019 para os estados da região Norte/Nordeste (BRASIL, 2016).

1.3 Mastite bovina e CCS

A CCS é o indicador geral da saúde do úbere e é utilizada como indicador universal da qualidade do leite. Embora vários fatores possam estar associados à variação na CCS, a

ocorrência de mastite é considerada o principal fator (HARMON, 1994).

As células somáticas são constituídas principalmente por leucócitos e tem por objetivo a defesa do organismo. Na glândula mamária sadia, os tipos celulares predominantes são os macrófagos (35%-79%), seguido dos linfócitos (16%-28%), neutrófilos (3%-26%) e células epiteliais (2%-15%) (PAAPE; TUCKER, 1966). A CCS na glândula mamária sadia varia de 20.000 a 50.000 células/ml, entretanto considera-se o valor limite de até 100.000 células/mL para ausência de infecção intramamária. Avaliações realizadas por Dohoo e Leslie (1991) demonstraram que o limite de 200.000 células/mL foi o mais indicado para estimar nova infecção intramamária. A CCS em leite de tanque (CCSLT) é uma medida indireta do percentual de quartos mamários infectados no rebanho, obedecendo à relação diretamente proporcional entre a contagem de células somáticas e o número de quartos mamários infectados no rebanho (PHILPOT; NICKERSON, 1991).

A mastite bovina é a doença infecciosa mais prevalente em vacas leiteiras e representa grande importância econômica devido à redução da produção, gastos com tratamento e descarte de animais, com impacto negativo na atividade leiteira. O leite proveniente de vacas com mastite diminui a qualidade do produto final pela diminuição dos teores de caseína, gordura, lactose e alterações da atividade das proteínas e gorduras. A mastite é a inflamação da glândula mamária causada por microrganismos, como bactérias, fungos, leveduras e algas (RADOSTITS, 2002).

A mastite pode ser classificada em ambiental ou contagiosa, de acordo com os patógenos causadores. A mastite contagiosa geralmente é causada por microrganismos que colonizam a glândula mamária e podem ser transmitidos a outros animais durante a ordenha, por equipamentos de ordenha e ordenhadores. Os principais patógenos da mastite contagiosa são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Mycoplasma*, *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) (BRITO, 2009). A mastite ambiental é causada por microrganismos que estão localizados no ambiente do animal, tetos, úbere ou equipamentos de ordenha contaminados por esses agentes (GEORGE et al., 2008). Os agentes envolvidos na mastite ambiental são *Escherichia coli*, *coliformes*, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus spp* e outros *Streptococcus* do ambiente (BRITO, 2009), *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Proteus* (BRESSAN, 2000; SANTOS; FONSECA, 2007).

Quanto às suas formas de manifestação, a mastite pode ser classificada em subclínica, clínica ou crônica. A mastite clínica caracteriza-se pela presença de sinais clínicos evidentes no úbere, como edema, aumento de temperatura, endurecimento e dor na glândula mamária. A ocorrência de alterações visíveis no leite também são sinais muito comuns de mastite clínica,

tais como aparecimento de grumos, pus e/ou sangue. (SANTOS; FONSECA, 2007). A mastite subclínica é caracterizada pela ausência de alterações visíveis no leite e de sinais clínicos. Devido à ausência de sinais evidentes, o diagnóstico da mastite subclínica somente é possível com o uso de testes auxiliares, como o *California Mastitis Test* (CMT), testes de condutividade elétrica do leite e determinação da CCS (SANTOS; FONSECA, 2007). A mastite crônica resulta de infecção persistente, de longa duração, em que o animal apresenta episódios clínicos intermitentes e repentinos (RUEGG, 2012).

1.4 Epidemiologia da mastite bovina

Dentre os patógenos envolvidos nas infecções da glândula mamária, os mais prevalentes e associados à altas contagens de CCS no leite de tanque, são as espécies *S. aureus* e *Str. agalactiae* (BRITO et al., 1999; KOSKINEN et al., 2008; SOUZA et al., 2009). Estes patógenos têm como reservatório principal o úbere e quando identificados em leite de tanques são altamente indicativos da presença de infecção intramamária no rebanho (BARTLETT; MILLER, 1993; GODKIN; LESLIE, 1993).

Estudos realizados em diferentes estados do Brasil evidenciam a importância do gênero *Staphylococcus* na epidemiologia da mastite. Brito et al., (1999) avaliaram 48 rebanhos leiteiros do estado de Minas Gerais e demonstraram que em 98% dos rebanhos estudados foi identificado o *S. aureus* e em 60% houve isolamento de *Str. agalactiae* a partir de amostras de leite provenientes de quartos mamários de vacas em lactação. Avaliações de agentes contagiosos da mastite em amostras de leite total obtidas na plataforma de recepção da indústria evidenciaram que, dos 33 rebanhos estudados, 26 (78,8%) apresentaram isolamento de *S. aureus* e 27 (81,2%) apresentaram contagens acima de 200.000 células/mL, limite definido para estimar nova infecção intramamária (BRITO et al., 1999).

Em Rondônia, o estudo realizado na microrregião de Porto Velho em 2011 demonstrou maior frequência de *Staphylococcus* coagulase positivo (SCP) (59,3%) em amostras de leite provenientes de animais com mastite subclínica (DIAS, et al., 2011). Neste trabalho, os animais que não apresentaram crescimento bacteriano obtiveram menor número de células somáticas do que as vacas com isolamento do patógeno, 161.300 e 777.900 células/ml respectivamente, sendo que o SCP foi responsável pela maior elevação de CCS.

Estudos epidemiológicos sobre os indicadores de sanidade da glândula mamária foram realizados na principal microrregião produtora de leite de Rondônia e da região Norte. Dias et al., (2013) avaliaram 267 rebanhos bovinos leiteiros provenientes dos 11 municípios da

microrregião de Ji-Paraná. Dos rebanhos avaliados, 47 (17,6%) apresentaram CCS > 400.000 células/mL (DIAS et al., 2013). Os resultados da contagem de células somáticas demonstraram mediana de 184.000 células/mL variando de 104.000 a 317.000 células/mL (1º quartil, 3º quartil). O resultado da pesquisa de patógenos contagiosos em amostras de leite total (latões/tanque) destes rebanhos mostrou uma prevalência de *S. aureus* de 36% (DIAS, et al., 2015)

Na microrregião de Ji-Paraná-RO também foram avaliadas amostras de leite de 73 tanques de resfriamento, sendo que 11 (15%) dos tanques avaliados apresentaram CCS>400.000 células/mL. A distribuição dos resultados de CCS mostrou mediana de células somáticas/ml de 197.000 para tanques individuais e 242.000 para tanques coletivos (DIAS et al., 2014). Estudo realizado por Carvalho (2012) nesta mesma região, avaliou 51 tanques coletivos e observou média de CCS de 229.000 cels/mL e 275.000 cels/mL para os períodos seco e chuvoso, respectivamente.

1.5 Medidas de prevenção e controle da mastite

Para o controle da mastite e redução da CCS do rebanho é fundamental a implantação do programa básico de controle da mastite que inclui a adoção de boas práticas de ordenha, higiene e manutenção do equipamento, tratamento imediato dos casos clínicos, tratamento das vacas na secagem, segregação dos casos crônicos e manejo do ambiente.

O diagnóstico laboratorial na identificação de patógenos da mastite é fundamental no programa de controle. A identificação do patógeno associado a informações individuais dos animais no momento do tratamento, como idade do animal, estágio de lactação e CCS, fornece informações sobre o padrão de infecção do rebanho, e contribui para o controle e erradicação de patógenos contagiosos da mastite como *S. aureus* e *S. agalactiae* (BRITO et al., 1999).

O impacto da implementação de estratégias de controle da mastite tem sido eficaz em controlar patógenos contagiosos e tem contribuído para uma significativa redução de mastite clínica e subclínica e conseqüentemente da CCS do rebanho (LEIGH, 1999; BRADLEY, 2002).

1.6 Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus* isolados da mastite

Dentre as estratégias estabelecidas para o controle da mastite, o uso de

antimicrobianos para tratamento dos casos clínicos e na terapia da vaca seca constitui componente essencial. Desta forma, é necessário conhecer o perfil de resistência dos isolados visando a seleção dos antimicrobianos mais adequados, pois estes perfis podem variar entre rebanhos (COSTA et al., 2013). O uso incorreto e indiscriminado de antimicrobianos é um dos principais fatores que influenciam no aumento da resistência.

Estudos demonstram variação na frequência de isolamento de *S. aureus* e o aumento crescente do padrão de resistência (LANGONI et al., 1991; NADER FILHO et al., 1992; BRITO et al., 1999; BRITO et al., 2001; FREITAS et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2011). Os resultados mostram que o aumento da resistência é maior para os antibióticos β -lactâmicos (LANGONI et al., 1991; BRITO et al., 1999).

Este aumento pode estar associado a mecanismos de resistência à penicilina. O primeiro mecanismo, foi a produção da enzima penicilinase, uma β -lactamase específica que hidrolisa o anel β -lactâmico deste antibiótico. A disseminação da resistência à penicilina em *Staphylococcus* spp., está ligada o gene blaZ, que codifica para a penicilinase e é carregado por plasmídeos transmissíveis (FLUIT et al., 2001).

Ao final dos anos 50 foram desenvolvidas penicilinas semi-sintéticas, resistentes à ação das betalactamases, sendo os antimicrobianos meticilina e oxacilina os primeiros desta classe a serem introduzidos para o uso clínico (MARANAN et al., 1997; MIMICA; BEREZIN, 2006). O primeiro caso de resistência à meticilina em *S. aureus* foi descrito por JEVONS (1961), sendo denominado MRSA (*S. aureus* resistente à meticilina). Estas estirpes eram resistentes a todos os antibióticos β -lactâmicos, incluindo as penicilinas, cefalosporinas e carbapenemas (FRANÇOIS et al., 2004). A MRSA dificulta outros tratamentos, por ser resistente a outras classes antimicrobianas (WEESE, 2010). Em 2005, MRSA foi identificada em suínos, e isolada de vacas, cavalos e aves, sendo designada como *livestock associated* (LA) –MRSA (PANTOSTI, 2012).

As características de virulência de *S. aureus* contribuem para a persistência deste patógeno no tecido mamário devido à formação de abscessos em tecidos profundos da glândula mamária, interferindo no acesso do antimicrobiano resultando em infecção de longa duração, com tendência a cronificação e baixa taxa de cura (SANTOS, 2003; SANTOS; FONSECA, 2007). A taxa de cura de infecções intramamárias causadas por *S. aureus* podem variar de 15 a 85%, dependendo do número de lactações, contagem de células somáticas antes do tratamento e produção de β -lactamase (BARKEMA et al., 2006).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar fenotipicamente a resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina de rebanhos do estado de Rondônia

2.2 Objetivo Específicos

- a) Caracterizar a estrutura e manejo adotado nos rebanhos estudados;
- b) Determinar a frequência de microrganismos do gênero *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina e seu impacto na contagem de células somáticas;
- c) Identificar o perfil de resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina;
- d) Identificar os padrões de resistência de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina.

3 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE *Staphylococcus* spp. ISOLADOS DE MASTITE BOVINA EM REBANHOS LEITEIROS DE TRÊS MICRORREGIÕES DO ESTADO DE RONDÔNIA

RESUMO

O gênero *Staphylococcus* spp. destaca-se como um dos principais agentes etiológicos da mastite bovina, sendo mais frequentes os isolados de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus* spp. coagulase positivo (SCP) e *Staphylococcus* spp. coagulase negativo (SCN). Dentre as estratégias estabelecidas para o controle da mastite, o uso de antimicrobianos para tratamento dos casos clínicos e na terapia da vaca seca constitui componente essencial. Entretanto, o uso incorreto e indiscriminado de antimicrobianos é um dos principais fatores que influenciam no aumento da resistência. Considerando a importância do gênero *Staphylococcus* spp. na epidemiologia da mastite bovina, este trabalho teve o objetivo de identificar o perfil de resistência a antimicrobianos de 68 isolados de *S. aureus*, 11 de SCP e 29 de SCN, provenientes de 15 rebanhos tecnificados localizados em três microrregiões do estado de Rondônia. Os isolados foram submetidos a testes de suscetibilidade a antimicrobianos, utilizando-se a técnica de difusão em ágar. Para cada isolado, foram avaliados 11 antibióticos das classes: betalactâmicos, cefalosporinas, tetraciclina, macrolídeos, lincosamidas, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. Foram verificadas frequências de resistência que variaram de 0 a 13,8% para *S. aureus*, 0 a 72,7 % SCP e 0 a 31,0% SCN, sendo a maior para penicilina, seguido da ampicilina e tetraciclina. Foi demonstrado 100% suscetibilidade aos antimicrobianos cefalexina, gentamicina e oxacilina para os isolados de *S. aureus* e do antibiótico cefalexina para SCP. Nenhum dos antimicrobianos avaliados apresentou 100% de sensibilidade *in vitro* para SCN. Dos isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes, foram observados dois padrões de resistência prevalentes, ampicilina e penicilina (n=12) e penicilina, ampicilina e tetraciclina (n=7). Os resultados demonstram maior frequência de resistência para tetraciclina e betalactâmicos, antibióticos amplamente utilizados para o controle da mastite no estado.

Palavras-chave: Mastite bovina. *Staphylococcus* spp. resistência a antimicrobianos. teste de difusão em ágar.

ABSTRACT

The genus *Staphylococcus* spp. stands out as one of the main etiological agents of bovine mastitis, being more frequent the isolates of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), coagulase-positive *Staphylococcus* spp. (CPS) and coagulase-negative *Staphylococcus* spp. (CNS). Among the strategies established for the control of mastitis, the use of antimicrobial agents for the treatment of clinical cases and the treatment of dry cow is an essential component. However, the incorrect and indiscriminate use of antimicrobial agents is one of the key factors that influence the increase in resistance. Considering the importance of the genus *Staphylococcus* spp. in the epidemiology of bovine mastitis, the objective of this study was to identify the antimicrobial resistance profile of 68 isolates of *S. aureus*, 11 CPS and 29 CNS, from 15 technified cattles located in three regions of the state of Rondônia. The isolates were tested for susceptibility to antimicrobial agents, using the Agar diffusion technique. For each isolate, 11 antibiotics of classes: betalactams, cephalosporins, tetracyclines, macrolides, lincosamides, fluoroquinolones and aminoglycosides were evaluated. The verified frequency of resistance ranged from 0 to 13.8% for *S. aureus*, 0 to 72.7 % CPS and 0 to 31.0% CNS, being the largest for penicillin, followed by ampicillin and tetracycline. It has been demonstrated 100% of susceptibility to cefalexin, gentamicin and oxacillin (antimicrobial agents) for isolates of *S. aureus* and cephalexin (antibiotic) for CPS. None of the antimicrobial agents evaluated presented 100% sensitivity in vitro for CNS. From the strains of *Staphylococcus* spp., two patterns of resistance prevalent we observed: ampicillin and penicillin (n=12) and, penicillin, ampicillin and tetracycline (n=7). The results show a higher frequency of resistance to tetracyclines and betalactams, antibiotics that are widely used for the control of mastitis in the state.

Key words: Bovine mastitis. *Staphylococcus* spp. resistance to antimicrobial agents. agar diffusion test.

3.1 Introdução

A mastite bovina é a doença infecciosa mais prevalente e economicamente relevante em rebanhos leiteiros. O impacto decorrente da doença se deve à redução da produção de leite, ao descarte de matrizes, à redução do valor comercial desses animais, às perdas na evolução genética do rebanho e aos gastos com medicamentos e mão de obra extra (DÜRR et al., 2004). Além disso, a mastite causa prejuízos à indústria de laticínios devido a alterações na composição físico-química do leite, e pode constituir risco à saúde pública devido à veiculação de patógenos e suas toxinas.

Dentre os patógenos causadores de infecção intramamária no Brasil, o gênero *Staphylococcus* spp. é o mais prevalente, sendo mais frequentes os isolados de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus* spp. coagulase positivo (SCP) e *Staphylococcus* spp. coagulase negativo (SCN). Em Rondônia, estudos demonstram a predominância de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. é a baixa adoção de boas práticas de ordenha e controle da mastite nos rebanhos avaliados (DIAS et al., 2013; DIAS et al., 2015).

Dentre as estratégias estabelecidas para o controle da mastite, o uso de antimicrobianos para tratamento dos casos clínicos e na terapia da vaca seca constitui componente essencial. Entretanto, o uso incorreto e indiscriminado de antimicrobianos é um dos principais fatores que influenciam no aumento da resistência.

Estudos realizados em diferentes estados, com o objetivo de identificar os perfis de resistência a antimicrobianos de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp., demonstraram resultados variados e com aumento crescente do padrão de resistência para o *S. aureus* (LANGONI et al., 1991; BRITO et al., 1996; FREITAS et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2011). Desta forma, o monitoramento da resistência torna-se fundamental como ferramenta auxiliar na escolha do antimicrobiano para maior efetividade do tratamento e controle da mastite no rebanho.

Considerando a importância da cadeia produtiva do leite para o estado de Rondônia e do gênero *Staphylococcus* spp. na epidemiologia da mastite bovina, este trabalho teve o objetivo de identificar o perfil de resistência aos antimicrobianos de isolados de *S. aureus*, SCN e SCP provenientes de rebanhos localizados em três microrregiões do estado de Rondônia.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 População estudada

Foram avaliados rebanhos localizados nas microrregiões de Ji-Paraná, Porto Velho e Rolim de Moura, estado de Rondônia. Os rebanhos eram provenientes dos municípios de Jaru, Ouro Preto do Oeste, Presidente Médici, Rolim de Moura, São Felipe do Oeste, Castanheiras, Porto Velho e Guajará Mirim.

3.2.2 Coleta de amostras e dados

As amostras de leite foram colhidas de animais com e sem mastite. O diagnóstico da mastite clínica foi realizado considerando as alterações macroscópicas do leite (presença de pus, grumos e/ou estrias de sangue) na prova da caneca telada de fundo escuro e na presença de sinais de inflamação na glândula mamária. A mastite subclínica foi diagnosticada utilizando o *California Mastitis Test* (CMT) (SCHALM et al., 1971).

Dos animais avaliados foi obtida amostra de leite para isolamento microbiano, procedendo à limpeza dos tetos por lavagem, secagem com papel toalha e anti-sepsia com álcool 70°GL. Foram colhidos cerca de 4 ml de leite em tubos de vidro, com tampa de rosca estéreis, com o cuidado de retirar quantidade igual de leite de cada quarto mamário (NMC, 2004). Para a determinação da contagem de células somáticas foi procedida coleta de amostra representativa da produção total de cada animal na primeira ordenha do dia conforme metodologia proposta por Brito et al. (2007), utilizando frascos contendo conservante bronopol. As amostras foram encaminhadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável ao Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Rondônia para análise laboratorial.

Nas propriedades avaliadas foi aplicado um questionário epidemiológico a fim de obter informações do sistema de produção, infraestrutura e manejo, higiene e manutenção dos equipamentos de ordenha, controle e prevenção de mastite e aplicação de antibióticos.

3.2.3 Análise microbiológica e testes de susceptibilidade a antimicrobianos

Semeou-se um volume de 10µl de cada amostra de leite em placa de meio ágar-sangue ovino a 5%. As placas foram incubadas a 37 °C em aerofilia por até 120 horas, procedendo

leituras às 24 e 48 horas após a incubação. As colônias isoladas no meio ágar sangue foram observadas quanto à morfologia, tamanho, pigmentação e presença de hemólise. Os microrganismos isolados foram observados ao microscópio por meio de esfregaços corados pelo método de Gram. A significância do número de colônias dos microrganismos isolados foi interpretada segundo os critérios propostos pelo *National Mastitis Council* (NMC) (2004). As bactérias do gênero *Staphylococcus* foram classificadas considerando o resultado das provas da catalase, coagulase e Voges Proskauer. Amostras consideradas contaminadas foram aquelas em que houve crescimento de três ou mais colônias diferentes no isolamento primário, sem o predomínio de nenhuma delas.

Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos foram realizados em todos os isolamentos de *S. aureus*, SCN e SCP de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). O inóculo bacteriano foi suspenso em solução salina estéril a 0,85%, a fim de obter uma turbidez ajustada ao padrão da escala 0,5 de Mac Farland. Em seguida, utilizando suabe estéril, foi realizada a inoculação da suspensão bacteriana em placa ágar de Mueller Hinton, distribuindo uniformemente em todos os sentidos da placa. Com uma pinça flambada foram empregados discos dos antimicrobianos: ampicilina (10µg), ceftiofur (30 µg), clindamicina (2 µg), enrofloxacina (5 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), oxacilina (1 µg), penicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg), neomicina (30 µg) e cefalexina (30 µg) na superfície da placa semeada. As placas foram incubadas por 18 – 24 horas a 37 °C, para posterior leitura e interpretação dos resultados.

3.2.4 Determinação da Contagem de Células Somáticas

A determinação da CCS foi realizada o método de citometria de fluxo em equipamento automatizado (CombiScope FTIR400 - Delta Instruments) de acordo com a *International Dairy Federation* (IDF, 2006).

3.2.5 Análise dos dados

Para inserir as informações do questionário epidemiológico e o resultado das análises laboratoriais, assim como a realização da análise da estatística descritiva (frequência, média, mediana) foi utilizado o programa Epiinfo Windows 3.5.3.

3.3 Resultados

Foram avaliadas amostras de leite de 161 vacas em lactação provenientes de 15 rebanhos leiteiros. Nas propriedades avaliadas, o sistema de criação era semi-intensivo, sendo a base da alimentação volumoso e concentrado (ração). A ordenha era realizada predominantemente em sistema de ordenha mecânica (80,0%), sendo realizada duas vezes ao dia (66,7%) e com a presença do bezerro (53,8%). A média do número de vacas em lactação das propriedades era de 24 animais com uma média de produção de leite de 204,9 litros/dia e produtividade de leite de 10,2 litros/animal/dia. A raça predominante era a girolando, sendo utilizados a raça Gir e Jersey. Em todas as propriedades avaliadas foi relatado o uso de antibióticos para o tratamento e prevenção da mastite bovina, sendo adotado o uso de antibiótico para vaca seca em 80,0% dos rebanhos. Para o tratamento da mastite, os princípios ativos mais utilizados foram a gentamicina (60,0%), neomicina (46,3%), cefquinona (40,0%), tetracilina (20,0%) e sulfadiazina + trimetropin (20,0%). As características das propriedades e manejo de ordenha estão apresentados na Tabela 4 e 5.

Tabela 4 - Características das propriedades leiteiras avaliadas, Rondônia, 2014

| Variável | Categoria | n | % |
|-------------------------------------|------------------------|----|------|
| Local de ordenha | Sala de ordenha | 8 | 53,3 |
| | Curral | 7 | 46,7 |
| | Mecânica - canalizada | 1 | 6,7 |
| Tipo de ordenha | Mecânica - ao pé | 12 | 80,0 |
| | Manual | 2 | 13,3 |
| Produção de leite ^a | ≤ 205 litros/dia | 7 | 53,8 |
| | > 205 litros/dia | 6 | 46,2 |
| Vacas em lactação ^a | ≤ 25 vacas | 9 | 60,0 |
| | > 25 vacas | 6 | 40,0 |
| Produtividade de leite ^a | ≤ 8,8 litros/vaca/dia | 7 | 50,0 |
| | > 8,8 litros/vaca/dia | 7 | 50,0 |
| Raça | Mestiço | 2 | 13,3 |
| | Girolando, Jersey, Gir | 13 | 86,7 |
| Bezerro no momento da ordenha | Sim | 7 | 53,8 |
| | Não | 6 | 46,2 |
| Número de ordenhas por dia | 1 vez ao dia | 5 | 33,3 |
| | 2 vezes ao dia | 10 | 66,7 |
| Sistema de criação de bezerras | Coletivo | 3 | 20,0 |
| | Individual | 12 | 80,0 |
| Compra fêmea | Sim | 7 | 50,0 |
| | Não | 7 | 50,0 |

^a Foi utilizado mediana das variáveis como ponto de corte

Tabela 5 – Características do manejo da ordenha e controle da mastite nas propriedades avaliadas, Rondônia, 2014

| Variável | Categoria | n | % |
|---|-------------------------|----|-------|
| Fonte de água | Mina | 1 | 9,1 |
| | Poço Artesiano | 5 | 45,5 |
| | Poço Amazônico | 5 | 45,5 |
| Examina os primeiros jatos de leite | Sim | 8 | 53,3 |
| | Não | 7 | 46,7 |
| Lava os tetos antes da ordenha | Sim | 11 | 73,3 |
| | Não | 2 | 13,3 |
| | Quando necessário | 2 | 13,3 |
| Desinfeta os tetos antes da ordenha | Sim | 8 | 53,3 |
| | Não | 7 | 46,7 |
| Seca os tetos | Papel toalha | 11 | 73,3 |
| | Não seca/pano comum | 4 | 26,7 |
| Anti-sepsia dos tetos após a ordenha | Sim | 10 | 66,7 |
| | Não | 5 | 33,3 |
| Vacas alimentadas | Após a ordenha | 8 | 53,3 |
| | Antes/durante a ordenha | 7 | 46,7 |
| Tratamento imediato dos casos clínicos | Sim | 13 | 86,7 |
| | Não | 2 | 13,3 |
| Tratamento da vaca seca | Parte/Todas as vacas | 12 | 80,0 |
| | Não realiza | 3 | 20,0 |
| Realiza CMT | Sim | 7 | 53,8 |
| | Não | 6 | 46,2 |
| Linha de ordenha | Sim | 3 | 20,0 |
| | Não | 12 | 80,0 |
| Descarte de animais com mastite crônica | Sim | 7 | 46,7 |
| | Não | 8 | 53,3 |
| Antimicrobiano para mastite | Sim | 15 | 100,0 |
| Protocolo para tratamento mastite | Sim | 7 | 46,7 |
| | Não | 8 | 53,3 |
| Recomenda tratamento mastite | Veterinário/Técnico | 12 | 80,0 |
| | Balconista | 3 | 20,0 |
| Registro tratamento mastite | Sim | 6 | 40,0 |
| | Não | 9 | 60,0 |
| Marca animais em tratamento | Sim | 4 | 26,7 |
| | Não | 11 | 73,3 |
| Verifica a bula do medicamento | Sim | 13 | 86,7 |
| | Não | 2 | 13,3 |
| Antimicrobiano de linha não veterinária | Não | 15 | 100,0 |

A tabela 6 mostra o resultado da pesquisa de *S. aureus* e variação da contagem de células somáticas dos rebanhos avaliados nas microrregiões de Porto Velho, Ji-Paraná e Rolim de Moura. Dos animais avaliados (n=161), foram obtidos 68 isolados de *S. aureus*, 29 SCN e 11 SCP. O perfil de resistência das amostras identificadas como *S. aureus*, SCN e SCP está apresentado na tabela 7. Foram verificadas frequências de resistência que variaram de 0 a 13,8% para *S. aureus*, 0 a 72,7 % SCP e 0 a 31,0% SCN, sendo a maior para penicilina, seguido da ampicilina e tetraciclina. Foi demonstrado 100% suscetibilidade aos antimicrobianos cefalexina, gentamicina e oxacilina para os isolados de *S. aureus* e do antibiótico cefalexina para SCP. Nenhum dos antimicrobianos testados apresentaram 100% de sensibilidade *in vitro* para SCN. Dos isolados de *Staphylococcus* resistentes, foram observados dois padrões de resistência prevalentes, ampicilina e penicilina (AMP-PEN) e penicilina, ampicilina e tetraciclina (AMP-PEN-TET) (Tabela 8).

Tabela 6 - Variação da contagem de células somáticas (x 1.000/mL) de acordo com a presença de isolamento de *S. aureus*, SCP e SCN em amostras de leite, Rondônia, 2013

| Infecção Intramamária | N (%) | MACCS ¹ |
|------------------------------|-----------|--------------------|
| | | (n) |
| Sem crescimento bacteriano | 47 (29,2) | 107,1 (40) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 68 (42,2) | 641,8 (68) |
| SCN | 29 (18,1) | 725,2 (23) |
| SCP | 11 (6,8) | 438,7 (6) |
| Outros microrganismos | 6 (3,7) | NR ² |

Média Aritmética da Contagem de Células Somáticas – (n) = número de amostras com resultados de CCS

²NR – Não realizado

Tabela 7 - Classificação de sensibilidade e resistência dos isolados de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp. coagulase positiva e negativa à onze antimicrobianos, Rondônia 2014

| Isolado | Grupo | Antimicrobiano | Perfil | | |
|------------------|-------------------|--------------------|------------------------|------------------------|---------------------|
| | | | Sensibilidade n (%) | Intermediário n (%) | Resistente n (%) |
| <i>S. aureus</i> | Penicilina | Ampicilina (66) | 57 (86,4) | 0 (0,0) | 9 (13,6) |
| | | Penicilina (65) | 56 (86,2) | 0 (0,0) | 9 (13,8) |
| | | Oxacilina (64) | 64 (100,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) |
| | Tetraciclina | Tetraciclina (65) | 61 (93,8) | 0 (0,0) | 4 (6,2) |
| | Cefalosporina | Ceftiofur (65) | 64 (98,5) | 0 (0,0) | 1 (1,5) |
| | | Cefalexina (65) | 65 (100,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) |
| | Aminoglicosídeo | Gentamicina (68) | 68 (100,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) |
| | | Neomicina (68) | 62 (91,2) | 6 (8,8) | 0 (0,0) |
| | Fluoroquinolona | Enrofloxacina (66) | 64 (97,0) | 1 (1,5) | 1 (1,5) |
| | Lincosamida | Clindamicina (66) | 65 (98,5) | 0 (0,0) | 1 (1,5) |
| | Macrolídeo | Eritromicina (66) | 59 (89,4) | 4 (6,1) | 3 (4,5) |
| | SCN | Penicilina | Ampicilina (29) | 21 (72,4) | 0 (0,0) |
| Penicilina (29) | | | 20 (69,0) | 0 (0,0) | 9 (31,0) |
| Oxacilina (29) | | | 28 (96,5) | 0 (0,0) | 1 (3,5) |
| Tetraciclina | | Tetraciclina (29) | 21 (72,4) | 2 (6,9) | 6 (20,7) |
| Cefalosporina | | Ceftiofur (28) | 27 (96,4) | 0 (0,0) | 1 (3,6) |
| | | Cefalexina (29) | 27 (93,1) | 2 (6,9) | 0 (0,0) |
| Aminoglicosídeo | | Gentamicina (29) | 28 (96,6) | 0 (0,0) | 1 (3,4) |
| | | Neomicina (29) | 25 (86,2) | 3 (10,3) | 1 (3,5) |
| Fluoroquinolona | | Enrofloxacina (29) | 27 (93,0) | 1 (3,5) | 1 (3,5) |
| Lincosamida | | Clindamicina (28) | 26 (92,8) | 1 (3,6) | 1 (3,6) |
| Macrolídeo | Eritromicina (28) | 27 (96,4) | 0 (0,0) | 1 (3,6) | |
| SCP | Penicilina | Ampicilina (11) | 3 (27,3) | 0 (0,0) | 8 (72,7) |
| | | Penicilina (11) | 4 (36,4) | 0 (0,0) | 7 (63,6) |
| | | Oxacilina (10) | 9 (90,0) | 0 (0,0) | 1 (10,0) |
| | Tetraciclina | Tetraciclina (10) | 7 (70,0) | 0 (0,0) | 3 (30,0) |
| | Cefalosporina | Ceftiofur (11) | 10 (90,9) | 0 (0,0) | 1 (9,1) |
| | | Cefalexina (11) | 11 (100,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) |
| | Aminoglicosídeo | Gentamicina (11) | 10 (90,9) | 0 (0,0) | 1 (9,1) |
| | | Neomicina (11) | 8 (72,7) | 2 (18,2) | 1 (9,1) |
| | Fluoroquinolona | Enrofloxacina (11) | 10 (90,9) | 0 (0,0) | 1 (9,1) |
| | Lincosamida | Clindamicina (11) | 10 (90,9) | 0 (0,0) | 1 (9,1) |
| Macrolídeo | Eritromicina (11) | 10 (90,9) | 0 (0,0) | 1 (9,1) | |

Tabela 8 - Padrão de resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp. coagulase negativo e positivo isolados de mastite bovina, Rondônia, 2014

| Isolado | Perfil de multirresistência | N |
|------------------|---|---|
| <i>S. aureus</i> | AMP-PEN | 5 |
| | AMP-PEN-TET | 3 |
| | AMP-PEN-TET-ERI-CLI | 1 |
| | CFT-ERI | 1 |
| SCN | AMP-PEN-TET | 3 |
| | AMP-PEN | 2 |
| | AMP-PEN-TET-ERI | 1 |
| | AMP-PEN-CTF-OXA | 1 |
| | PEN-TET-ERI | 1 |
| | PEN-GEN-NEO-CLI | 1 |
| SCP | AMP-PEN | 5 |
| | AMP-PEN-TET | 1 |
| | AMP-PEN-TET-CTF-ENR-GEN-NEO-OXA-ERI-CLI | 1 |

N=Número de isolados, AMP=Ampicilina, CFT=Ceftiofur, ENR=Enrofloxacina, GEN=Gentamicina, NEO=Neomicina, OXA=Oxacilina, PEN=Penicilina, CFE=Cefalexina, TET=Tetraciclina, ERI=Eritromicina, CLI=Clindamicina.

3.4 Discussão

Os rebanhos leiteiros avaliados no presente trabalho, apresentavam maior mediana de produção (litros/dia), produtividade de leite (litros/vaca/dia) e maior frequência de adoção de boas práticas de ordenha e controle da mastite comparado com o perfil de propriedades avaliadas da microrregião de Ji-Paraná (DIAS et al., 2013; DIAS et al., 2015), demonstrando maior grau de tecnificação.

O uso de antimicrobianos foi relatado como estratégia para o controle e a prevenção da mastite em todos os rebanhos avaliados. O uso de protocolos de tratamento orientado por técnicos foi relatado em 46,7 % dos rebanhos e os princípios ativos mais frequentemente utilizados foram das classes dos aminoglicosídeos, tetraciclinas e cefalosporinas.

No presente trabalho, o *S. aureus* foi o patógeno da mastite mais prevalente, sendo isolado em todas as propriedades avaliadas. O *S. aureus* é considerado o patógeno de maior importância e o mais frequente na maioria dos países (HOGVEEN et al., 2011; KEEFE,

2012). No Brasil, as taxas de isolamentos de *S. aureus* em amostras de leite variam entre 8,3% e 35,53% (LANGONI et al., 1991; NADER FILHO et al., 1992; BRITO et al., 1999; FREITAS et al., 2005; OLIVEIRA et. al., 2011). Em estudo realizado na microrregião de Ji-Paraná, maior produtora de leite do estado, foram avaliados 267 rebanhos bovinos leiteiros e destes 36,0% apresentaram isolamento de *S. aureus* em amostras de leite total (DIAS et al., 2015). Estes resultados confirmam a importância do patógeno na epidemiologia da mastite em Rondônia.

Os SCN têm se apresentado com um dos principais grupos de bactérias isoladas de mastite subclínica (MAKOVEC; RUEGG, 2003), podendo causar infecções persistentes resultando em aumento da CCS. No presente estudo, SCN foram isolados em 66,6% (n=10) das propriedades avaliadas, e as amostras de leite dos animais que tiveram isolamento do patógeno apresentaram média de CCS de 725.000 células/mL, demonstrando a sua abrangência e o impacto na CCS. Estudo realizado na microrregião de Porto Velho em Rondônia demonstrou a presença deste grupo de microrganismos como agente causal de mastite subclínica nas propriedades avaliadas (DIAS et al., 2013). Os SCN podem ser oportunistas provenientes do meio ambiente, entretanto algumas espécies podem permanecer no úbere, fazendo que o hospedeiro se torne fonte de infecção do microrganismo a outros animais do rebanho (MORK et al., 2012).

A avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos de isolados do gênero *Staphylococcus* demonstrou maiores frequências de resistência para betalactâmicos (penicilina e ampicilina) e tetraciclinas. Estudos realizados em diferentes regiões e países demonstram um aumento crescente da resistência a penicilinas por *Staphylococcus* (LANGONI et al., 1991; BRITO et al., 1996; BOYLE-VAVRA et al., 1997; MURRAY et al., 2009). Este aumento pode estar associado a mecanismos de resistência à penicilina, como a produção da enzima penicilinase, uma β -lactamase específica que hidrolisa o anel β -lactâmico deste antibiótico. O gene *blaZ*, que codifica para esta enzima, é carregado por plasmídeos transmissíveis, o que dissemina a resistência entre os estafilococos (FLUIT et al., 2001).

Dentre os isolados avaliados, os SCP apresentaram frequências de resistência mais altas para todos os antimicrobianos testados, sendo a maior frequência de resistência à betalactâmicos (72,7%). Estudos demonstram altas frequências de resistência a penicilinas de SCP isolados de mastite no estado do Pará e Pernambuco, sendo observadas frequências de 73,3% e 80,0% respectivamente (FREITAS et al., 2005; OLIVEIRA et. al., 2011).

A frequência de resistência a tetraciclinas observada no presente estudo foi maior em isolados de SCN e SCP. Estes resultados corroboram com avaliações de isolados de mastite

de rebanhos de Pernambuco e Pará que demonstraram frequência de resistência a tetraciclinas de 26,0% para SCP (FREITAS et al., 2005) e 21,7% para SCN (OLIVEIRA et al., 2011) respectivamente. Embora, o uso de tetraciclinas tenha sido relatado em 20% dos rebanhos avaliados, resultados obtidos no estudo realizado em 262 propriedades com baixo nível tecnológico localizados na microrregião de Ji-Paraná demonstraram predominância de tratamentos à base de tetraciclinas (74,0%) na região (DIAS et al., 2015).

Os maiores índices de suscetibilidade a antimicrobianos foram observados nos isolamentos de *S. aureus* (86,4 – 100%). A variação no padrão de resistência a antimicrobianos de *S. aureus* isolados de mastite bovina tem sido descrita por diferentes autores, sendo observada uma tendência de maior frequência de resistência de *S. aureus* aos antimicrobianos ampicilina, penicilina e tetraciclina (LANGONI et al., 1991; NADER FILHO et al., 1992; BRITO et al., 2001; COSTA et al., 2013). No presente estudo foi observado padrão de resistência de *S. aureus* semelhante aos estudos realizados, entretanto com menores frequências indicando melhor eficiência das drogas testadas no controle e prevenção da mastite. Os resultados de suscetibilidade a oxacilina para os isolados de *Staphylococcus* avaliados (n=103) variaram de 90,0 a 100%, sendo identificado dois isolamentos resistentes, um para SCP e um SCN. Santos (2014) avaliou 170 isolamentos de *S. aureus* e SCN e observou resistência à oxacilina em 31 amostras provenientes de seis estados da federação.

A identificação de padrões de resistência nos isolados de *Staphylococcus* demonstra maior frequência de dois padrões: ampicilina e penicilina (n=12) e ampicilina, penicilina e tetraciclina (n=7). Dos 19 padrões predominantes observados, 10 foram obtidos em uma propriedade localizada na microrregião de Porto Velho, o qual tinha histórico de mastite clínica recorrente no rebanho, uso de diferentes antimicrobianos sem orientação técnica e baixa taxa de cura.

A baixa taxa de cura em infecções por *S. aureus* pode estar relacionada à formação de abscessos em tecidos profundos da glândula mamária, o qual interfere no acesso do antimicrobiano resultando em uma infecção de longa duração e com tendência a cronificação (SANTOS; FONSECA, 2007). Estudo realizado por Barkema et al., (2006), demonstrou que as taxas de cura de infecções intramamárias causadas por *S. aureus* podem variar de 15 a 85%, dependendo do número de lactações, contagem de células somáticas antes do tratamento e produção de β -lactamase. Estes fatores contribuem para o aumento da resistência a antimicrobianos em rebanhos e demonstram a importância da prevenção da infecção por este microrganismo.

3.5 Conclusões

Os resultados mostram a importância do gênero *Staphylococcus spp.* como principal agente etiológico da mastite bovina em propriedades tecnificadas do estado de Rondônia, sendo o *S. aureus* o mais prevalente e com maiores índices de suscetibilidade à antimicrobianos.

A maior frequência de resistência foi observada para betalactâmicos e tetraciclina, antibióticos amplamente utilizados para o controle da mastite no estado.

A adoção de boas práticas de ordenha assim como o estabelecimento de protocolos de tratamento baseados nos resultados do antibiograma são ferramentas essenciais para maior efetividade do tratamento e controle da mastite bovina.

4 CONCLUSÕES GERAIS

Considerando a importância da sustentabilidade da pecuária de leite para o estado de Rondônia, e a importância socioeconômica da mastite bovina para a unidade produtiva, os resultados mostram a predominância de patógenos contagiosos da mastite no estado e o perfil de suscetibilidade aos principais antimicrobianos. Estes resultados demonstram a importância da adoção de boas práticas de ordenha e controle da mastite, e do estabelecimento de protocolos de tratamento baseados nos resultados do antibiograma, como ferramenta essencial para maior efetividade do tratamento e controle da mastite.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M.; SEYFARTH, A. M.; EMBORG, H. D.; PEDERSEN, K.; HENDRILSEN, R. S.; BAGGER, F. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal Enterococci from food animals in Denmark. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p. 2045-2059, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC90599/pdf/ac002054.pdf>>. Acesso em 22 mai. 2017.
- BARHEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOCK, R. N. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Dairy Science**, Jun: 89 (6): 1877-95, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16702252>>. Acesso 22 mai. 2017.
- BARTLETT, P. C.; MILLER, G. Y. Mastitis microbiology: what is considered normal? **Agri Practice Journal**, Santa Barbara, 14, n.6, p. 12-14, 1993.
- BOYLE-VAVRA, S.; STENBERG, S.; DAUM, R. S. Decreased triton-induced lysis in two vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* mutants derived in the laboratory from clinical susceptible isolate 523. 97th, General Meeting American Society for Microbiology Abstract A-131, Miami, Fla. 1997.
- BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an evolving disease. **Veterinary Journal**, Les Ulis, v.164, p.116-128, 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Tipo B, Tipo C e Cru refrigerado. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 2002. Seção 1, p. 13.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu transporte a Granel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 dez. 2011. Seção 1, p. 6.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 7, de 3 de maio de 2016. Dispõe sobre regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado, o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a Granel. . **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 04 mai. 2016. Seção 1, p. 11.
- BRESSAN, M. **Práticas de manejo sanitário em bovinos de leite**. Juiz de Fora:

Embrapa/CNPGL, 2000. 65p.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V. M. O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, p. 129-135, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09351999000200001&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso 22 mai. 2017.

BRITO, M. A. V. P. **Diagnóstico Microbiológico da Mastite Bovina**. In VIII Congresso Brasileiro de BUIATRIA. 2009. **Anais...** Belo Horizonte: Ciência Animal Brasileira, 2009. Suplemento1. p. 1 – 12.

BRITO, M. A. V. P., BRITO, J. R. F. Produção científica brasileira sobre mastite bovina. In: BRITO, J.R.F., BRESSAN, M. (Ed.). **Controle integrado da mastite bovina**. Juiz de Fora: EMBRAPA/CNPGL, 1996. p. 68-96.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SILVA, M. A. S.; CARMO, R. A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 531 – 537, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352001000500003&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 22 mai. 2017.

CARVALHO, G. L. O. Uso da análise espacial para avaliação de indicadores de qualidade do leite na microrregião Ji-Paraná, Rondônia, 2012. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 121p. 2012. Disponível em: <<http://www.ufjf.br/mestradoleite/files/2013/01/Disserta%C3%A7%C3%A3o-final28.pdf>>. Acesso em: 05 ago. 2016.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals**: Approved standard. 3. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008. 99 p. CLSI document M31-A3.

COSTA, G. M.; BARROS, R. A.; CUSTÓDIO, D. A. C.; PEREIRA, U. de P. P.; FIGUEIREDO, D. J.; SILVA, N. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arquivo Instituto Biologia**, São Paulo, v.80, n.3, p. 297-302, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aib/v80n3/06.pdf>>. Acesso em: 22 mai. 2017.

DEVRIESE, L. A.; VAN DAMME, L. R.; FAMEREE, L. Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. **Zentralbl Veterinarmed B**. Aug;19(7):598-605, 1972. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4486473>>. Acesso em: 25 mai. 2017

DIAS, J. A.; BRITO, L. G.; BARBIERI, F. S.; MOREIRA, P. **O papel das infecções**

intramamárias na qualidade do leite em Rondônia. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2013. (Embrapa Rondônia. Circular Técnica, 137).

DIAS, J. A.; ANTES, F. G.; QUEIROZ, R. B.; MENDES, A. M. Qualidade do leite armazenado em tanques de resfriamento em Rondônia. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2014. 6 p. (Embrapa Rondônia. Comunicado Técnico, 393).

DIAS, J. A.; ANTES, F. G.; QUEIROZ, R. B.; Fatores de risco associados à ocorrência de resíduos de antibióticos em leite total de rebanhos leiteiros da microrregião de Ji-Paraná do estado de Rondônia. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE, 13.; WORKSHOP DE POLÍTICAS PÚBLICAS, 13.; SIMPÓSIO DE SUSTENTABILIDADE DA ATIVIDADE LEITEIRA, 14., 2015, Porto Alegre. Anais... Brasília, DF.; Embrapa, 2015. 1 CD-ROM. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 184).

DOHOO, I. R.; LESLIE, K. E. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v.10, p. 225-237, 1991.

DÜRR, J. W. **Produção de leite conforme Instrução Normativa n° 62.** 4ª ed., Brasília: SENAR, 2012, 44p.

ERSKINE, R. J.; WAGNER, S.; DEGRAVES, F. J. **Mastitis therapy and pharmacology. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.** Mar; 19(1): 109-38, vi, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12682938>>. Acesso em: 25 mai. 2017.

FLUIT, A. C.; VISSER, M. R.; SCHMITZ, F. J. Molecular detection of antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews.** Oct; 14(4):836-71, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89006/pdf/cm0401000836.pdf>>. Acesso em: 25 mai. 2017.

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.; SENA, M. J.; MOTA, R. A. Perfil de Sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo Instituto Biológico**, Sao Paulo, v. 72, n. 2, p.171-177, 2005. Disponível em:<[https://www.researchgate.net/profile/R_Mota2/publication/267416296_PERFIL_DE_SENSIBILIDADE_ANTIMICROBIANA_IN_VITRO_DE_STAPHYLOCOCCUS_COAGULASE_POSITIVOS_ISOLADOS_DE_LEITE_DE_VACAS_COM_MASTITE_NO_AGRESTE_D O_ESTADO_DE_PERNAMBUCO/links/54a33bb40cf267bdb9043053.pdf](https://www.researchgate.net/profile/R_Mota2/publication/267416296_PERFIL_DE_SENSIBILIDADE_ANTIMICROBIANA_IN_VITRO_DE_STAPHYLOCOCCUS_COAGULASE_POSITIVOS_ISOLADOS_DE_LEITE_DE_VACAS_COM_MASTITE_NO_AGRESTE_DO_ESTADO_DE_PERNAMBUCO/links/54a33bb40cf267bdb9043053.pdf)>. Acesso em: 22 mai. 2017.

FRANÇOIS, P; RENZI, G. PITTET, D.; LEW, D.; HARBARTH, S.; VAUDAUX, P.; SCHRENZEL, J. A novel multiplex real-time PCR assay for rapid typing of major staphylococcal cassette chromosome *mec* elements. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n.7, p. 3309 – 3312, 2004. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC446242/pdf/0081-04.pdf>>. Acesso em: 22 mai. 2017.

GARCIA-GRAELLS, C.; ANTOINE, J.; LARSEN, J.; CATRY, B.; SKOV, R.; DENIS, O. Livestock veterinarians at high risk of acquiring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398. **Epidemiology & Infection**; 140(3): 383-389, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22082716>>. Acesso em: 22 mai. 2017.

GEORGE, L.W., DIVERS, T.J., DUCHARME, N. & WELCOME, F.L. Diseases of the teats and udder. In **T.J Divers & S.F. Peek, Rebhun`s: diseases of dairy cattle**. (2nd edition). (pp. 358-394). St Louis, Missouri: Saunders Elsevier, (2008). Disponível em: <<https://veteriankey.com/diseases-of-the-teats-and-udder/>>. Acesso em 10 jun. 2017.

GEORGOPAPADAKOU, N. H. Penicilin-binding proteins and bacterial resistance to β -lactams. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 10, p. 2945 -2053, 1993. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC192226/pdf/aac00032-0027.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2017.

GODKIN, M. A.; LESLIE K. E. Culture of bulk tank milk as a mastitis screening test: a brief review. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 34, 601-605. 1993. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1686618/pdf/canvetj00371-0027.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2017.

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, Chanpaign, v. 77, n. 7, p. 2103-2112, 1994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7929968>>. Acesso em: 10 jun. 2017.

HOGVEEN, H., PYORALA, S., WALLER, K. P., HOGAN, J. S., LAM, T., OLIVER, S. P., SCHUKKEN, Y. H., BARKEMA, H. W. & HILLERTON, J. E. Current status and future challenges in mastitis research. **NMC Annual Meeting Proceedings**, 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/254832388_Current_status_and_future_challenges_in_mastitis_research>. Acesso em 20 jun. 2017.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, **Censo Agropecuário 2006**.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estatística da Produção Pecuária**: março de 2015. Rio de Janeiro, 2015.

IDARON. Agência de defesa sanitária agrosilvopastoril do estado de Rondônia. **Levantamento de dados sobre a produção de leite em Rondônia**. Porto Velho, 2013. 15 p.

IDF. International Dairy Federation. Milk. Enumeration of somatic cells – Part 2: **Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters**. Brussels: IDF, v. 148, n.2, 2006.

JEVONS, M.P. Celbenin – resistant *Staphylococci*. **British Medical Journal**. Jan 12,

1(5219): 124-125, 1961. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1952888/pdf/brmedj02876-0102b.pdf>>.

Acesso em: 10 jun.2017.

KATAYAMA, Y.; ZHANG, Z.; CHAMBERS, F. PBP 2a Mutations Producing Very-High-Level Resistance to Beta-Lactams. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 453-459, 2004. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC321522/pdf/0512.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2017.

KEEFE, G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, 28, 203-216, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22664203>>. Acesso em: 10 jun . 2017.

KLUYTMANS, J.; VAN LEEUWEN, W.; GOESSENS, W.; HOLLIS, R. MESSER, S.; HERWALDT, L.; BRUINING, H.; HECK, M.; ROST.; VAN LEEWEN, N. Food-initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by phenoand genotyping. **Journal of Clinical Microbiology**: 33: 1121-1128, 1995.

KOSKINEN, M. T.; HOLOPAINEN, J.; PYORALA, S.; BREDBACKA, P.; PITKALA, A.; BARKENA, H.W.; BEIXIGA, R.; ROBERSON, J.; SOLVERED, L.; PICCININI, R.; KELTON, D.; LEHMUSTO, H.; NISKALA, S.; SALMIKIVI L. Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, Chanpaign, v. 92, p. 952-959, 2008.

LANGONI, H.; PINTO, M. P.; DOMINGUES, P. F.; LISTONI, F. J. P. Etiologia e susceptibilidade da mastite bovina subclínica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 43, p. 507-515, 1991.

LEIGH, J. A. *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis? **The Veterinary Journal**, v. 157, n. 3, p. 225-238, 1999. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10328836>>. Acesso 12 jun. 2017.

MAKOVEC, J. A.; RUEGG, P. L. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2000. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.3466- 3472, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14672176>>. Acesso em: 12 jun. 2017.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, relatórios da Rede Brasileira de Qualidade do Leite RBQLs, 2010. Disponível em:

<[http://cbql.com.br/pdf/4cbql/Eduardo%20Esteves%20Relatorio%20dos%20laboratorios%20da%20Rede%20Brasileira%20de%20Qualidade%20do%20Leite%20\(RBQL\).pdf](http://cbql.com.br/pdf/4cbql/Eduardo%20Esteves%20Relatorio%20dos%20laboratorios%20da%20Rede%20Brasileira%20de%20Qualidade%20do%20Leite%20(RBQL).pdf)>

Acesso: 10 de abr. 2017.

MARANAN, M. C.; MOREIRA, B.; BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R. S. Antimicrobial

resistance in *Staphylococci*. Epidemiology, molecular mechanisms and clinical relevance. **Infectious Disease Clinics of North America**. 11: 813-49, 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9421702>>. Acesso em: 10 jun. 2017.

MIMICA, M. J.; BEREZIN, E. N. *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina: um problema emergente. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas**. Santa Casa São Paulo, 51(2): 52-6, 2006. Disponível em: <http://www.fcmsantacasasp.edu.br/images/Arquivos_medicos/2006/51_2/vlm51n2_4.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2017.

MONECKE, S.; BERGER-BÄCHI, B.; COOMBS, G.; HOLMES, A.; KAY, I.; KEARNS, A.; LINDE, H.J.; O'BRIEN, F.; SLICKERS, P.; EHRICHT, R. Comparative genomics and DNA array-based genotyping of pandemic *Staphylococcus aureus* strains encoding Panton-Valentine leukocidin. **Clinical Microbiology Infectious**. Mar;13 (3):236-49, 2007. Disponível em: <[http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)62741-5/pdf](http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)62741-5/pdf)>. Acesso em 21 jun. 2017.

MOON, J. S.; LEE, A. R.; KANG, H. M.; LEE, E. S.; KIM, M. N.; PAIK, Y. H.; PARK, Y. H.; JOO, Y. S.; KOO, H. C. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p.1176-1185, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17297092>>. Acesso em: 15 jun. 2017.

MORK, T.; JORGENSEN, H. J.; SUNDE, M. KVITILE, B.; WAAGE, S. TOLLERSRUD, T. Persistence of *Staphylococcus* species and genotypes in the bovine udder. **Veterinary Microbiology**, v. 159, p. 171 – 180, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22503603>>. Acesso 20 mai. 2017.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 6º ed., Elsevier, 2009.

NADER FILHO, A.; AMARAL, L. A.; ROSSI JUNIOR, O. D.; PENHA, L. H. C. Sensibilidade dos *Staphylococcus* coagulase positiva e dos *Staphylococcus* coagulase negativa, isolados em casos de mastite bovina, à ação de antibióticos e quimioterápicos. **Revista Ars Veterinária**, v. 8, n. 2, p. 118-124, 1992.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. Verona: NMC, 2004. 47 p.

OLIVEIRA, C. M. C.; SOUSA, M. G. S.; SILVA, N. S.; MENDONÇA, C. L.; SILVEIRA, J. A. S.; OAIGEN, R. P.; ANDRADE, S. J. T.; BARBOSA, J. D. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 2011; 31(2): 104-110. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2011000200002>. Acesso em 20 mai. 2017.

OLIVEIRA, L. C. GOMES, M. F., VELLOSO, C. R. V. **Modernização da Legislação**

Sanitária Federal sobre leite e Derivados. In: CASTRO, M.C.D.; PORTUGAL, J.A.B. Perspectivas e Avanços em Laticínios. Juiz de Fora, EPAMIG. Centro Tecnológico da Zona da Mata, ILCT, 2000.

PAAPE, M.J.; TUCKER, H.A. Somatic cell content variation in fraction-collected milk. **Journal of Dairy Science**, v.49, p.265-267, 1966. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5960165>>. Acesso em: 15 jun. 2017.

PANTOSTI, A. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. **Frontiers in Microbiology**. Apr 9:3:127, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3321498/pdf/fmicb-03-00127.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2017.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. Mastitis: counter attack. A strategy to combat mastitis. **Naperville: BabsonBros**, 1991. 150 p.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos. **Guanabara Koogan**, 9 ed. Rio de Janeiro: 2002. 1772 p.

RUEGG, P. L. Mastitis in Dairy Cows. **Veterinary Clinics Food Animal**. 28, 2012.

SABOUR, P.M.; GILL, J.J.; LEPP, D. PACAN, J.C.; AHMED, R.; DINGWELL, R.; LESLIE, K. Molecular Typing and Distribution of *Staphylococcus aureus* Isolates in Eastern Canadian Dairy Herds. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.3449-3455, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC497614/pdf/0432-04.pdf>>. Acesso em: 22 jun. 2017.

SANDHOLM, M.; KAARTINEN, L.; PYÖRALA, S. Bovine mastitis-why does antibiotic therapy not always work? An overview. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, 13, 248-260, 1990. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2231865>>. Acesso em: 21 jun. 2017.

SANTOS, F. F. dos. Caracterização fenotípica e molecular da resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina / Fernanda Fernandes dos Santos. - - 2014. 100 p.: il. Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2014. Disponível em: <<https://repositorio.ufjf.br/jspui/bitstream/ufjf/816/1/fernandafernandesdossantos.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2017.

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

SCHALM O. W.; CARROL E.; JAIN N. C. Bovine Mastitis. **Philadelphia: Lea and**

Febiger, 1971. 360p.

SEBRAE. Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Diagnóstico do Agronegócio do leite e seus Derivados no estado de Rondônia**. Porto Velho, 2015.

SOUZA, G. N., BRITO, J. R. F.; MOREIRA, E. C.; BRITO, M. A. V. P.; SILVA, M. V. G. B. Variações da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, v.61, n.5, p.1015-1020, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v61n5/a01v61n5.pdf>>. Acesso em: 22 mar. 2017.

TURKYLMAZ, S.; TEKBIYIK, S.; ORYASIN, E.; BOZDOGAN, B. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. **Zoonoses Public Health**. 2010 May; 57(3): 197-203. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19912611>>. Acesso em: 12 jun. 2017.

VINTOV, J.; AARESTRUP, F.M.; ZINN, C.E.; OLSEN, J.E. Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. **Veterinary Microbiology**, v.95, p.133-147, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12860083>>. Acesso em: 5 jun. 2017.

VOSS, A. LOEFFEN, F., BAKKER, J., KLAASSEN, C., WULF, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. **Emerging Infectious Diseases**; 11: 1965-1966, 2005. Disponível: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3367632/pdf/05-0428.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2017.

WESSE, J. S. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Animals. **ILAR Journal**, v. 51, n.3, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21131724>>. Acesso em: 20 jun. 2017.

WITTE, W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, n.4, p. 321-325, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10794954>>. Acesso em: 20 jun. 2017.

WULF, M., & VOSS, A. MRSA in livestock animals – An epidemic waiting to happen? **Clinical Microbiology and Infections** 14: 519-521, 2009. Disponível em: <[http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)61947-9/pdf](http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)61947-9/pdf)>. Acesso em: 20 jun. 2017.

ANEXO

ANEXO A – QUESTIONÁRIO

QUESTIONÁRIO PROJETO EPI RO
“Caracterização epidemiológica e estratégias de controle da mastite bovina”
(Projeto MP3 – Edital Embrapa SEG 01/2012)

Código do rebanho: _____ **Atividade:** _____ (preenchimento interno)
Proprietário: _____ **Propriedade:** _____
Telefone: (____) _____ **E-mail:** _____

1. LOCALIZAÇÃO DO REBANHO

- 1.1. Coordenadas geográficas: a. Latitude: _____ b. Longitude: _____ c. Altitude: _____
1.2. Endereço: Linha: _____ Lote: _____ Gleba: _____
1.3. Cidade: _____
1.4. Tanque comunitário, quando for o caso: _____
1.5. Se tanque comunitário, leite entregue por: _____
1.6. Horário da ordenha: _____ 1.7. Horário da coleta da amostra: _____

2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DO REBANHO

- 2.1. Número de vacas em lactação: _____
2.2. Número de vacas de primeira cria: _____
2.3. Número de vacas de segunda cria: _____
2.4. Número de vacas de terceira cria: _____
2.5. Número de vacas com mais de 3 crias: _____
2.6. Número de vacas secas: _____
2.7. Produção total de leite/dia:
a. Período Seco _____ litros/dia b. Período Chuvoso _____ litros/dia
2.8. Raça do rebanho:
() Gir () Jersey () Pardo Suíço
() Holandês () Mestiço () Girolanda
() Outra _____

3. MANEJO ALIMENTAR

- 3.1. Qual o sistema de produção adotado:
() Pasto () Pasto + Suplementação () Dieta total no cocho
3.2. Se utiliza suplementação, qual o período da oferta aos animais:
() Seca () Chuva () Todo o ano
3.3. Qual o tipo de suplementação:
() Cana com uréia () Silagem () Outros, especificar _____
3.4. Qual a quantidade fornecida de suplemento no rebanho: Total (Kg/dia): _____
3.5. Quanto à mineralização, utiliza:
() Sal mineral () Sal comum () Mistura (sal mineral + sal comum) () Não utiliza
3.6. Quantidade utilizada:
Sal mineral _____ Kg/rebanho/mês

Sal comum _____ Kg/rebanho/mês

4. INFRA-ESTRUTURA E MANEJO DA PROPRIEDADE

- 4.1. Tipo de ordenha: () Manual () Mecânica- balde ao pé () Mecânica- sistema canalizado
- 4.2. Presença do bezerro no momento da ordenha: () Sim () Não
- 4.3. Local de ordenha: () Sala de ordenha () Curral () Outro: _____
- 4.4. Número de ordenhas por dia: () Uma () Duas () Três
- 4.5. Armazenamento do leite
- () Tanque de expansão direta () Tanque coletivo
- () Tanque de imersão () Entrega em latão na indústria
- 4.6. Sistema de criação de bezerras: () Individual () Coletivo
- 4.7. Adquire fêmeas bovinas de outras propriedades? () Sim () Não

5. HIGIENE E MANUTENÇÃO DOS EQUIPAMENTOS E UTENSÍLIOS DE ORDENHA

- 5.1. Qual o produto utilizado na limpeza dos utensílios e materiais de ordenha? _____
- 5.2. Qual o procedimento adotado para limpeza dos equipamentos de ordenha (produtos utilizados e frequência de uso):
- a. Detergente alcalino: () Sim () Não Frequência de uso: _____
- b. Detergente ácido: () Sim () Não Frequência de uso: _____
- c. Sanitizante: () Sim () Não Frequência de uso: _____
- d. Outros produtos, especificar _____ Frequência de uso: _____
- 5.3. Dispõe de água quente no local da ordenha? () Sim () Não
- 5.4. Realiza manutenção da ordenhadeira? () Sim, frequência _____ () Não

6. PROGRAMA DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE MASTITE

- 6.1. Há acompanhamento do rebanho por um técnico?
- () Veterinário () Agrônomo () Zootecnista
- () Técnico agrícola () Não há
- 6.2. Utiliza água na ordenha dos animais? () Sim, fonte de água _____ () Não
- 6.3. Se sim, a água utilizada na ordenha é tratada? () Sim, produto utilizado _____ () Não
- 6.4. Examina os primeiros jatos de leite (teste da caneca de fundo escuro)? () Sim () Não
- 6.5. Lava os tetos com água antes da ordenha? () Sim () Não () Quando necessário
- 6.6. Desinfeta os tetos antes da ordenha? () Sim, produto utilizado _____ () Não
- 6.7. O que usa para secar os tetos?
- () Não seca () Papel toalha () Pano comum () Outra forma: _____
- 6.8. Desinfeta os tetos depois da ordenha? () Sim () Não
- 6.9. As vacas são alimentadas: () antes ou durante a ordenha () após a ordenha () não alimenta
- 6.10. Realiza o tratamento imediato de todos os casos clínicos de mastite: () Sim () Não
- 6.11. Realiza o tratamento da vaca seca (tratamento a secagem)?
- () Todas as vacas () Parte das vacas (seleciona animal para tratamento a secagem)
- () Não realiza
- 6.12. Realiza o teste de CMT? () Sim, periodicidade _____ () Não

- 6.13. Realiza linha de ordenha? () Sim () Não
- 6.14. Utiliza como critério de descarte a repetição de casos de mastite clínica? () Sim () Não
- 6.15. Faz contagem de células somáticas: () Animais () Rebanho () Não faz
- 6.16. Anotar as três últimas contagens de células somáticas obtidas no rebanho:

7. APLICAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS

- 7.1. Quais os casos em que usa tratamento com antibióticos das vacas?
- () Doença de casco () Mastite () Pneumonia
- () Diarréia () Metrite () Outros _____
- 7.2. Há um protocolo de uso de antibióticos para tratamento de mastite? () Sim () Não
- 7.3. Se a resposta do item 7.2 for afirmativa, anotar o protocolo usado: _____
- _____
- 7.4. Quem recomenda os medicamentos para tratamento da mastite? _____
- 7.5. Realiza registro (anotação) dos tratamentos para mastite? () Sim () Não
- 7.6. Realiza (anotação) dos tratamentos para outras doenças? () Sim () Não
- 7.7. Utiliza alguma maneira visual para marcar os animais tratados com antibióticos?
- () Sim () Não
- 7.8. Verifica a bula e respeita o período de carência quando trata as vacas em lactação com antibióticos?
- () Sim () Não
- 7.9. Quando realiza o tratamento com antibióticos, qual o destino do leite do animal?
- () Fornecido apenas os bezerros machos () Fornecido a todos os bezerros
- () Outro destino: _____
- 7.10. Utiliza algum antibiótico da linha não-veterinária para tratamento da mastite? () Sim () Não
- 7.11. Quantos tratamentos de mastite clínica foram realizados nos últimos 12 meses? _____
- 7.12. Anote o nome comercial e as bases dos antibióticos utilizados na propriedade.

Observações (caso haja alguma observação relacionada a alguma questão do questionário, usar o número da questão para identificação da observação):

Data da entrevista ____ / ____ / ____ Entrevistador _____