

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFICÁCIA “IN VITRO” E “IN VIVO” DA CEFOPERAZONA SÓDICA,
GENTAMICINA E CIPROFLOXACINO NO TRATAMENTO
INTRAMAMÁRIO DA MASTITE CLÍNICA BOVINA

SÉRGIO RICARDO MAIOLINO

Botucatu – SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFICÁCIA “IN VITRO” E “IN VIVO” DA CEFOPERAZONA SÓDICA,
GENTAMICINA E CIPROFLOXACINO NO TRATAMENTO
INTRAMAMÁRIO DA MASTITE CLÍNICA BOVINA

SÉRGIO RICARDO MAIOLINO

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós Graduação
em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro

Botucatu – SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Maiolino, Sérgio Ricardo.

Eficácia "in vitro" e "in vivo" da cefoperazona sódica, gentamicina e ciprofloxacino no tratamento intramamário da mastite clínica bovina / Sérgio Ricardo Maiolino. – Botucatu : [s.n.], 2013

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

Orientador: Márcio Garcia Ribeiro

Capes: 50502034

1. Bovino – Doenças. 2. Mastite. 3. Infecções estafilocócicas. 4. Produtos de ação antimicrobiana. 5. Antibióticos – Efeito fisiológico.

Palavras-chave: Cura bacteriológica; Cura clínica; Mastite clínica bovina; Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos; Tratamento intramamário.

Nome do autor: Sérgio Ricardo Maiolino

Data da Defesa: 27 de fevereiro de 2013

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Dr. Antonio Carlos Paes

Membro Titular

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Dr. Geraldo Nardi Júnior

Membro Titular

Tecnologia em Agronegócio – Produção Animal

FATEC – Botucatu/SP

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, aos meus pais, Francisco e Sonia Maiolino pela minha existência e a oportunidade de me manifestar. Aos meus amigos, que estão por aqui ou já se foram, pelo apoio que sempre recebi. Ao Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro por me receber como orientado permitindo o engrandecimento do meu conhecimento como médico veterinário e docente.

Agradeço a Glauceia Suman Maiolino, esposa, amiga e companheira eterna pelo incentivo, apoio e garra que a mim foram doados. Palavras nunca expressarão meus agradecimentos.

Muito obrigado!

EPÍGRAFE

"Esta noite deixei me absorver pela meditação sobre a natureza celeste. Eu admirava o número, a disposição, o curso daqueles globos infinitos. Entretanto, eu admirava ainda mais a inteligência infinita que preside este vasto mecanismo. Eu dizia a mim mesmo... É preciso que sejamos bem cegos pra não ficarmos extasiados com tal espetáculo, tolos e ingênuos para não reconhecermos seu Autor e loucos para não adorá-lo."

ISAAC NEWTON

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Cura clínica e bacteriológica em dez vacas com mastite por diferentes micro-organismos, utilizando a cefoperazona sódica no tratamento convencional (3 aplicações do anti-mastítico) e no estendido (6 aplicações do anti-mastítico). Botucatu, SP, 2010 a 2011. p. 43
- Quadro 2.** Cura clínica e bacteriológica em dez vacas com mastite por diferentes micro-organismos, utilizando a gentamicina no tratamento convencional (3 aplicações do anti-mastítico) e no estendido (6 aplicações do anti-mastítico). Botucatu, SP, 2010 a 2011. p. 44
- Quadro 3.** Cura clínica e bacteriológica em dez vacas com mastite por diferentes micro-organismos, utilizando o ciprofloxacino no tratamento convencional (3 aplicações do anti-mastítico) e no estendido (6 aplicações do anti-mastítico). Botucatu, SP, 2010 a 2011. p. 45

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, pelo método de difusão com discos, em diferentes linhagens bacterianas isoladas de vacas com mastite, frente à cefoperazona sódica. Botucatu, SP, 2008 a 2012. p. 39
- Tabela 2.** Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, pelo método de difusão com discos, em diferentes linhagens bacterianas isoladas de vacas com mastite, frente à gentamicina. Botucatu, SP, 2008 a 2012. p. 40
- Tabela 3.** Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, pelo método de difusão com discos, em diferentes linhagens bacterianas isoladas de vacas com mastite, frente ao ciprofloxacino. Botucatu, SP, 2008 a 2012. p. 41
- Tabela 4.** Micro-organismos isolados, em cultura pura ou em associação, em 30 vacas com mastite clínica, naturalmente infectadas, segundo três grupos de tratamento antimicrobiano por via intramamária. Botucatu, SP, 2010 a 2011. p. 42
- Tabela 5.** Eficácia de cura clínica do tratamento intramamário (convencional e estendido) de vacas com mastite clínica, utilizando cefoperazona sódica (G1), gentamicina (G2) e ciprofloxacino (G3). Botucatu, SP, 2010 a 2011. p. 45
- Tabela 6.** Eficácia de cura bacteriológica do tratamento intramamário (convencional e estendido) de vacas com mastite clínica, utilizando cefoperazona sódica (G1), gentamicina (G2) e ciprofloxacino (G3). Botucatu, SP, 2010 a 2011. p. 46

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	p. 12
2.	REVISÃO DA LITERATURA	p. 15
2.1.	Mastite bovina: aspectos gerais	p. 15
2.1.1.	Etiologia e Epidemiologia	p. 16
2.1.2.	Patogenia e Imunidade	p. 20
2.1.3.	Diagnóstico	p. 21
2.1.4.	Controle e Prevenção	p. 24
2.1.5.	Tratamento	p. 25
2.1.5.1.	A escolha do antimicrobiano	p. 26
2.1.6.	Principais grupos de fármacos	p. 27
2.1.6.1.	Penicilinas e derivados	p. 27
2.1.6.2.	Cefalosporinas	p. 27
2.1.6.3.	Aminoglicosídeos	p. 28
2.1.6.4.	Fluorquinolonas	p. 29
2.1.7.	Tratamento da mastite clínica e subclínica	p. 30
2.1.8.	Hipóteses de estudo	p. 33
3.	OBJETIVOS	p. 34
3.1.	Geral	p. 34
3.2.	Específicos	p. 34
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	p. 34
4.1.	Delineamento experimental	p. 34
4.2.	Animais	p. 35
4.3.	Diagnóstico da mastite clínica	p. 35
4.4.	Grupos de tratamento	p. 35
4.5.	Protocolos de tratamento intramamário (convencional e estendido)	p. 35
4.6.	Isolamento e caracterização dos micro-organismos	p. 36
4.7.	Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”	p. 36
4.8.	Acompanhamento dos animais	p. 37
4.9.	Avaliação da cura clínica e cura bacteriológica	p. 37
4.10.	Grupo controle negativo	p. 37
4.11.	Critérios de exclusão de animais	p. 37

4.12.	Tratamento estatístico dos resultados	p. 38
5.	RESULTADOS	p. 42
6.	DISCUSSÃO	p. 47
7.	CONCLUSÕES	p. 53
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	p. 54
9.	TRABALHO CIENTÍFICO	p. 60
9.1.	Normas da Revista Veterinária e Zootecnia	p. 60
9.2.	Artigo	p. 61

MAIOLINO, S.R. **Eficácia “in vitro” e “in vivo” da cefoperazona sódica, gentamicina e ciprofloxacino no tratamento intramamário da mastite clínica bovina.** Botucatu, 2013. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O presente estudo comparou a eficácia “in vitro” e “in vivo” da cefoperazona sódica, gentamicina e ciprofloxacino no tratamento intramamário de casos de mastite clínica bovina. Foram utilizadas 30 vacas com mastite clínica, não sistêmica, divididas em três grupos de dez animais. Em cada grupo foi utilizado um dos antimicrobianos citados, para o tratamento convencional da mastite (três aplicações a cada 12 horas) e o tratamento estendido (seis aplicações a cada 12 horas). Os principais micro-organismos isolados dos quartos mamários com mastite foram *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e enterobactérias. A eficácia da cura clínica do tratamento convencional foi de 50% para o grupo tratado com cefoperazona sódica, 70% para o grupo tratado com gentamicina e 50% para o grupo tratado com ciprofloxacino. Para os mesmos grupos, a eficácia da cura clínica do tratamento estendido foi 90%, 100% e 80%, respectivamente. A eficácia da cura bacteriológica foi de 100% para o grupo tratado com cefoperazona sódica e de 90% para os grupos utilizando a gentamicina e ciprofloxacino no tratamento convencional. Para os mesmos grupos, foi observado 100% de cura bacteriológica para a gentamicina e 90% para os grupos com cefoperazona sódica e ciprofloxacino no tratamento estendido. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ($P>0,01$) para a cura clínica e cura bacteriológica dentro de cada grupo e entre os grupos de antimicrobianos, tampouco entre os tratamentos convencional e estendido dentro do mesmo grupo ou entre os grupos. Os resultados do presente estudo reforçam a importância da lactocultura e do teste de sensibilidade microbiana “in vitro” como respaldo para os tratamentos intramamários de vacas com mastite clínica. Inferiu-se também a boa eficácia na cura clínica e bacteriológica da cefoperazona sódica, gentamicina e ciprofloxacino no tratamento da mastite clínica em vacas na lactação, de forma convencional ou estendida, contanto que respaldado na sensibilidade

microbiana “in vitro”. A terapia estendida deve ser reservada para o tratamento de casos especiais de mastite bovina.

Palavras-chave: mastite clínica bovina; tratamento intramamário; cura clínica; cura bacteriológica; perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

MAIOLINO, S.R. ***In vitro* and *in vivo* efficacy of sodium cefoperazone, gentamicin and ciprofloxacin for the intramammary treatment of clinical mastitis in cows.** Botucatu, 2013. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

This study compared the *in vitro* and *in vivo* efficacy of sodium cefoperazone, gentamicin and ciprofloxacin for the intramammary treatment of clinical mastitis in cows. Thirty cows suffering from non-systemic, clinical mastitis were divided into three groups of ten animals each. One of the above mentioned antibiotics was used in each group for conventional (i.e., three administrations of the drug, each 12 hours) and extended (i.e., six administrations of the drug, each 12 hours) treatments of mastitis. The most common microorganisms isolated from cows were *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. and enterobactéria. The efficacy of clinical cure of the conventional treatment was 50%, 70% and 50% for the groups treated with sodium cefoperazone, gentamicin and ciprofloxacin, respectively. Regarding the extended treatment, efficacy was 90%, 100% and 80%, for sodium cefoperazone, gentamicin and ciprofloxacin, respectively. Efficacy of bacteriological cure was 100% for sodium cefoperazone, and 90% for both gentamicin and ciprofloxacin using the conventional treatment. By using the extended treatment, efficacy of bacteriological cure was 100% for gentamicin and 90% for both cefoperazone and ciprofloxacin. Statistical differences ($p>0.01$) were not found in clinical or in bacteriological cure into the same group or among groups. Similarly, statistical differences between the conventional and extended treatments were not found. The results from this study reinforce the importance of performing microbiological culture of milk and *in vitro* antimicrobial sensitivity tests for supporting the intramammary treatment of clinical mastitis in cows. The clinical and bacteriological efficacy of sodium cefoperazone, gentamicin and ciprofloxacin in lactating cows was also observed in both conventional and extended treatments provided the use of sensitivity tests *in vitro*. Extended treatments should be used in selected cases of bovine mastitis.

Key words: clinical mastitis in cows; intramammary treatment; clinical cure; bacteriological cure; antimicrobial sensitivity test.

1. INTRODUÇÃO

A mastite figura dentre as doenças que mais oneram a criação de bovinos de leite, devido à redução na produção, alterações na composição, gastos com medicamentos, honorários veterinários e reposição de animais (LANGONI, 1997). No entanto, no Brasil poucos estudos tem se preocupado em avaliar os custos da mastite, no que tange a redução na produção de leite, depreciação dos animais e gastos com medicamentos, incluindo o tratamento (COSTA et al., 2000; NADER FILHO et al., 2002).

A mastite bovina caracteriza-se por processo inflamatório da glândula mamária, que provoca alterações físicas, químicas, celulares e bacteriológicas do leite, bem como por modificações patológicas do tecido glandular, podendo determinar lesões irreversíveis no parênquima mamário (COSTA et al., 2003).

No ano de 2012, o Brasil produziu cerca de 32 bilhões de litros, com efetivo de rebanho leiteiro ao redor de 25 milhões de vacas ordenhadas. Apesar do grande volume de produção de leite no país, os índices de produção por animal/dia (3 a 5 litros/vaca) e por animal em lactação (ao longo de 300 dias) são considerados baixos, ao redor de 1270 litros/vaca/ano. Esta produção representa 30 a 50% da média obtida nos principais países produtores de leite. Em contraste, várias regiões do país possuem ótimas condições de produção, com médias superiores a 20 litros/vaca/dia. Fatores de manejo (qualidade e manejo das instalações e práticas de ordenha), nutricionais, de produção (estágio da lactação) e dos animais (raça, idade, condição física do teto, resistência genética à mastite), além de baixo investimento em infra-estrutura e mão de obra desqualificada podem influenciar na ocorrência da mastite (FONSECA e SANTOS, 2000; RADOSTITS et al., 2007; RIBEIRO, 2008).

As infecções da glândula mamária em bovinos se notabilizam pela pluralidade etiológica. Convencionalmente, os micro-organismos envolvidos na gênese da mastite bovina estão agrupados em contagiosos e ambientais, com base nas fontes de infecção e vias de transmissão (LANGONI et al., 1999; NADER FILHO et al., 2002; COSTA et al., 2003). Os contagiosos são encontrados na microbiota da pele e mucosas dos animais, transmitidos fundamentalmente no momento da ordenha, pelas mãos do ordenhador, pelo úbere, pelo próprio equipamento de ordenha ou pelo bezerro ao mamar. Em

contraste, os ambientais estão amplamente distribuídos no meio ambiente dos animais, veiculados para a glândula mamária a partir do solo, fezes, ar, água, vetores, utensílios e fômites (RIBEIRO, 2008).

A mastite é classicamente subdividida em clínica e subclínica, de acordo com a severidade e exteriorização do processo inflamatório (LANGONI, 1997; COSTA et al., 2003). A mastite clínica caracteriza-se por alterações visíveis na glândula mamária e/ou no leite (LANGONI et al., 2000; NADER FILHO et al., 2002). Nestes casos, a glândula mamária pode apresentar sinais de edema, dor, calor, rubor e perda momentânea da função, além de alterações visíveis no leite (formação de grumos, pus, dessora, coágulos) [LANGONI, 1997; COSTA et al., 2000; NADER FILHO et al., 2002].

Na forma subclínica, somente se observa a redução na produção de leite. Nestes animais, o diagnóstico somente é alcançado utilizando métodos que permitam a detecção de alterações na composição e constituintes celulares do leite (COSTA et al., 2003).

A adoção do tratamento utilizando antimicrobianos é um dos principais procedimentos na abordagem da mastite em animais domésticos (RIBEIRO, 2008). Diversos protocolos terapêuticos são utilizados na prática veterinária no tratamento da mastite em vacas na lactação e no período de secagem (LANGONI et al., 1999).

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

Os maiores índices de cura no tratamento por via intramamária da mastite bacteriana em vacas são obtidos com 3 a 5 aplicações, em intervalos de 8, 12 a 24 h (dependendo das características e vida média de cada antimicrobiano). Nos casos de mastite subclínica, não existe consenso sobre o tratamento no decorrer da lactação, ficando geralmente estes animais para serem tratados na terapia da vaca seca, na qual os animais são tratados com dose única do anti-mastítico, em cada teto do animal, no dia da secagem (COSTA, 1999; RIBEIRO, 2008).

Nos casos de mastite por micro-organismos refratários ao tratamento no decorrer da lactação, notadamente por *Staphylococcus aureus*, tem-se preconizado, alternativamente, a terapia estendida, que consiste em 6 a 8 aplicações de anti-mastíticos via intramamária, com intuito de melhorar as taxas de cura clínica e bacteriológica (SANTOS e FONSECA, 2007). No entanto, esta modalidade alternativa de tratamento apresenta maior custo ao produtor, em virtude do maior número de anti-mastíticos requeridos por animal (RIBEIRO, 2008).

Diferentes antimicrobianos estão disponíveis comercialmente para o tratamento intramamário da mastite em vacas no Brasil (COSTA, 1999). Segundo Ribeiro (2008), os princípios ativos de antimicrobianos mais utilizados pertencem ao grupo das penicilinas e derivados, aminoglicosídeos, fluorquinolonas, tetraciclina e sulfas potencializadas pelo trimetoprim.

O uso indevido ou não racional de antimicrobianos (dose reduzida, interrupção do tratamento) no tratamento da mastite, pode aumentar a pressão seletiva para linhagens com resistência múltipla (LANGONI, 1997, NADER FILHO et al., 2002).

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

Considerando que a mastite é a principal doença infectocontagiosa que acomete bovinos de produção leiteira, os diferentes protocolos de tratamento (convencional e estendido) e princípios ativos anti-mastíticos disponíveis no

Brasil, a variação entre a eficácia “in vitro” e “in vivo” dos fármacos e a escassez no país de dados sobre a relação custo/benefício do tratamento; o presente estudo investigou a eficácia “in vitro” e “in vivo” da cefoperazona sódica, gentamicina e ciprofloxacino no tratamento intramamário, convencional e estendido, na mastite clínica bovina.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Mastite bovina: Aspectos gerais

A palavra mastite é derivada da palavra grega *mastos*, que significa “mama”, e do sufixo *itis*, que significa “inflamação” (PHILPOT e NICKERSON, 2002).

A mastite, reconhecida como a inflamação da glândula mamária, de etiologia complexa, é caracterizada por alterações físico-químicas, organolépticas, na celularidade do leite e patológicas no parênquima mamário de animais domésticos. Em animais de produção, se destaca como a principal doença que afeta a atividade leiteira, decorrente de alterações que comprometem o consumo *in natura* e a industrialização do produto e derivados. Causa prejuízos também com a queda na produção, gastos com medicamentos, honorários veterinários, perda de tetos, descarte prematuro e/ou morte ocasional de animais. As causas de inflamação da glândula mamária em animais são caracterizadas pela pluralidade etiológica. Possuem origem traumática, fisiológica, alérgica, neoplásica e principalmente infecciosa. Os processos infecciosos da glândula mamária são determinados, predominantemente, por micro-organismos de origem bacteriana e, secundariamente, por fungos, algas e vírus, muitos com potencial zoonótico (RIBEIRO, 2008).

As transformações mais significativas visíveis no leite mastítico são: a mudança de cor, o aparecimento de coágulos ou estrias e a dessora. A glândula mamária apresenta aumento de volume, elevação da temperatura, dor e endurecimento em muitos casos clínicos. Contudo, certo número de animais infectados não apresenta alterações na glândula identificada pela palpação manual, ou mesmo no exame visual do leite, denominada mastite subclínica

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

A reação inflamatória nas glândulas afetadas visa eliminar o micro-organismo infectante, neutralizar suas toxinas e auxiliar no restabelecimento dos tecidos produtores de leite para que a glândula possa voltar à sua função normal. Basicamente, as infecções podem ser classificadas em clínicas e subclínicas. Nas infecções subclínicas não podem ser detectadas alterações por observações visuais do úbere ou do leite, pois ambos apresentam aparência normal, enquanto as clínicas são caracterizadas por anormalidades visíveis no úbere e no leite, cuja gravidade pode variar durante o curso da doença (PHILPOT e NICKERSON, 2002).

2.1.1 Etiologia e epidemiologia

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

Aproximadamente 140 micro-organismos, entre espécies, subespécies e sorovares já foram registrados na gênese das mastites (SANTOS e FONSECA, 2007). Os micro-organismos ambientais são representados pelas enterobactérias, fungos, algas e certos actinomicetos. Estão amplamente distribuídos no meio ambiente dos animais, e são veiculados para a glândula mamária a partir do solo, fezes, ar, água, cama dos animais, vetores, utensílios e fômites, geralmente no período das entre-ordernhas. Dentre os contagiosos, merecem destaque os gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, além de *Corynebacterium bovis* e *Mycoplasma bovis*. Este grupo possui como habitat a

microbiota da pele e mucosas dos animais, transmitidos fundamentalmente no momento da ordenha, pelas mãos do ordenhador, pelo próprio úbere, pelo equipamento de ordenha ou pelo bezerro no ato de mamar (COSTA et al., 1995; RADOSTITS et al., 2007; RIBEIRO, 2008).

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) são bactérias Gram-positivas, geralmente encontradas colonizando o canal e pele do teto, ou o interior da glândula mamária, principalmente em animais com a pele da glândula lesada. No momento da ordenha, a transmissão ocorre principalmente pelas mãos do ordenhador por panos/esponjas de uso múltiplo, ou pelos insufladores da ordenhadeira mecânica (RADOSTITS et al., 2007).

As infecções por *S. aureus* são consideradas de difícil tratamento, devido à elevada resistência da bactéria aos antimicrobianos convencionais (NADER FILHO et al., 2007).

Outra característica de patogenicidade de *S. aureus* é a sua capacidade de invasão e instalação em partes profundas da glândula mamária. Ademais, geralmente há formação de tecido fibroso no foco da infecção, formando microabscessos que limitam o acesso dos antimicrobianos no sítio da infecção. Este mecanismo confere uma das principais características do agente, que se traduz por infecções de longa duração, com tendência a cronicidade e baixa taxa de cura, tanto espontânea como após o tratamento antimicrobiano (PHILPOT e NICKERSON, 2002).

Os estreptococos são um grupo importante de bactérias envolvidas nas inflamações mamárias em vacas. *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus bovis* são as espécies mais patogênicas na mastite bovina. À semelhança dos estafilococos, o gênero *Streptococcus* está presente na microbiota de mucosas, conjuntivas e pele dos animais e humanos (em especial na pele do úbere e tetos dos animais), o que predispõe às infecções no momento da ordenha. Pode ser isolado também de superfícies contaminadas com leite, tais como insufladores e mãos dos ordenhadores (SANTOS e FONSECA, 2007). A transmissão desta bactéria Gram-positiva ocorre principalmente durante a ordenha. Dentre os estreptococos, *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) é reconhecido como a espécie mais frequente na casuística da mastite em animais de produção, manifestando-se na grande maioria das vezes na forma subclínica, endêmica,

com evolução crônica e rápida disseminação entre os animais. Usualmente as infecções por *S. agalactiae* levam a altas contagens de células somáticas (CCS) [RIBEIRO, 2008].

S. agalactiae compromete também a qualidade do leite de todo o rebanho, visto que é um dos poucos micro-organismos que determinam elevação da contagem bacteriana total do leite (CBT). Tal fato ocorre provavelmente porque vacas infectadas por *S. agalactiae* podem eliminar elevado número de colônias de bactérias no leite (FONSECA e SANTOS, 2000; PHILPOT e NICKERSON, 2002).

Corynebacterium bovis (*C. bovis*) também é considerado agente relevante na etiologia, posto que esta bactéria Gram-positiva é encontrada principalmente no interior da glândula mamária e ducto do teto. É extremamente contagiosa durante a lactação e coloniza o úbere por períodos prolongados. A alta ocorrência de *C. bovis* nos rebanhos indica, geralmente, deficiências nos procedimentos de desinfecção dos tetos na pós-ordenha. No entanto, *C. bovis* apresenta baixa virulência, o que determina pequeno aumento na CCS ao redor de 300-400 mil células/mL. As infecções são quase sempre subclínicas e leves, mas ocasionalmente pode causar mastite clínica (FONSECA e SANTOS, 2000; RIBEIRO, 2008).

Mycoplasma também participa da etiologia das mastites contagiosas, particularmente para vacas, ovelhas e cabras. Os micoplasmas são transmitidos para a glândula mamária usualmente no momento da ordenha e durante as infusões intramamárias, sem prévia anti-sepsia dos tetos. São transmitidas também por via aerógena ou por disseminação sistêmica, a partir de infecções primárias de outros órgãos (RADOSTITS et al., 2007). Deve-se suspeitar de mastite causada por micoplasma quando amostras de leite de vacas com sinais clínicos, geralmente em vários quartos, são negativas após repetidas culturas, realizadas a partir de métodos microbiológicos padrões. Embora existam numerosas espécies de micoplasma, *Mycoplasma bovis* é o mais frequente na casuística da mastite bovina (PHILPOT e NICKERSON, 2002), apesar de reduzido número de descrições em bovinos no Brasil (SANTOS e FONSECA, 2007).

A mastite ambiental é causada por agentes que habitam preferencialmente o ambiente da vaca, em locais como esterco, urina, barro e camas orgânicas. Este tipo de mastite caracteriza-se por alta ocorrência de casos clínicos, geralmente de curta duração, frequentemente com manifestação aguda e com maior concentração nos momentos do pré e pós-parto imediato (RADOSTITS et al., 2007). Ao contrário da mastite contagiosa, a maioria das novas infecções por ambientais ocorre durante o período entre as ordenhas, embora também ocorram novos casos durante a ordenha, especialmente em situações nas quais há problemas de funcionamento do sistema de ordenha. Visto que os patógenos ambientais estão disseminados por todo o ambiente da vaca, é quase impossível erradicar este tipo de mastite, ao contrário de certos agentes contagiosos passíveis de erradicação. Além disso, dada a grande disseminação dessas bactérias ambientais nos criatórios, todas as categorias animais estão sob risco: vacas em lactação, vacas secas e novilhas (FONSECA e SANTOS, 2000).

As enterobactérias (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter aerogenes*), os estreptococos ambientais (*Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*) e menos comumente certas leveduras (*Candida* sp., *Cryptococcus* sp.), algas (*Prototheca zopfii*) e fungos são os principais agentes etiológicos das infecções mamárias por ambientais (LANGONI et al., 1999; FONSECA e SANTOS, 2000; RADOSTITS et al., 2007). As enterobactérias destacam-se também como a principal causa de mastite clínica em rebanhos com bom controle de agentes contagiosos (RIBEIRO, 2008). Os estreptococos ambientais encontram-se amplamente disseminados no ambiente da vaca e as infecções são comuns durante o período seco.

Os prejuízos econômicos decorrentes da inflamação da glândula mamária são atribuídos principalmente a diminuição da secreção láctea, ao descarte do leite, ao custo da assistência veterinária, ao uso de medicamentos, a perda de quartos mamários, descarte precoce de fêmeas e morte ocasional de animais (LANGONI et al., 2000; NADER FILHO et al., 2002). No entanto, o fator de maior impacto da doença é devido a redução na produção leiteira (COSTA et al., 2000; NADER FILHO et al., 2002). Em 2008, o Brasil estimou prejuízo de 1,2 bilhões de litros com a mastite (ARASHIRO et al., 2008). Nos EUA, calcula-se prejuízo de aproximadamente 1,8 bilhões de dólares/ano

provocado pela mastite (NMC, 1996). Philpot e Nickerson (2002) relataram que um quarto mamário infectado pode produzir aproximadamente 725 kg a menos durante uma lactação, quando comparado com um quarto sadio.

2.1.2 Patogenia e imunidade

Quanto aos aspectos de infecção relacionados ao agente etiológico, faz-se importante considerar as características de infectividade, patogenicidade, viabilidade e imunogenicidade. A infectividade é a capacidade de o agente infeccioso invadir e multiplicar no hospedeiro. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* e estafilococos coagulase negativos apresentam alta taxa de infectividade, em virtude da alta transmissão desse micro-organismo entre os animais. *Streptococcus uberis* são considerados de baixa infectividade, havendo necessidade de maior número de micro-organismos para que se estabeleça a infecção (QUINN et al., 2005). Entende-se por patogenicidade a capacidade dos micro-organismos determinarem lesões no hospedeiro, enquanto a viabilidade como a capacidade dos patógenos manterem-se viáveis fora do organismo do hospedeiro. Imunogenicidade é a capacidade do agente de induzir resposta imune no animal susceptível (FONSECA e SANTOS, 2000; RADOSTITS et al., 2007).

A infecção mamária bovina ocorre quando os patógenos invadem via ascendente o canal do teto e multiplicam-se dentro do quarto afetado. Podem ingressar também durante a ordenha mecânica pela pressão negativa exercida pelos insufladores, por flutuações de vácuo, ou pela contaminação do canal do teto durante o tratamento intramamário (PHILPOT e NICKERSON, 2002).

Após a invasão da glândula, ocorre maior afluxo de células inflamatórias para o lúmen glandular, como eosinófilos e basófilos, que possuem grânulos contendo substâncias com potencial vasoativo. A degranulação destas células aumenta a permeabilidade vascular local, incrementando também o aporte de mais células da linhagem pró-inflamatória. O aumento da permeabilidade vascular local determina a mistura do sangue com o leite na glândula mamária. O sangue apresenta pH levemente alcalino (7,2 – 7,6), enquanto o leite possui pH levemente ácido (6,4 – 6,8). Este processo tende a tornar o leite mastítico

levemente alcalino, que é um dos parâmetros utilizados como indicador do processo infeccioso mamário em provas indiretas de diagnóstico. Os macrófagos e linfócitos locais também desempenham importante função na defesa da glândula mamária (SANTOS e FONSECA, 2007). Os macrófagos alveolares são as células especializadas na fagocitose e apresentação dos antígenos para o desenvolvimento da resposta imune celular e humoral pelos linfócitos e plasmócitos na glândula mamária. Os linfócitos identificam os antígenos apresentados principalmente pelos macrófagos e modulam a resposta imune em celular e/ou humoral, mediante a liberação de citocinas (RADOSTITS et al., 2007).

A ação dos anticorpos na glândula visa fundamentalmente opsonizar os micro-organismos, facilitando a imunidade celular. As classes IgM e IgG, e a imunoglobulina IgA de mucosas, são as mais importantes na imunidade humoral da glândula mamária de vacas (PHILPOT e NICKERSON, 2002).

Os efeitos da mastite sobre a produção de leite são altamente variáveis e dependem da gravidade da inflamação, dos agentes causais e das lesões produzidas, bem como da eficiência do tratamento, do nível de produção e do estágio da lactação. A mastite, quando no início da lactação, resulta em maior diminuição da produção de leite com mais efeitos a longo prazo do que na fase final (PHILPOT e NICKERSON, 2002; RADOSTITS et al., 2007; RIBEIRO, 2008).

2.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico da mastite é baseado no isolamento e identificação dos micro-organismos pelo cultivo microbiológico, considerado “método ouro” na identificação da etiologia das mastites, reconhecido como fundamental para qualquer programa de controle de mastite. Entretanto, cerca de 10 a 20% das culturas de leite com mastite clínica ou subclínica podem resultar negativas, fato que pode ser devido a casos como cura espontânea do agente, eliminação intermitente dos micro-organismos nas infecções crônicas ou baixo número de patógenos no leite. São ainda fatores de resultados microbiológicos negativos a destruição das bactérias no curso da reação inflamatória, uso de protocolos inadequados no isolamento, ou infecções por agentes que necessitam de

meios específicos como os gêneros *Mycoplasma*, *Leptospira*, *Campylobacter* e *Listeria* ou em casos de processos inflamatórios de origem alérgica, metabólica, tóxica e traumática (LANGONI et al., 2009).

A mastite pode se manifestar na forma clínica ou subclínica. Na forma clínica existem sinais evidentes de inflamação, como edema, aumento de temperatura, endurecimento e dor na glândula mamária. No leite se observa a presença de grumos, sangue, pus ou alterações na coloração do leite (BRADLEY et. al., 2002). A princípio, considera-se que cada quarto da glândula mamária é independente. Assim, o processo infeccioso pode estar instalado numa unidade mamária, permanecendo íntegras as demais mamas. O diagnóstico das afecções clínicas da glândula mamária envolve a aferição dos parâmetros fisiológicos dos animais, a inspeção e exame físico do úbere e tetos (palpação) e o exame do leite, pela prova da caneca telada (Tamis) [RADOSTITS et al., 2007].

No exame de animais com mastite clínica (principalmente com sinais sistêmicos) recomenda-se que sejam avaliados parâmetros vitais como temperatura corporal, frequência cardíaca e respiratória, movimentos ruminais, bem como sinais de desidratação, com vistas a subsidiar possível intervenção terapêutica parenteral. Animais com mastite clínica sistêmica apresentam sinais de desidratação, congestão de mucosas, dificuldade respiratória, taquicardia, inapetência ou anorexia, febre, diminuição dos movimentos ou atonia ruminal, decúbito e morte em poucas horas do início das manifestações clínicas (RIBEIRO, 2008).

O exame físico deve ser realizado, preferencialmente, com o úbere vazio, imediatamente depois que a vaca foi ordenhada. O úbere é examinado para se detectar quais são os quartos que estão endurecidos, edemaciados ou quentes, devido à mastite. A glândula mamária também é examinada para se verificar se há alguma mudança na forma ou se os quartos estão atrofiados com áreas de tecido fibroso, o que indica dano permanente nos tecidos secretores de leite, resultante da inflamação crônica (PHILPOT e NICKERSON, 2002; MARQUES, 2003; PEREIRA, 2005).

Para análise do leite é utilizado o “teste da caneca de fundo preto”, “teste da caneca telada” ou “Tamis”. Consiste na retirada dos 3 ou 4 primeiros jatos de leite no início da ordenha, em caneca ou superfície de fundo preto ou

escuro, com a finalidade de observar alterações no leite como a presença de grumos, coágulos, pus, estrias de sangue, dessora e/ou leite aquoso. Recomenda-se que o leite dos quartos com mastite clínica sejam encaminhados para cultivo, identificação de micro-organismos e tratamento imediato dos quartos acometidos (FONSECA e SANTOS, 2000; RIBEIRO, 2008).

Na forma subclínica, ao contrário da forma clínica, não ocorrem mudanças visíveis no aspecto do leite ou do úbere (PERSSON WALLER et al., 2003). Caracteriza-se por alterações na composição do leite, tais como aumento na CCS, aumento nos teores de proteínas séricas, diminuição de caseína, lactose, gordura e cálcio do leite (GIANOLA et al., 2004), resultando em menor rendimento na produção de seus derivados, além de reduzir o tempo de prateleira do produto (BRADLEY et al., 2002). O diagnóstico indireto da mastite subclínica é fundamentado no aumento da celularidade (CCS) do leite e, secundariamente, baseado em alterações de outros parâmetros físico-químicos (RADOSTITIS ET al., 2008).

O CMT, “California Mastitis Test”, estima a contagem de células somáticas do leite e pode ser realizado ao “pé da vaca”, individualmente para cada quarto, para detectar a mastite subclínica. Os escores do CMT (1 a 3+) estão diretamente relacionados com o aumento de células somáticas no leite. O fundamento da técnica consiste na ruptura das membranas das células somáticas presentes na amostra de leite, pelo contato com o detergente contido na solução (reagente), resultando na liberação do material presente no núcleo celular (DNA), tornando a mistura altamente viscosa (formação de gel). A coloração púrpura do reagente ficará mais acentuada na homogeneização com o leite mastítico devido ao pH alcalino. É importante enfatizar que os períodos que incluem as duas primeiras semanas pós-parto (fase de colostro) e os dias que antecedem o final da lactação (período de secagem), são considerados limitantes para a realização do CMT, devido ao processo de inflamação fisiológica e ao processo de involução da glândula mamária, respectivamente, resultando em reações falso-positivas (BRITO et. al., 1998; WATTIAUX, 2000; PHILPOT e NICKERSON, 2002; PEREIRA, 2005).

A contagem eletrônica das células somáticas tem sido utilizada nas últimas décadas no diagnóstico de mastite subclínica e parâmetro por

qualidade de leite. Este método é realizado com auxílio de contadores eletrônicos computadorizados, compostos por estruturas que formam o sistema óptico de leitura. O método mostra resultados mais precisos que o CMT (LANGONI, 1996).

O isolamento bacteriano e antibiograma são procedimentos imprescindíveis no controle/profilaxia da mastite bovina. Além de serem úteis para confirmar a mastite clínica ou subclínica, os resultados laboratoriais indicam o tipo de agente (ambiental ou contagioso), norteando as ações de controle, profilaxia, bem como o tratamento (FERNANDES, 2006).

A cultura bacteriana geralmente é realizada em vacas selecionadas a partir da caneca positiva (casos clínicos), CMT (3+), casos crônicos ou em rebanhos com altas contagens de células somáticas (FONSECA e SANTOS, 2000; WATTIAUX, 2000).

O perfil de sensibilidade “in vitro” dos micro-organismos aos antimicrobianos (antibiograma) isolados do leite, permite ao técnico instituir o tratamento escolhendo o antimicrobiano mais adequado para a lactação ou período seco, apesar de certos estudos observarem certa discrepância entre a sensibilidade “in vitro” dos micro-organismos e as taxas de cura microbiológica “in vivo” em casos de mastite bovina (FERNANDES, 2006; RIBEIRO, 2008).

Recomenda-se coletar uma amostra asséptica de leite de todos os casos de mastite clínica e armazená-la sob refrigeração ou congelá-la, visando à cultura microbiológica (PHILPOT e NICKERSON, 2002).

2.1.4 Controle e prevenção

A utilização em conjunto de vários procedimentos constitui a estratégia mais eficiente no controle e profilaxia da mastite. A prevenção deve ser realizada dentro e fora da sala de ordenha. O maior objetivo da sala de ordenha é retirar a produção e manter os tetos limpos e secos, antes e após a ordenha. Além disso, a separação dos animais em lotes para a ordenha deve ser considerada (FONSECA e SANTOS, 2000).

Segundo o Instituto Fernando Costa (2006), a rotina diária de atividades e o correto manejo de ordenha são as principais medidas preventivas de

controle de mastite. A execução de uma sequência lógica de tarefas durante a ordenha resulta em benefícios na profilaxia e controle da doença.

Nos programas de prevenção e controle da mastite, recomenda-se o uso adequado do método de manejo na ordenha; instalação correta, manutenção e funcionamento periodicamente dos equipamentos de ordenha; higienização de equipamentos e do úbere do animal; manejo do animal seco; boa nutrição para manter a habilidade da vaca de debelar as infecções e alimentar as vacas imediatamente após a ordenha, mantendo os animais em pé por pelo menos uma hora (RADOSTITS et al., 2007). Indica-se, também, ordenhar as vacas infectadas por último, terapia apropriada da mastite durante a lactação; descarte de vacas com infecção crônica; manutenção de ambiente apropriado para bovinocultura leiteira; manutenção de sistema de registro dos animais; monitoração do estado de saúde do úbere e revisões periódicas do programa de manejo e saúde do úbere (RUPP et al., 2000).

Outro importante fator que influi no nível de infecção do rebanho é a duração das infecções nas vacas. Quanto mais rápido forem eliminados animais crônicos, maior sucesso terá o programa de controle (BRITO et al., 2000). A redução da duração das infecções pode ser obtida, também, pelo uso correto de antimicrobianos e outros agentes terapêuticos no tratamento da mastite clínica e no tratamento à secagem. Além dos antimicrobianos, é indicado uso de desinfetantes para imersão dos tetos no início e no final da ordenha (pré-dipping e pós-dipping) [MÜLLER, 2002; SILVA, 2003; FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004].

2.1.5 Tratamento

Após o estabelecimento da infecção no úbere, são conhecidas quatro formas para eliminação da doença: recuperação espontânea, descarte de vacas cronicamente afetadas, tratamento durante a lactação e terapia da vaca seca (PHILPOT e NICKERSON, 2002). A antibioticoterapia é o procedimento mais utilizado no tratamento da mastite bovina (PINTO et al., 2001).

Para a instituição do tratamento, diferentes fatores devem ser levados em consideração, incluindo o agente causal, a escolha do antimicrobiano, a via de aplicação (intramamária e/ou parenteral), o perfil de sensibilidade “in vitro”

dos micro-organismos, a opção pela terapia na lactação ou período seco, as diferenças entre o tratamento dos casos clínicos e subclínicos, e a persistência de resíduos de antimicrobianos (RIBEIRO, 2008).

O antimicrobiano ideal deveria apresentar várias características como: amplo espectro de ação, atingir altas concentrações terapêuticas no tecido glandular ou similares à concentração inibitória mínima (MIC), estabilidade, boa efetividade na presença de material purulento, atóxico para o tecido glandular e neonatos, ausência ou baixo nível de resíduo no leite, pH levemente alcalino (base fraca), boa relação custo-benefício e fácil aquisição no mercado. Com efeito, poucos antimicrobianos disponíveis comercialmente reúnem a maioria destas características consideradas desejáveis para o tratamento de animais com mastite (COSTA et al., 1999; PHILPOT e NICKERSON, 2002; RIBEIRO, 2008).

2.1.5.1 A escolha do antimicrobiano

Na prática, a escolha do antimicrobiano recai, geralmente, na experiência dos profissionais ou produtores, no custo, ou mesmo no apelo comercial dos fármacos. Apesar da divergência entre pesquisadores, os testes de sensibilidade microbiana “in vitro” possibilitam eleger antimicrobianos com melhor ação frente à microbiota mamária dos animais de determinada propriedade (vigilância contínua), facilitando a escolha de fármacos para o uso no tratamento na lactação e/ou no período seco. Ademais, permite monitorar a ocorrência de multirresistência aos antimicrobianos em isolados de mastite nos plantéis. A cultura e a sensibilidade antimicrobiana de um patógeno não são o único fundamento para a escolha do antimicrobiano. A resposta ao tratamento nos casos clínicos não necessariamente se relaciona com os resultados dos testes de sensibilidade em “in vitro”, posto que vários fatores intrínsecos aos fármacos, agentes causais e ao processo inflamatório na glândula mamária influenciam no processo de cura (RADOSTITS et al., 2007; RIBEIRO, 2008).

No Brasil, os principais grupos de antimicrobianos disponíveis para o tratamento intramamário na lactação são representados pelas penicilinas e derivados, cefalosporinas, aminoglicosídeos e fluorquinolonas (RIBEIRO, 2008).

2.1.6 Principais grupos de fármacos

2.1.6.1 Penicilinas e derivados

O grupo das penicilinas apresenta em comum, na sua estrutura, o anel β -lactâmico. São classificadas em penicilinas naturais e semi-sintéticas. A penicilina G é a penicilina natural mais utilizada em infecções mamárias em animais, considerada de eleição para as mastites por *Clostridium perfringens*, utilizada por via intramamária e/ou parenteral (SANTOS e FONSECA, 2007).

A penicilina G e seus ésteres são bactericidas. São ativas contra bactérias Gram-positivas aeróbicas e anaeróbicas, *Pasteurella multocida*, espiroquetas e actinomicetos. Os bacilos Gram-negativos aeróbicos ou anaeróbicos que acometem animais são comumente resistentes às penicilinas naturais, com algumas exceções. Entre as penicilinas semi-sintéticas, a cloxacilina é a mais frequentemente encontrada em anti-mastíticos para a terapêutica em animais (COSTA, 1999; RIBEIRO, 2008).

As penicilinas naturais são inativadas por enzimas denominadas β -lactamases. Praticamente a totalidade das linhagens de *S. aureus* e cerca de 80% das outras linhagens de *Staphylococcus* spp. são produtoras de β -lactamases. A maioria dos bacilos Gram-negativos é naturalmente resistente à penicilina-G, com exceção dos gêneros *Pasteurella* e *Mannheimia* (PHILPOT e NICKERSON, 2002).

As penicilinas estão disponíveis no Brasil para uso na terapêutica intramamária na lactação e no período seco. A ampicilina, penicilina de amplo espectro de ação, é amplamente utilizada em terapêutica intramamária e/ou parenteral (RIBEIRO, 2008).

2.1.6.2 Cefalosporinas

São antimicrobianos quimicamente similares às penicilinas (β -lactâmico), com diferentes gerações de fármacos e análogos. Apresentam grande espectro de ação para bactérias Gram-positivas (incluindo linhagens de *S. aureus* produtoras de β -lactamase) e, secundariamente, para Gram-negativas. Representam, atualmente, o principal grupo de antimicrobianos disponíveis

comercialmente para a terapêutica intramamária da mastite na lactação e/ou na secagem de animais de produção, com alta efetividade e baixos índices de resistência bacteriana. Na mastite são frequentemente utilizados no tratamento a cefoperazona sódica, cefacetrila sódica, cefalexina, cefalônio anidro, cefapirina, cefquimona e cefuroxima, em virtude da boa efetividade em linhagens de estafilococos produtores de β -lactamase (COSTA, 1999; PHILPOT e NICKERSON, 2002; RIBEIRO, 2008).

As cefalosporinas de 1^a geração são bastante ativas contra *Staphylococcus*, tendo atividade também contra os gêneros *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Actinobacillus* e *Pasteurella*. A maioria dos agentes anaeróbicos Gram-positivos é sensível a essa geração. As cefalosporinas de 2^a geração são menos ativas contra Gram-positivos, em especial contra *Staphylococcus intermedius*, mas possuem atividade contra Gram-negativos superior às cefalosporinas de 1^a geração. Atuam contra *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Enterobacter* spp. e *Klebsiella* spp., sendo úteis também para o tratamento de infecções por anaeróbios. As cefalosporinas de 3^a geração e outras mais modernas possuem espectro de ação notadamente maior ante aos Gram-negativos e possuem atividade limitada contra Gram-positivos, com exceção do ceftiofur que possui boa ação contra Gram-positivos. Nem todas são ativas contra *Fusobacterium necrophorum*, *Pseudomonas* spp. e outros Gram-negativos anaeróbios, comumente produtores de β -lactamases (COSTA, 1999; PHILPOT e NICKERSON, 2002; SANTOS e FONSECA, 2007).

Ressalta-se que o aumento de espectro de ação das cefalosporinas das últimas gerações contra bactérias Gram-negativas reduz a efetividade para as Gram-positivas (RIBEIRO, 2008).

2.1.6.3 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são antibióticos bactericidas extraídos de actinomicetos, como o gênero *Streptomyces*. Os primeiros aminoglicosídeos utilizados para combater infecções foram estreptomicina e diidroestreptomicina de espectro limitado. Posteriormente, surgiram formulações mais eficazes,

como a canamicina, gentamicina, neomicina, amicacina, tobramicina e netilmicina (RIBEIRO, 2008).

A gentamicina é o principal representante deste grupo para o uso na terapêutica de animais com mastite, utilizada por vias intramamárias e parenteral. A neomicina é outro aminoglicosídeo que compõe várias formulações para a terapêutica intramamária na lactação e no período seco. Nos anti-mastíticos comerciais, a neomicina geralmente está associada aos β -lactâmicos e derivados. A estreptomicina também está disponível para a terapêutica intramamária na lactação, embora com espectro de ação reduzido diante dos micro-organismos usuais de mastite em animais (COSTA, 1999 e SANTOS e FONSECA, 2007).

Os aminoglicosídeos são ativos principalmente contra Gram-negativos, mas como apresentam baixos teores no meio intracelular, falham em combater bactérias intracelulares. Com exceção da estreptomicina, são ativos diante de alguns Gram-positivos, como *Staphylococcus* spp. Certas espécies de micoplasmas e espiroquetas são sensíveis aos aminoglicosídeos. Muitas espécies de enterobactérias como *Escherichia coli*, e os gêneros *Klebsiella*, *Salmonella*, *Pasteurella* e certas linhagens de *Pseudomonas* spp. são sensíveis aos aminoglicosídeos como a gentamicina e a amicacina (COSTA, 1999; PHILPOT e NICKERSON, 2002; SANTOS e FONSECA, 2007).

As bactérias anaeróbicas estritas e vários Gram-positivos, exceto *Staphylococcus*, são resistentes aos aminoglicosídeos (RIBEIRO, 2008).

2.1.6.4 Fluorquinolonas

As fluorquinolonas de 1^a geração foram preconizadas primariamente para a terapêutica de bactérias Gram-negativas, especialmente enterobactérias. Entretanto, os fármacos das gerações posteriores também possuem espectro de ação para micro-organismos Gram-positivos, além de Gram-negativos multirresistentes aos antimicrobianos (RIBEIRO, 2008). As fluorquinolonas de 2^a geração (norfloxacino, ciprofloxacino, ofloxacino, perfloxacino, enrofloxacino, danofloxacino, orbifloxacino, difloxacino e marbofloxacino) são as mais utilizadas atualmente na Medicina Veterinária (LANGONI et al., 2001), com amplo espectro de ação (Gram-positivas, Gram-

negativas, *Mycoplasma* spp. e *Chlamydophila* spp., além de baixa toxicidade e altas concentrações no sangue e tecidos (RADOSTITS et al., 2007).

Na terapêutica da mastite bovina, o enrofloxacino possui boa efetividade terapêutica por via intramamária ou parenteral. Recentemente foi introduzido o ciprofloxacino como alternativa para o tratamento intramamário da mastite em vacas (RIBEIRO, 2008). O ciprofloxacino se caracteriza como antimicrobiano derivado do ácido quinolincarboxílico. O mecanismo de ação destas fluorquinolonas é caracterizado pela inibição da ação da enzima DNA-girase, que impede a replicação do DNA bacteriano, levando a lise e ruptura das membranas celulares (AUCOIN, 1994). O ciprofloxacino e o norfloxacino são fluorquinolonas alternativas para a terapêutica parenteral para tratamento de casos de mastite em animais de produção, visto que apresentam boa difusão no parênquima mamário (RIBEIRO, 2008).

2.1.7 Tratamento da mastite clínica e subclínica

Para otimizar o estado sanitário da glândula mamária, é essencial manter registros dos casos clínicos e subclínicos de mastites (LANGONI e DOMINGUES, 1998), assim como utilizar racionalmente os antimicrobianos, com o intuito de evitar o aumento da pressão seletiva para bactérias multirresistentes (RIBEIRO, 2008).

A estratégia de tratamento depende da forma de apresentação da mastite (hiper-aguda, aguda, subaguda ou subclínica) e do estado sanitário do rebanho, incluindo o histórico da mastite (RADOSTITS et al., 2007).

A administração intramamária de antimicrobianos é o método mais prático de tratamento da mastite bovina (COSTA et al., 1999; NADER FILHO et al., 2002). O tratamento durante a lactação tem baixos índices de cura, se comparado ao tratamento no período seco, principalmente para casos de mastite subclínica. Ademais, o tratamento na lactação pressupõe o descarte do leite nas próximas 72 horas após o término da terapia, em virtude da presença, neste período, de resíduos de antimicrobianos, que são potencialmente prejudiciais aos humanos e a industrialização do leite (LANGONI, 1997). No entanto, os prejuízos com as mastites clínicas, justificam a intervenção

terapêutica no decorrer da lactação (SUMANO e OCAMPO, 1992; COSTA et al., 2003).

O tratamento precoce desta afecção constitui importante medida profilática, pois elimina uma fonte de infecção em potencial para as demais vacas lactantes. Pode-se utilizar vários fármacos para o tratamento. Entretanto, muitas vezes pode ocorrer o insucesso terapêutico. As razões mais comuns para justificar as falhas da antibioticoterapia na mastite são: distribuição inadequada do fármaco pelos fluidos e tecidos do organismo, baixo grau de ionização no leite com pH normal ou alterado, efeito negativo de sua ação nos mecanismos de defesa do organismo, localização do foco infeccioso e baixa sensibilidade do micro-organismo frente ao antimicrobiano (MOORE e HEIDER, 1984; SANDHOLM e LOUHI, 1991).

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

Antes de iniciar o tratamento, se recomenda colher assepticamente amostra de leite do quarto mamário afetado e manter congelada em freezer convencional. Este procedimento resguarda o profissional para a necessidade de encaminhamento do leite do animal para a realização do diagnóstico microbiológico e antibiograma, na eventualidade do tratamento em curso não surtir o efeito desejável (RIBEIRO, 2008).

Por conveniência e eficiência, a infusão intramamária de antimicrobiano é a forma consagrada de tratamento da mastite bovina durante a lactação e para a realização da terapia da vaca seca. Os produtos comercializados na forma de anti-mastíticos descartáveis, que contêm uma dose de antimicrobiano em pomada hidrossolúvel, são ideais para o tratamento individual das vacas. Os frascos com antimicrobianos em infusão aquosa, em quantidade suficiente para várias aplicações, apresentam a desvantagem do aumento do risco de

contaminação. Ambas as apresentações têm o mesmo grau de difusão no interior do tecido glandular (RADOSTITS et al., 2007). O amplo espectro de ação, o uso de veículos carreadores e a associação sinérgica entre fármacos, tendem a contornar as limitações de difusão mamária de certos anti-mastíticos. Em geral, a maior efetividade no tratamento intramamário da mastite bacteriana em animais é obtida entre 3 a 5 aplicações, em intervalos de 8, 12 a 24 horas, dependendo das características e meia vida de cada antimicrobiano. Em situações específicas, como em infecções crônicas por *S. aureus*, é recomendada a “terapia estendida”, que consiste entre 6 a 10 aplicações intramamárias do antimicrobiano, com incremento nas taxas de cura (PHILPOT e NICKERSON, 2002; SANTOS e FONSECA, 2007; RIBEIRO, 2008).

Os procedimentos utilizados para realizar os tratamentos intramamários são muito importantes para se alcançar os resultados desejados. Na maioria dos casos, o tratamento é realizado logo após a retirada dos conjuntos de ordenha. A extremidade do teto deve ser desinfetada antes da infusão para minimizar o número de bactérias presentes no orifício do teto, as quais podem ser conduzidas para dentro do canal com a cânula intramamária (PHILPOT e NICKERSON, 2002). O uso de cânula curta é preferível e diminui a possibilidade de introdução de bactérias (RADOSTITS et al., 2007).

A associação das vias intramamária e parenteral é indicada principalmente nos casos clínicos agudos ou hiper-agudos de mastite. Recomenda-se a utilização do mesmo princípio ativo pelas duas vias ou o uso de fármacos com reconhecido efeito sinérgico, tais como: aminoglicosídeos + penicilinas; sulfonamidas + trimetropin e aminoglicosídeos + cefalosporinas. Poucos antimicrobianos atingem concentrações terapêuticas efetivas na glândula mamária quando administrados exclusivamente por via parenteral. Em geral, devido à menor eficácia do tratamento parenteral comparado ao intramamário, não se recomenda o tratamento de animais de produção com mastite exclusivamente por via parenteral (RIBEIRO, 2008).

O período mais eficaz para o tratamento da mastite subclínica é na secagem. A terapia da vaca seca possui vantagens em relação à terapia na lactação. A taxa de cura da terapia da vaca seca é mais elevada do que durante a lactação. Neste caso, concentrações mais altas de antimicrobianos de longa duração podem ser usadas, além do menor tempo de retenção do

antimicrobiano no úbere. A incidência de novas infecções durante o período seco é reduzida e as lesões teciduais consequentes à mastite são resolvidas antes do parto. Ocorre, também, redução do número de mastites clínicas no momento do parto, o leite comercializado não é contaminado por resíduos de antimicrobianos e todos os quartos infectados são tratados (PHILPOT e NICKERSON, 2002, RADOSTITS et al., 2007).

A eficácia do tratamento de vaca seca aumenta quando são usados produtos de liberação lenta, ou seja, mantém concentração inibitória mínima no quarto aproximadamente por quatro até seis semanas. O momento preferível para o tratamento é após a última ordenha da lactação (RADOSTITS et al., 2007; RIBEIRO, 2008).

2.1.8 Hipóteses de estudo

São escassos os estudos no Brasil avaliando a comparação entre o tratamento “in vitro” e “in vivo” no mesmo animal, frente ao mesmo micro-organismo, bem como a terapia convencional e a estendida. Acredita-se que exista um déficit de 5 a 30% entre sensibilidade “in vitro” e a sensibilidade “in vivo” (cura bacteriológica).

Supõe-se, também, que a terapia estendida seja indicada, provavelmente, aos casos crônicos, em animais de alto valor, ou para bactérias multirresistentes, devido a menor praticidade e aumento de custo em relação ao tratamento convencional.

O grande número de antimicrobianos disponíveis no Brasil para o tratamento intramamário de vacas pressupõe a necessidade de estudos contínuos da efetividade destes fármacos, em condições de infecção natural a campo, em virtude da redução da efetividade de certos antimicrobianos com o uso prolongado, bem como pelo surgimento de linhagens multirresistentes.

Neste contexto, foi investigada a eficácia “in vitro” e “in vivo” da cefoperazona sódica, gentamicina e ciprofloxacino no tratamento intramamário, de forma convencional e estendida, em casos de mastite em vacas naturalmente infectadas.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Comparar a eficácia “in vitro” e “in vivo” da cefoperazona sódica, ciprofloxacino e gentamicina no tratamento intramamário de casos de mastite clínica bovina

3.2 Específicos

- ✓ Avaliar dentre os antimicrobianos utilizados qual o mais eficiente na cura clínica após o tratamento intramamário;
- ✓ Determinar o antimicrobiano mais eficiente quanto à cura microbiológica após o tratamento intramamário;
- ✓ Comparar a eficácia do tratamento intramamário convencional (três aplicações) e o estendido (seis aplicações) com os antimicrobianos utilizados, frente a micro-organismos convencionais na mastite bovina;
- ✓ Investigar dentre os antimicrobianos o déficit entre a sensibilidade “in vitro” e a eficiência da cura “in vivo” (cura bacteriana);

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

Foi comparada a cura clínica e bacteriológica, no tratamento intramamário convencional e estendido, em vacas com mastite clínica, naturalmente infectadas, utilizando a cefoperazona sódica, gentamicina e ciprofloxacino.

4.2 Animais

Foram utilizadas 30 vacas holandesas e mestiças que apresentaram mastite clínica, não sistêmica e que não receberam tratamento prévio no decorrer da lactação, procedentes de propriedades leiteiras da região de Botucatu, SP.

4.3 Diagnóstico da mastite clínica

O diagnóstico de mastite clínica foi fundamentado em alterações macroscópicas do leite na prova de Tamis (caneca telada de fundo escuro) e/ou na presença de sinais de inflamação na glândula mamária (edema, dor, calor, rubor, perda da função). Foi realizado exame físico completo do úbere dos animais (RADOSTITS et al., 2007). As vacas que apresentaram sinais gerais de mastite (taquicardia, taquipnéia, febre, atonia ruminal, decúbito) não foram utilizadas no estudo.

Cada quarto mamário com mastite clínica foi considerado uma unidade animal. Desta forma, o estudo utilizou de 10 animais diferentes para cada grupo de antimicrobiano, não se utilizando mais de um quarto mamário do mesmo animal a título da composição dos grupos de tratamento, ou para fins de cálculo dos valores de cura bacteriológica e cura clínica.

4.4 Grupos de tratamento

Foram constituídos três grupos de tratamento para cada antimicrobiano comercial, como segue: G1 = cefoperazona sódica (10 animais); G2 = gentamicina (10 animais) e G3 = ciprofloxacino (10 animais).

4.5 Protocolos de tratamento intramamário (convencional e estendido)

O tratamento intramamário foi realizado respeitando condições adequadas de anti-sepsia (RIBEIRO, 2008). Foi iniciado imediatamente após o

diagnóstico da mastite clínica, antes do envio do material para o diagnóstico microbiológico. Todos os animais tratados que permaneceram na composição dos três grupos de tratamento apresentaram, obrigatoriamente, sensibilidade “in vitro” do isolado ao antimicrobiano do grupo. Com efeito, todos os animais componentes de cada grupo foram tratados com antimicrobianos que apresentaram 100% de efetividade “in vitro” para o isolado. Os animais que, mesmo depois de iniciado o tratamento, acusaram isolados com resultados “in vitro” parcialmente sensíveis ou resistentes no teste de sensibilidade microbiana foram excluídos.

Os animais receberam tratamento intramamário, a cada 12 horas, com seis aplicações por animal, constituindo os seguintes momentos (M): M1 (dia zero - diagnóstico da mastite e início do tratamento), M2 (12 horas após M1), M3 (24 horas após M1), M4 (36 horas após M1), M5 (48 horas após M1) e M6 (60 horas após M1). Foi considerado, no mesmo animal, o **tratamento convencional** encerrado na terceira aplicação do antimicrobiano (M3) e o **tratamento estendido** ao final da sexta aplicação (M6).

4.6 Isolamento e caracterização dos micro-organismos

As amostras de leite dos animais com mastite clínica foram colhidas assepticamente de todos os animais nos três grupos no M1, M4 e 12 horas após M6 (M7). As amostras foram transportadas sob temperatura de refrigeração (4 – 8°C) para o Laboratório de Diagnóstico Microbiológico de Enfermidades Infecciosas dos Animais da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP. Em seguida, foram semeadas nos meios de ágar suplementado com sangue bovino desfibrinado (5%) e ágar MacConkey, mantidos a 37°C, em condições de aerobiose. As culturas foram avaliadas com 24, 48 e 72 horas de incubação e os micro-organismos, identificados segundo as características morfo-tintoriais, bioquímicas e de cultivo [QUINN et al., 2005].

4.7 Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”

Todos os micro-organismos isolados dos animais com mastite nos três grupos de estudo foram submetidos ao teste de sensibilidade microbiana “in

vitro” (CLSI 2005, 2006), frente ao antimicrobiano de tratamento, respectivo de cada grupo: G1 = cefoperazona sódica (75µg), G2 = gentamicina (10µg) e G3 = ciprofloxacino (5µg).

4.8 Acompanhamento dos animais

Durante o tratamento ao longo dos dias de estudo, os animais foram monitorados quanto aos parâmetros fisiológicos, exame clínico da glândula mamária e teste de Tamis (RADOSTITS et al., 2007).

4.9 Avaliação da cura clínica e cura bacteriológica

A cura clínica foi considerada nos animais que, ao final do tratamento intramamário, não apresentaram quaisquer alterações clínicas nos parâmetros fisiológicos gerais (temperatura, frequências cardíaca e respiratória, movimentos ruminais), na glândula mamária (sinais de inflamação), tampouco nas características macroscópicas do leite (teste de Tamis). A cura bacteriológica foi considerada nos quartos mamários que não se obteve o reisolamento do mesmo micro-organismo identificado no M1.

4.10 Grupo controle negativo

Não foi formado grupo controle negativo, devido aos riscos das mastites clínicas, sem instituição de tratamento, visto que foram utilizados animais de terceiros.

4.11 Critérios de exclusão de animais

Foram excluídos animais que, no início ou ao longo do tratamento intramamário, apresentaram qualquer uma das seguintes condições: desenvolveram sinais sistêmicos de mastite (febre, taquicardia, taquipnéia, atonia ruminal, decúbito), não apresentaram sensibilidade “in vitro” ao fármaco do grupo antes do início do tratamento (parcialmente sensíveis ou resistentes), contraíram outras infecções que houvesse necessidade do uso de antimicrobianos por via parenteral, impossibilidade de qualquer tratamento e/ou

colheita de leite segundo protocolo de estudo (item 4.5), isolamento de micro-organismos não convencionais e/ou usualmente não responsivos a terapia antimicrobiana (fungos, leveduras, algas).

4.12 Tratamento estatístico dos resultados

Foram comparados os diferentes momentos (M1, M2, M3, M4, M5, M6), segundo a efetividade de cura bacteriológica do produto, utilizando o teste bilateral ou de Qui-quadrado (Teste de McNemar), considerando significância estatística para valores de $P < 0,01$. Para a definição do universo amostral (n) para efeito de comparação entre os grupos de antimicrobianos foram necessários, no mínimo, dez animais com mastite (segundo os itens 4.2 a 4.4), adotando efetividade “in vitro” de no mínimo 80% de cada fármaco e erro estatístico de 1% (TRIOLA, 2005). Para tanto, a efetividade “in vitro” de $\geq 80\%$ de antimicrobiano testado foi embasada em levantamento retrospectivo destes fármacos em dados do Serviço de Diagnóstico de Mastite em Animais da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP (Tabelas 1, 2 e 3).

TABELA 1. Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, pelo método de difusão com discos, em diferentes linhagens bacterianas isoladas de vacas com mastite, frente à cefoperazona sódica. Botucatu, SP, 2008 a 2012*.

Sensibilidade	Sensível	Parcialmente sensível	Resistente
Micro-organismo	nº linhagens/nº total (%)	nº linhagens/nº total (%)	nº linhagens/nº total (%)
<i>Corynebacterium</i> sp.	29/29 (100)	0	0
<i>S. aureus</i>	22/32 (68,7)	7/32 (21,8)	3/32 (9,3)
<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	18/18 (100)	0	0
<i>Streptococcus</i> spp.	13/16 (81,3)	3/16 (18,7)	0
<i>Staphylococcus</i> spp.	7/10 (70)	3/10 (30)	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	6/6 (100)	0	0
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	6/6 (100)	0	0
<i>Staphylococcus</i> beta hemolítico	4/10 (28,5)	5/10 (64,3)	1/10 (7,2)
<i>T. pyogenes</i>	2/2 (100)	0	0
<i>Edwardsiella tarda</i>	1/1 (100)	0	0
<i>Escherichia coli</i>	1/1 (100)	0	0
<i>Micrococcus</i> sp.	1/1 (100)	0	0
<i>Staphylococcus intermedius</i>	1/1 (100)	0	0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1/1 (100)	0	0
<i>Streptococcus</i> beta hemolítico	1/1 (100)	0	0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1/1 (100)	0	0
Total	114/136 (83,8)	18/136 (13,3)	4/136 (2,9)

T. pyogenes = *Trueperella* (*Arcanobacterium*) *pyogenes*

S. aureus = *Staphylococcus aureus*

* Fonte = Serviço de Diagnóstico de Mastite em Animais – Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais – FMVZ-UNESP/Botucatu, SP

ATCC = American Type Culture Collection

TABELA 2. Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, pelo método de difusão com discos, em diferentes linhagens bacterianas isoladas de vacas com mastite, frente à gentamicina. Botucatu, SP, 2008 a 2012*.

Sensibilidade	Sensível	Parcialmente sensível	Resistente
Micro-organismo	n ^o linhagens/n ^o total (%)	n ^o linhagens/n ^o total (%)	n ^o linhagens/n ^o total (%)
<i>Staphylococcus beta</i> hemolítico	57/63 (90,4)	3/63 (4,8)	3/63 (4,8)
<i>Staphylococcus aureus</i>	37/40 (92,5)	2/40 (5,0)	1/40 (2,5)
<i>Corynebacterium</i> sp.	29/29 (100)	0	0
<i>Staphylococcus hyicus</i>	11/14 (78,6)	1/14 (7,1)	2/14 (14,3)
<i>Staphylococcus</i> spp.	11/14 (78,6)	1/14 (7,1)	2/14 (14,3)
<i>Streptococcus</i> spp.	7/13 (53,8)	0	6/13 (46,2)
<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	9/12 (75,0)	1/12 (8,3)	2/12 (16,7)
<i>Escherichia coli</i>	6/6 (100)	0	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	4/4 (100)	0	0
<i>T. pyogenes</i>	3/6 (50)	1/6 (16,6)	2/6 (33,4)
<i>Edwardsiella tarda</i>	2/2 (100)	0	0
<i>Nocardia</i> sp.	2/2 (100)	0	0
<i>Pasteurella multocida</i>	2/2 (100)	0	0
<i>Staphylococcus intermedius</i>	1/1 (100)	0	0
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1/3 (33,3)	0	2/3 (66,7)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	1/1 (100)	0	0
Total	183/212 (86,3)	9/212 (4,3)	20/212 (9,4)

T. pyogenes = *Trueperella* (*Arcanobacterium*) *pyogenes*

* Fonte = Serviço de Diagnóstico de Mastite em Animais – Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais – FMVZ-UNESP/Botucatu, SP

ATCC = American Type Culture Collection

TABELA 3. Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, pelo método de difusão com discos, em diferentes linhagens bacterianas isoladas de vacas com mastite, frente ao ciprofloxacino. Botucatu, SP, 2008 a 2012*.

Sensibilidade	Sensível	Parcialmente sensível	Resistente
Micro-organismo	n ^o linhagens/n ^o total (%)	n ^o linhagens/n ^o total (%)	n ^o linhagens/n ^o total (%)
<i>Streptococcus</i> spp.	36/43 (83,7)	4/43 (9,3)	3/43 (7,0)
<i>Staphylococcus</i> spp.	36/37 (97,3)	0	1/37 (2,7)
<i>Corynebacterium</i> sp.	29/29 (100)	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	12/24 (50)	9/24 (37,5)	3/24 (12,5)
<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	12/18 (66,7)	6/18 (33,3)	0
<i>Escherichia coli</i>	4/5 (80)	0	1/5 (20)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	4/4 (100)	0	0
<i>T. pyogenes</i>	1/1 (100)	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	1/3 (33,3)	1/3 (33,3)	1/3 (33,3)
<i>Micrococcus</i> spp.	1/1 (100)	0	0
<i>Nocardia</i> sp.	1/1 (100)	0	0
<i>Staphylococcus hyicus</i>	1/5 (20,0)	2/5 (40,0)	2/5 (40,0)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1/1 (100)	0	0
<i>Streptococcus</i> beta hemolítico	1/1 (100)	0	0
<i>E. coli</i> ATCC 15221	1/1 (100)	0	0
Total	141/174 (81,1)	22/174 (12,6)	11/174 (6,3)

T. pyogenes = *Trueperella* (*Arcanobacterium*) *pyogenes*

* Fonte = Serviço de Diagnóstico de Mastite em Animais – Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais – FMVZ-UNESP/Botucatu, SP

ATCC = American Type Culture Collection

5. RESULTADOS

Para a formação dos três grupos de tratamento, constituídos de dez animais por grupo, foram utilizados 54 animais, dos quais 22 para o grupo de tratamento com cefoperazona sódica, 19 para o grupo de gentamicina e 13 para o ciprofloxacino. Desta forma, ao longo da constituição dos grupos, foram excluídos 24 animais, principalmente cujos isolados foram parcialmente sensíveis ou resistentes no perfil de sensibilidade microbiana “in vitro” antes do tratamento (M1), que apresentaram isolamento de micro-organismos não convencionais de mastite (fungos, algas e certos actinomicetos) ou, com menor frequência, que não foi possível a colheita de material em algum dos momentos de acompanhamento do animal ou que desenvolveram sinais de mastite clínica sistêmica.

A Tabela 4 apresenta os micro-organismos causadores de mastites em cada animal, dentro de cada grupo de antimicrobiano constituído para o tratamento intramamário, em vacas com mastite clínica, naturalmente infectadas.

TABELA 4. Micro-organismos isolados, em cultura pura ou em associação, em 30 vacas com mastite clínica, naturalmente infectadas, segundo três grupos de tratamento antimicrobiano por via intramamária. Botucatu, SP, 2010 a 2011.

GRUPO ANIMAL	CEFOPERAZONA SÓDICA (G1)	GENTAMICINA (G2)	CIPROFLOXACINO (G3)
1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Corynebacterium bovis</i>
2	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
3	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico
4	<i>Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes</i>		
5	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico
6	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus aureus</i>
7	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico
8	<i>Staphylococcus intermedius</i>	<i>Staphylococcus hyicus</i>	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico <i>Staphylococcus aureus</i>
9	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
10	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus aureus</i>

Foi observado predomínio dos gêneros *Streptococcus* e *Staphylococcus* nos três grupos de estudo, seguido em menor frequência de enterobactérias (*Escherichia coli* e *Edwardsiella tarda*) e actinomicetos [*Corynebacterium bovis* e *Trueperella (Arcanobacterium) piogenes*].

Os Quadros 1, 2 e 3 sumarizam os resultados da cura clínica e bacteriológica nos três grupos de tratamento intramamário (convencional e estendido), utilizando a cefoperazona sódica, gentamicina e ciprofloxacino, em vacas com mastite clínica naturalmente infectadas.

QUADRO 1. Cura clínica e bacteriológica em dez vacas com mastite por diferentes micro-organismos, utilizando a cefoperazona sódica no tratamento convencional (3 aplicações do anti-mastítico) e no estendido (6 aplicações do anti-mastítico). Botucatu, SP, 2010 a 2011.

Animal	Isolamento - M 1	Tratamento convencional (cura clínica)	Isolamento - M4 (cura bacteriológica)	Tratamento estendido (cura clínica)	Isolamento – M7 (cura bacteriológica)
1	<i>S. agalactiae</i>	sucesso	negativo	sucesso	negativo
2	<i>S. agalactiae</i>	sucesso	negativo	sucesso	negativo
3	<i>Staphylococcus</i> spp.	sucesso	negativo	sucesso	negativo
4	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico <i>T. pyogenes</i>	insucesso	negativo	sucesso	negativo
5	<i>Edwardsiella tarda</i>	sucesso	negativo	sucesso	negativo
6	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	insucesso	negativo	sucesso	negativo
7	<i>Streptococcus</i> spp.	insucesso	negativo	sucesso	negativo
8	<i>S. intermedius</i>	sucesso	negativo	sucesso	negativo
9	<i>S. aureus</i>	insucesso	negativo	insucesso	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>Streptococcus</i> spp.
10	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	insucesso	negativo	sucesso	negativo

S. agalactiae = *Streptococcus agalactiae*

T. pyogenes = *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes*

S. intermedius = *Staphylococcus intermedius*

S. aureus = *Staphylococcus aureus*

E. coli = *Escherichia coli*

QUADRO 2. Cura clínica e bacteriológica em dez vacas com mastite por diferentes micro-organismos, utilizando a gentamicina no tratamento convencional (3 aplicações do anti-mastítico) e no estendido (6 aplicações do anti-mastítico). Botucatu, SP, 2010 a 2011.

Animal	Isolamento - M 1	Tratamento convencional (cura clínica)	Isolamento - M4 (cura bacteriológica)	Tratamento estendido (cura clínica)	Isolamento – M7 (cura bacteriológica)
1	<i>Streptococcus</i> spp.	sucesso	negativo	sucesso	negativo
2	<i>Escherichia coli</i>	sucesso	negativo	sucesso	negativo
3	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	sucesso	negativo	sucesso	negativo
4	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	insucesso	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	sucesso	negativo
5	<i>Streptococcus</i> spp	insucesso	negativo	sucesso	negativo
6	<i>Streptococcus</i> spp.	sucesso	negativo	sucesso	negativo
7	<i>Streptococcus</i> spp.	insucesso	negativo	sucesso	negativo
8	<i>Staphylococcus hyicus</i>	sucesso	negativo	sucesso	negativo
9	<i>Streptococcus</i> spp	sucesso	negativo	sucesso	negativo
10	<i>Streptococcus</i> spp	sucesso	negativo	sucesso	negativo

QUADRO 3. Cura clínica e bacteriológica em dez vacas com mastite por diferentes micro-organismos, utilizando o ciprofloxacino no tratamento convencional (3 aplicações do anti-mastítico) e no estendido (6 aplicações do anti-mastítico). Botucatu, SP, 2010 a 2011.

Animal	Isolamento - M 1	Tratamento convencional (cura clínica)	Isolamento - M4 (cura bacteriológica)	Tratamento estendido (cura clínica)	Isolamento – M7 (cura bacteriológica)
1	<i>Corynebacterium bovis</i>	sucesso	<i>Corynebacterium bovis</i>	sucesso	negativo
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	insucesso	negativo	sucesso	negativo
3	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	insucesso	negativo	insucesso	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
4	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	sucesso	negativo	sucesso	negativo
5	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	insucesso	negativo	insucesso	negativo
6	<i>Staphylococcus aureus</i>	sucesso	negativo	sucesso	negativo
7	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	sucesso	negativo	sucesso	negativo
8	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico <i>Staphylococcus aureus</i>	insucesso	negativo	sucesso	negativo
9	<i>Streptococcus</i> spp.	insucesso	negativo	sucesso	negativo
10	<i>Staphylococcus aureus</i>	sucesso	negativo	sucesso	negativo

As Tabelas 5 e 6 apresentam o tratamento estatístico dos dados de cura clínica e bacteriológica das vacas com mastite, segundo os três grupos de antimicrobianos.

TABELA 5. Eficácia da cura clínica do tratamento intramamário (convencional e estendido) de vacas com mastite clínica, utilizando cefoperazona sódica (G1), gentamicina (G2) e ciprofloxacino (G3). Botucatu, SP, 2010 a 2011.

Grupo	Tratamento	
	Convencional	Estendido
	% (n)	% (n)
Cefoperazona Sódica ¹	50 (5)	90 (9)
Gentamicina ²	70 (7)	100 (10)
Ciprofloxacino ³	50 (5)	80 (8)

(n) = número de animais do grupo correspondente.

1 = Estatística: valor de P=0,1336 (Teste de χ^2 de McNemar).

2 = Estatística: valor de P=0,2482 (Teste de χ^2 de McNemar).

3 = Estatística: valor de P=0,2482 (Teste de χ^2 de McNemar).

Não foi observada diferença estatística significativa ($P>0,01$) em nenhum grupo de fármaco, quando se comparou o tratamento convencional e o tratamento estendido dentro do mesmo grupo. No entanto, no grupo tratado com cefoperazona sódica foram observados cinco animais (50%) que apresentaram cura clínica após o tratamento convencional e nove animais (90%) após o tratamento estendido. Depois de efetuado o tratamento convencional no grupo da gentamicina, sete animais (70%) apresentaram cura clínica e a totalidade do grupo (100%) se mostrou curado após o tratamento estendido. O grupo tratado com ciprofloxacino apresentou cinco animais (50%) com cura clínica após o tratamento convencional e oito animais (80%) apresentaram cura clínica após o tratamento estendido.

A eficácia da cura bacteriológica foi observada nos três grupos, sem diferença estatística significativa ($P>0,01$) em nenhum dos grupos quando o tratamento convencional foi comparado com o tratamento estendido. Apenas um animal tratado com gentamicina e outro com ciprofloxacino apresentaram reisolamento do agente causal inicial da mastite clínica, respectivamente, *Streptococcus* alfa hemolítico e *Corynebacterium bovis*.

TABELA 6. Eficácia de cura bacteriológica do tratamento intramamário (convencional e estendido) de vacas com mastite clínica, utilizando cefoperazona sódica (G1), gentamicina (G2) e ciprofloxacino (G3). Botucatu, SP, 2010 a 2011.

Grupo	Tratamento	
	Convencional	Estendido
	% (n)	% (n)
Cefoperazona Sódica ¹	100 (10)	100 (10)
Gentamicina ²	90 (9)	100 (10)
Ciprofloxacino ³	90 (9)	100 (10)

(n) = número de animais do grupo correspondente.

1 = Estatística: valor de $P=1,0000$ (Teste de χ^2 de McNemar).

2 = Estatística: valor de $P=1,0000$ (Teste de χ^2 de McNemar).

3 = Estatística: valor de $P=0,4795$ (Teste de χ^2 de McNemar).

6. DISCUSSÃO

O tratamento com antimicrobianos é um dos principais procedimentos na abordagem da mastite em animais domésticos (COSTA, 1999; RIBEIRO, 2008). Existe consenso na literatura especializada, internacional e nacional, que todos os casos de mastite clínica, com sinais sistêmicos ou restritos à glândula mamária, devem ser imediatamente tratados (COSTA, 1999; PHILPOT e NICKERSON, 2002; SANTOS e FONSECA, 2007; RADOSTITS et al., 2007).

Para o tratamento da mastite clínica sem sinais sistêmicos em vacas se recomenda, em geral, de 3 a 5 aplicações do anti-mastítico por via intramamária, a cada 12 a 24 horas, dependendo do princípio ativo do antimicrobiano (COSTA, 1999; SANTOS e FONSECA, 2007). Em condições ideais, o tratamento destes casos deveria ser instituído precedido de testes “in vitro” de sensibilidade microbiana. No entanto, devido as dificuldades práticas e de custo inerentes ao envio de leite para os laboratórios, ou mesmo pela emergência de certos casos, na prática, a escolha do antimicrobiano em situações de campo recai na experiência do profissional em tratamentos anteriores, no apelo comercial de certos produtos, ou com base no perfil de sensibilidade “in vitro” realizado em outra oportunidade no mesmo plantel (RIBEIRO, 2008).

O antimicrobiano ideal para o tratamento da mastite bovina deve apresentar várias características consideradas desejáveis, como amplo espectro, ação bactericida, estabilidade, atingir altas concentrações terapêuticas no tecido mamário, boa ação na presença de material purulento, atóxico para o tecido glandular e neonatos, ausência ou baixo resíduo no leite, baixo custo, disponibilidade no mercado, bem como outras propriedades químicas como pH levemente alcalino e baixa ligação às proteínas e gordura. No entanto, poucos antimicrobianos disponíveis atualmente no mercado reúnem a maiorias destas características (COSTA, 1999; RIBEIRO, 2008).

No Brasil, existem aproximadamente 25 princípios ativos diferentes de anti-mastíticos disponíveis comercialmente para o tratamento intramamário, na lactação, da mastite em vacas (COSTA, 1999; RIBEIRO, 2008). O grande número de ativos de anti-mastíticos no mercado brasileiro permite boa

alternativa de opções para os técnicos e produtores para o tratamento da mastite em vacas, minimizando os efeitos de resistência dos isolados, contanto que o tratamento fosse instituído com respaldo no perfil “in vitro” de sensibilidade aos antimicrobianos (RIBEIRO, 2008). O número excessivo de anti-mastíticos disponíveis comercialmente no Brasil pode ser reflexo da exploração abusiva destes antimicrobianos no mercado nacional, e gera certa confusão na escolha do fármaco para o tratamento. Ainda, a grande proximidade de espectro de ação de certos ativos comerciais de anti-mastíticos no mercado nacional (como as cefalosporinas) com nomes comerciais diferentes (nome fantasia), pode gerar a falsa impressão ao produtor de estar utilizando antimicrobianos completamente distintos no plantel, fato que seria salutar na abordagem terapêutica da mastite, evitando o uso sistemático ou repetido de um mesmo grupamento de fármaco por períodos prolongados no rebanho.

No presente estudo foi investigada a ação da cefoperazona sódica, gentamicina e ciprofloxacino por via intramamária em casos de mastite clínica em vacas, que se constituem em representantes, respectivamente, de cefalosporinas, aminoglicosídeos e fluorquinolonas, considerados os principais grupos de antimicrobianos em uso no Brasil no tratamento intramamário de vacas com mastite na lactação (COSTA, 1999; SANTOS e FONSECA, 2007; RIBEIRO, 2008).

Devido ao grande número de tratamentos de vacas com mastite realizados no Brasil sem o respaldo da cultura microbiológica e de testes “in vitro” de sensibilidade microbiana, a resolução clínica (cura clínica) dos casos é um parâmetro prático adotado na rotina das propriedades para avaliar a eficácia do tratamento. Nestes animais, se considera que a resolução favorável dos casos ocorre quando após 2 ou 3 aplicações do antimicrobiano por via intramamária, se observa regressão da hiperemia e do edema do úbere e tetos, além da normalização do aspecto do leite (RIBEIRO, 2008).

Com base no teste de sensibilidade microbiana “in vitro” (100% de sensibilidade dos isolados ao fármaco do grupo), foi obtida nos 30 animais estudados à cura clínica em 50% das vacas utilizando a cefoperazona sódica, em 70% dos animais com a gentamicina e em 50% dos casos para a ciprofloxacino no tratamento convencional, enquanto no tratamento estendido

foi obtida a cura clínica para os mesmos animais e fármacos em, respectivamente, 90%, 100% e 80%. Utilizando outro antimicrobiano do grupo das cefalosporinas (cefacetril), Auginer e Austin (1987) obtiveram valor similar, com 82% de cura clínica na terapia intramamária de vacas com mastite clínica. Os resultados obtidos no presente estudo indicam que é possível utilizar a cura clínica de vacas como parâmetro prático de resolução dos casos de mastite em vacas, sem sinais sistêmicos, tratadas por via intramamária, contanto que a instituição do tratamento (convencional ou estendido) tenha sido respaldada em testes “in vitro” de sensibilidade microbiana.

O cultivo microbiológico do leite é o melhor parâmetro de avaliação do tratamento no decorrer da lactação de casos de mastite em vacas, pois permite atestar a ausência de isolamento do agente causal no leite, depois de encerrado o tratamento (cura bacteriológica) [RIBEIRO, 2008]. Nos 30 animais tratados no presente estudo, foi obtida a cura bacteriológica utilizando a cefoperazona sódica em 100% dos animais e em 90% dos casos com a gentamicina e ciprofloxacino no tratamento convencional, enquanto para os mesmos animais e fármacos, foi obtida cura bacteriológica em, respectivamente, 90%, 100% e 90% no tratamento estendido. Não foi observada diferença estatisticamente significativa ($P>0,01$) na cura bacteriológica entre os tratamentos convencional e estendido nos 30 animais supracitados. No Rio de Janeiro, Langenegger et al. (1986) avaliaram a eficiência terapêutica de outra cefalosporina (cefacetril) em 47 quartos mamários com mastite subclínica, e assinalaram resultados semelhantes, obtendo 74% de cura bacteriológica nos quartos com infecções por *Staphylococcus* sp. Langoni et al. (2001), no estado de São Paulo, realizaram o tratamento intramamário de sete quartos mamários de vacas com mastite clínica utilizando fluorquinolona de segunda geração (enrofloxacina) e observaram cura bacteriológica em seis quartos (85,7%). Costa et al. (2003), no estado de São Paulo obtiveram, obtiveram êxito na cura clínica de, respectivamente, 81,82% e 90,48% de 18 casos de mastite (clínica) em vacas causadas por *Staphylococcus* sp e 19 por *Streptococcus* sp, utilizando derivados β -lactâmicos. As nuances entre os percentuais de efetividade de cura clínica e/ou bacteriológica dos fármacos nos diferentes estudos podem encontrar reflexo na ação intrínseca de cada fármaco frente aos isolados, na

presença de linhagens resistentes - estafilococos produtores de β -lactamases -, assim como no tratamento de micro-organismos não responsivos aos antimicrobianos convencionais (fungos, algas e certos actinomicetos).

No presente estudo, houve incremento na cura bacteriológica de somente 10% (animal 4) do tratamento convencional comparado ao estendido no grupo da gentamicina. Nos demais, foi observada à mesma taxa de cura (90%) para o ciprofloxacino e decréscimo em 10% (animal 9) da cura bacteriológica no tratamento estendido, utilizando a cefoperazona sódica. Neste último grupo (G1), o não isolamento de *S. aureus* no momento 4 (tratamento convencional) e reisolamento no momento 7 (tratamento estendido), poderia encontrar justificativa na eliminação intermitente de *S. aureus* pela glândula mamária ou pela característica intracelular da bactéria, que dificultam o tratamento no decorrer da lactação (PHILPOT e NICKERSON, 2002; SANTOS e FONSECA, 2007; RADOSTITS et al., 2007).

Nas 30 vacas com mastite clínica tratadas por via intramamária com três fármacos distintos, foi observada cura clínica entre 50% a 70% dos casos quando submetidos ao tratamento convencional, enquanto a cura bacteriológica (com os mesmos animais e fármacos) varia de 90% a 100%. Tal disparidade entre a cura clínica e bacteriológica poderia ser justificada pelo fato de que apesar dos três fármacos apresentarem efetividade na cura bacteriológica, o processo inflamatório e, conseqüentemente, os sinais clínicos mamários ainda persistem por sete dias ou mais, depois de encerrado o tratamento, mesmo com a inativação do agente causal da mastite (SCHALM et al., 1971; SANTOS e FONSECA, 2007).

No presente estudo foi observado déficit de somente 10% entre a sensibilidade “in vitro” dos isolados e a cura bacteriológica após o tratamento intramamário “in vivo”, tanto na forma convencional como na estendida. Em contraste, Apparao et al. (2009) nos EUA, compararam o perfil de sensibilidade microbiana e o tratamento “in vivo” com pirlimicina de 132 vacas (178 glândulas mamárias) com mastite subclínica causadas por 194 linhagens bacterianas, e não observaram melhora significativa nos índices de cura nos isolados sensíveis “in vitro” ao fármaco. Apesar da divergência dos autores sobre a eficácia do perfil de sensibilidade “in vitro” como base para o tratamento intramamário de vacas com mastite (COSTA, 1999; PHILPOT e NICKERSON,

2002; HOE e RUEGG , 2005; SANTOS e FONSECA, 2007; RIBEIRO, 2008), os achados do presente estudo mostraram concordância entre a sensibilidade “in vitro” de bactérias convencionais de mastite, obtidas de vacas naturalmente infectadas, e reforça a indicação do teste de sensibilidade microbiana “in vitro” previamente a instituição da terapia, visando o uso racional de antimicrobianos no tratamento da mastite clínica bovina.

No tratamento da mastite, os isolados sensíveis “in vitro” cuja cura bacteriológica não é obtida “in vivo” depois do tratamento, poderiam ser justificados pela presença de outros fatores que concorrem para a resolução dos processos de mastite (além da ação dos antimicrobianos), como a viabilidade intracelular de bactérias, formação de microabscessos ou (pio)granulomas mamários, produção de enzimas (β -lactamases) e excesso de material purulento, que dificultam a ação de certos antimicrobianos no foco infeccioso na glândula mamária (COSTA, 1999; SANTOS e FONSECA, 2007; RADOSTITS et al., 2007; RIBEIRO, 2008).

Para a formação dos três grupos de dez animais para o tratamento, com cada fármaco, foi necessário utilizar, ao todo, 54 animais. Desta forma, foram excluídos 24 animais, dos quais em cerca de 90% dos casos foram retirados dos grupos de estudo, posto que apresentavam isolados resistentes ou parcialmente sensíveis ao fármaco do grupo, ou eram micro-organismos não responsivos aos tratamentos com antimicrobianos convencionais por via intramamária (como fungos, algas e certos actinomicetos) quesitos considerados de descarte nos critérios de exclusão do presente estudo. Esta conduta na formação dos grupos reforça a importância do teste de sensibilidade microbiana “in vitro” previamente a instituição do tratamento intramamário dos casos clínicos de mastite em vacas, visto que, dentre os 24 animais excluídos supracitados com isolados não sensíveis aos fármacos, ou micro-organismos não convencionais na casuística de mastite, certamente resultariam em insucesso terapêutico em condições de campo. Este resultado salienta, também, a importância do exame microbiológico antes do início do tratamento dos casos de mastite bovina, que possibilita nortear as ações de controle/profilaxia da mastite, distintas para micro-organismos de origem contagiosa e ambiental (PHILPOT e NICKERSON, 2002; SANTOS e FONSECA, 2007). A lactocultura permite reconhecer micro-organismos não

convencionais de mastite, ou não responsivos aos tratamentos intramamários e/ou parenterais em casos de mastite bovina ao longo da lactação, cuja recomendação seria a ablação química dos quartos, ou mesmo o descarte precoce dos animais (RIBEIRO, 2008).

A terapia estendida é uma modalidade de tratamento da mastite em vacas indicada no decorrer da lactação, realizada com 6 a 8 aplicações de antimicrobianos por via intramamária, que tem mostrado incremento nas taxas de cura em certos casos de mastite (SANTOS e FONSECA, 2007). No presente estudo, não foi obtida diferença estatisticamente significativa ($P>0,01$) na cura bacteriológica comparando o tratamento convencional e o estendido, para os três fármacos utilizados em animais com mastite clínica. Em estudo similar, Kasravi et al. (2011) no Irã, compararam o efeito do tratamento convencional e do estendido em vacas com mastite subclínica utilizando a cefquinoma. Foram constituídos três grupos de animais, dos quais o grupo 1 (25 vacas e 52 quartos) foi tratado com tratamento convencional (três aplicações a cada 16 horas), o grupo 2 (26 vacas e 58 quartos) com tratamento estendido (seis aplicações a cada 16 horas) e o terceiro grupo não tratado (22 vacas e 40 quartos). Os principais agentes isolados foram estafilococos coagulase negativos, estreptococos e coliformes. A cura bacteriológica nos três grupos foi, respectivamente, 84,61%, 91,37% e 20%. Não foi observada diferença estatística significativa entre o tratamento convencional e estendido. Em contraste, Roy et al. (2009), no Canadá, investigaram a eficácia da terapia estendida em vacas cronicamente infectadas por *S. aureus* utilizando a cefapirina sódica. Foram tratadas 31 vacas cronicamente infectadas provenientes de 14 rebanhos selecionados aleatoriamente, tratadas por 5 dias consecutivos, a cada 12 horas, comparados a outro grupo de 30 animais não tratados. A cultura microbiológica foi realizada com 10, 24 e 31 dias após o encerramento do tratamento. Foram observadas taxas de cura nos grupos tratados e controle de, respectivamente, 25,8% e 3,3% ($P=0,013$), mostrando incremento nas taxas de cura do tratamento estendido em vacas com infecções persistentes por *S. aureus*.

Tais achados sinalizam que a terapia mamária estendida deve ser reservada para situações específicas de tratamento (como infecções recorrentes por *S. aureus* ou por agentes não convencionais de mastite, que se

opta por tratar ao longo da lactação) [RIBEIRO, 2008] em virtude do aumento no manejo na propriedade, devido ao maior número de aplicações mamárias por animal, bem como pelo custo adicional dos anti-mastíticos.

7. CONCLUSÕES

- ✓ As taxas de cura clínica dos animais entre 50 a 100% utilizando a cefoperazona sódica, gentamicina ou ciprofloxacino indicam que estes fármacos se constituem em ótimas alternativas para o tratamento da mastite clínica em vacas na lactação;
- ✓ Com base no perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, previamente ao tratamento intramamário, foi obtida entre 90 a 100% de cura bacteriológica nos animais utilizando os três fármacos, reforçando a importância de instituição do tratamento da mastite clínica em vacas com respaldo em testes de sensibilidade microbiana “in vitro”;
- ✓ Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as taxas de cura bacteriológica comparando o tratamento intramamário convencional e o estendido para os três grupos de antimicrobianos, em vacas com mastite clínica, naturalmente infectadas, sinalizando que a terapia estendida deve ser reservada para casos específicos de mastite bovina.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPARAO, D.; OLIVEIRA, L.; RUEGG, P.L. Relationship between results of in vitro susceptibility tests and outcomes following treatment with pirlimycin hydrochloride in cows with subclinical mastitis associated with gram-positive pathogens. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, vol. 234, n.11, p.1437-46, 2009.
- ARASHIRO, E.K.N.; TEODORO, V.A.M; MIGUEL, E.M. Mastite bovina: importância econômica e tecnológica. Disponível em: (www.cienciadoleite.com.br). Acesso em 19 de fevereiro de 2008.
- AUCOIN, D.P. Uso da enrofloxacin em infecções crônicas envolvendo *Staphylococcus intermedius* ou *Pseudomonas aeruginosa*. Prevenindo o aparecimento de resistências. **Hora Veterinária**. Porto Alegre, n. 80. p. 25-27, 1994.
- AUGINER, S. P. M.; AUSTIN, F. H. A study of efficacy of intramamary antibiotics in the treatment of clinical mastites. *British Veterinary Journal*, v.143, p.88-90, 1987.
- BRADLEY, A.J. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J.*164:116-128.
- BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. In: **Pesq. Vet. Bras.**, v. 18, p. 39-44, 1998.
- BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; SILVA, M.A.S.; CARMO, R.A. Concentração mínima inibitória de dez micro-organismos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Embrapa Gado de Leite**. Nov./2000.
- COSTA, E.O.; BENITES, N.R.; MELVILLE, P.A; PARDO, R.B.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; Estudo etiológico da mastite clínica bovina. **Revista brasileira de Medicina Veterinária**, v.17, n.4, p.156-158, 1995.
- COSTA, E. O.; GARINO, F.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R.; SILVA, J.A.B.; WATANABE, E.T.; VALLE, C.R. Estudo da etiologia das mastites bovinas nas sete principais bacias leiteiras do Estado de São Paulo. **Revista do Núcleo de Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, n.4, p.6-13, 2000.

- COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: Spinosa, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. Cap. 42, p. 422-433.
- COSTA, E.O.; GARINO, JR.F.; PADOVESE, L.; SANTOS, E.; Avaliação da eficácia de tratamentos de mastite clínica em vacas em lactação. **Revista do Núcleo de Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, n.1, p. 3-9, 2003.
- COSTA, E.O.; PONCE, H.; WATANABE, E.T.; VALLE, C.R. Avaliação da terapia de mastite clínica: eficácia da terapêutica medida em números de dias de tratamento. **Revista do Núcleo de Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, n.2, p. 10-14, 1999.
- FAGUNDES, H.F.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.34, n. 4, p. 1315-1320, jul-ago, 2004.
- FERNANDES, D. Diagnóstico laboratorial em mastites bovinas: Sua real importância e aplicação prática. Atualização Técnica 33, **Div. Agropec. Pfizer**, 2006
- FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. Lemos Editorial: São Paulo, 2000. 175p.
- GIANOLA, D., HERINGSTAD, B., KLEMETSDAL, G., CHANG, Y. M. Longitudinal analysis of clinical mastitis at different stages of lactation in Norwegian cattle. **Livest. Prod. Sci.** v.88, p.251-261., 2004.
- INSTITUTO FERNANDO COSTA. Manejo de ordenhas: Princípios e métodos. 20--?, S.I.. **Circular Técnica**. Milkpoint, 2006.
- HOE, F.G.; RUEGG, P.L. Relationship between antimicrobial susceptibility of clinical mastitis pathogens and treatment outcome in cows. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.227, n.9, p.1461-1468, 2005.
- KASRAVI, R.; BOLOURCHI, M.; FARZANEH, N.; SEIFI, H.A.; BARIN, A.; HOVARESHTI, P.; GHARAGOZLOU, F. Efficacy of conventional and extended intra-mammary treatment of persistent sub-clinical mastitis with cefquinome in lactating dairy cows. **Trop. Anim. Health Prod.**, v.43, n.6, p. 1203-10, 2011.

- LANGENEGGER, J.; FIGUREDIO, M. P.; REZENDE, E. F. Eficácia terapêutica do cefacetil frente aos micro-organismos dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* isolados de mastites subclínicas. *Hora Veterinária*, n.30, p.24-27, 1986.
- LANGONI, H. Estudos com mastite no Instituto de Zootecnia. (Debatedor). In: I Reunião Técnica de Seção de Sanidade Animal do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, Instituto de Zootecnia, 1996.
- LANGONI, H. Agentes emergentes na etiologia da mastite. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.19, p.238-240, 1997.
- LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; SOUZA, L.C.; SHIMABUKURO, F.H.; CAUDURO, R.O. Eficácia da cefapirina benzatina no tratamento da mastite subclínica na interrupção da lactação. **Revista do Núcleo de Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, n.3, p. 7-9, 2000.
- LANGONI, H.; PULGA, M.E.; DOMINGUES, P.F.; SILVA, A.V. Eficácia da enrofloxacin no tratamento de casos de mastite bovina de origem ambiental em propriedade leiteira. **Revista do Núcleo de Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, v.4, n.1, p.19–22, 2001.
- LANGONI, H.; TONI, F.B.; CABRAL, K.G.; CAVALIERO, M. J. Tratamento da mastite bovina com associação ampicilina + cloxacilina. **Revista do Núcleo de Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, n. 3, p.21-23, 1999.
- LANGONI, H. & DOMINGUES, P.F. Prevalência de mastite bovina e sua distribuição por quartos. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.20, n.2, p.85-87, 1998.
- LANGONI, H.; LAURINO, F.; FACCIOLI, P.Y.; SILVA, A.V.; MENOZZI, B.D. Cultivo microbiológico e a sensibilidade no isolamento de patógenos nas mastitis bovinas. **Veterinária e Zootecnia.**, p.708-715,v.16,n.4,dez.,2009.
- LEHTOLAINEN, T.; SHWIMMER, A.; SHPIGEL, N.Y.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; PYÖRÄLÄ S. In vitro antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from clinical bovine mastitis in Finland and Israel. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n.12, p. 3927-32, 2002.
- MARQUES, D.C. **Criação de Bovinos**. 7.ed. Belo Horizonte: CVP Consultoria Veterinária e Publicações, 2003.

- MOORE, G.A., HEIDER, L.E. Treatment of mastitis. **Vet Clin North Am Large Anim Pract**, v.6, p.323-33, 1984.
- MÜLLER, E.E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. **Anais do II Sul-Leite: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na região Sul do Brasil**. Maringá – PR, p. 206-217, 2002
- NADER FILHO, A.; MANGERONA, A.C.S.; MOURA, E.S. Eficácia da associação sinérgica de betalactâmicos em suspensão oleosa no tratamento intramamário da mastite de vacas em lactação. **Revista do Núcleo de Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, n.1, p.20-22, 2002.
- NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; AMARAL, L.A.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; OLIVEIRA, R. P. Sensibilidade Antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 74, n.1, p. 1-4, jan/mar. 2007.
- NMC – NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Current concepts of bovine mastitis**. 4.ed.. NMC: Madison, 1996.64p.
- PEARSON WALLER K., COLDITZ I.G., LUN S. & OSTENSSON K. Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxininduced bovine mastitis. **Res. Vet. Sci.** 75:247-155, 2003.
- PEREIRA, F. C., A importância da contagem de células somáticas na qualidade do leite e derivados. Dissertação - UFLA - Lavras – MG 2005.
- PHILPOT, W. N. & NICKERSON, S. C. **Vencendo a Luta Contra a Mastite** Ed. Milkbuzz, Brasil. p. 6 – 13, 2002.
- PINTO, M. S.; FARIA, J. E. de; MESSAGE, D.; CASSINI, S. T. A.; PEREIRA, C. S.; GIOSO, M. M. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Braz. J. vet. Reserch animal Science**, v. 38, n.6, p.278-283, 2001.
- QUINN, P.J., MARKEY, B.K, CARTER, M.E., DONNELLY, W.J., LEONARD, F.C. In: **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**..1 ed., São Paulo: Artmed, 2005, 512p.
- RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C. et al. **Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. 10. ed. London: W. B. Saunders, 2007.

- RIBEIRO, M.G. Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. In: ANDRADE, S.F. (Eds). **Manual de Terapêutica Veterinária**. 3.ed. Roca: São Paulo, 2008. p.759-771.
- RIBEIRO, M.G.; COSTA, E.O.; LEITE, D.S.; LANGONI, H.; GARINO JÚNIOR, F.; VICTÓRIA, C.; LISTONI, F.J.P. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.5, p.724-731, 2006.
- ROY, J.P.; DESCÔTEAUX, L.; DUTREMBLAY, D.; BEAUDRY, F.; ELSENER, J. Efficacy of a 5-day extended therapy program during lactation with cephapirin sodium in dairy cows chronically infected with *Staphylococcus aureus*. **Can. Vet. J.**, v.50, n.12, p.1257-62, 2009.
- RUPP, R.; BEAUDEAU, F.; BOICHARD, D. Relationship between milk somatic-cell counts in the first lactation and clinical mastitis occurrence in the second lactation of French Holstein cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 46, p. 99-111. 2000.
- SANDHOLM, M., LOUHI, M. Bovine mastitis: why does antibiotic therapy fail? **Mammites des laitieres**, p.88-106,1991.
- SANTOS, M.V., FONSECA, L.F.L. (Eds.) **Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade do Leite**. São Paulo: Manole, 2007. 314p.
- SCHALM, O. W.; CARROL, E.; JAIN, N. C. **Bovine mastitis**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1971. 360 p.
- SILVA, N. Doença da glândula mamária: mamite/mastite. In: MARQUES, D. C. **Criação de bovinos**. 7ed. Belo Horizonte: Consultoria Veterinária e Publicações, p. 435-451, 2003.
- SUMANO, H.; OCAMPO, L. Pharmacological basis for treatment of bovine mastitis – review. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v.47, p. 127-135, 1992.
- TRIOLA, M.F. **Introdução à Estatística**. 9.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 682p.
- WATTIAUX, M. A. Development The Babcock Institute for International Dairy Research.2000Disponívelem<http://babcock.cals.wisc.edu/downloads/de_html/ch_23_pt.html> acesso 30/09/06.

WILSON, C.D.; AGGER, N.; GILBERT, G.A; THOMASSON, C.A.; TOLLING, S.T. Field Trial with cefoperazone in the treatment of bovine clinical mastitis. **Veterinary Record**, v.4,p.9-17, 1986.

9. Trabalho Científico

9.1 Normas da Revista Veterinária e Zootecnia

Revista -Veterinária e Zootecnia – UNESP/BTU

Diretrizes para Autores

Artigos Científicos

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

Página de rosto, com:

Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, em letra maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira chamada de rodapé;

Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data de aprovação.

Página com resumo, abstract e resumen

Tanto o resumo, como o abstract e o resumen devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço simples, começando por RESUMO. O abstract, e o resumen devem ser tradução fiel do resumo. Independente da língua em que o artigo for apresentado, deverá conter o resumo em português, inglês e espanhol.

Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave, keywords, e palabras clave que identifiquem o conteúdo do texto.

A estrutura do artigo deverá conter:

Introdução: Deve ser clara, objetiva e relacionada ao problema investigado e à literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os objetivos do trabalho.

Material e Métodos: Deve oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos utilizados, inclusive os estatísticos.

Resultados: Apresentação dos resultados obtidos, que devem ser descritos sem interpretações e comparações. Poderá ser sob a **forma de tabelas**, no máximo de cinco, ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas de apresentação tabular da ABNT/NBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a **forma de figuras**, nos casos de gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em algarismos arábicos, até no máximo de seis, e citadas no texto como Figura.

Discussão: Deve ser entendida como a interpretação dos resultados, confrontando com a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.

Conclusões: É a síntese final, fundamentada nos resultados e na discussão.

Referências: Devem ser apresentadas de acordo com as normas Vancouver (<http://www.icmje.org/>).

9.2 Artigo

EFICÁCIA “IN VITRO” E “IN VIVO” DA CEFOPERAZONA SÓDICA, GENTAMICINA E CIPROFLOXACINO NO TRATAMENTO INTRAMAMÁRIO DA MASTITE CLÍNICA BOVINA

IN VITRO AND IN VIVO EFFICACY OF SODIUM CEFOPERAZONE, GENTAMICIN AND CIPROFLOXACIN FOR THE INTRAMAMMARY TREATMENT OF CLINICAL MASTITIS IN COWS.

EFICACIA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LA CEFOPERAZONA SÓDICA, LA GENTAMICINA Y EL CIPROFLOXACINO EN EL TRATAMIENTO INTRAMAMARIO DE LA MASTITIS CLÍNICA BOVINA.

Sérgio Ricardo Maiolino¹

Márcio Garcia Ribeiro²

Rodrigo Garcia Motta³

Aristeu Vieira da Silva⁴

Glauceia Suman⁵

Fernando José Paganini Listoni⁶

1. Mestrando do Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista, FMVZ/UNESP, Botucatu. SP.

Docente das Disciplinas de Reprodução Animal e Melhoramento Genético, Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral - FAEF, Garça, SP.

2. Professor Doutor da Disciplina de Enfermidade Infecciosas dos Animais do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ/UNESP, Botucatu, SP.

3. Doutorando do Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista, FMVZ/UNESP, Botucatu. SP.

4. Professor do Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA, Brasil.

5. Docente das Disciplinas de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral - FAEF, Garça, SP.

6. Técnico do Laboratório de Microbiologia do Serviço de Diagnóstico Microbiológico, FMVZ/UNESP, Botucatu, SP.

Eficácia “in vitro” e “in vivo” da cefoperazona sódica, gentamicina e ciprofloxacino no tratamento intramamário da mastite clínica bovina.

RESUMO

O presente estudo comparou a eficácia “in vitro” e “in vivo” da cefoperazona sódica, gentamicina e ciprofloxacino no tratamento intramamário de casos de mastite clínica bovina. Foram utilizadas 30 vacas com mastite clínica, não sistêmica, divididas em três grupos de dez animais. Em cada grupo foi utilizado um dos antimicrobianos citados, para o tratamento convencional da mastite (três aplicações a cada 12 horas) e o tratamento estendido (seis aplicações a cada 12 horas). Os principais micro-organismos isolados das vacas com mastite foram *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e enterobactérias. A eficácia da cura clínica do tratamento convencional foi de 50% para o grupo tratado com cefoperazona sódica, 70% para o grupo tratado com gentamicina e 50% para o grupo tratado com ciprofloxacino. Para os mesmos grupos, a eficácia da cura clínica do tratamento estendido foi 90%, 100% e 80%, respectivamente. A eficácia da cura bacteriológica foi de 100% para o grupo tratado com cefoperazona sódica e de 90% para os grupos utilizando a gentamicina e ciprofloxacino no tratamento convencional. Para os mesmos grupos, foi observado 100% de cura bacteriológica para a gentamicina e 90% para os grupos com cefoperazona sódica e ciprofloxacino no tratamento estendido. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ($P>0,01$) para a cura clínica e cura bacteriológica dentro de cada grupo e entre os grupos de antimicrobianos, tampouco entre os tratamentos convencional e estendido dentro do mesmo grupo ou entre os grupos. Os resultados do presente estudo reforçam a importância da lactocultura e do teste de sensibilidade microbiana “in vitro” como respaldo para os tratamentos intramamários de vacas com mastite clínica. Inferiu-se também a boa eficácia na cura clínica e bacteriológica da cefoperazona sódica, gentamicina e ciprofloxacino no tratamento da mastite clínica em vacas na lactação, de forma convencional ou estendida, contanto que respaldado na sensibilidade microbiana “in vitro”. A terapia estendida deve ser reservada para o tratamento de casos especiais de mastite bovina.

Palavras-chave: mastite clínica bovina; tratamento intramamário; cura clínica; cura bacteriológica; perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

***In vitro* and *in vivo* efficacy of sodium cefoperazone, gentamicin and ciprofloxacin for the intramammary treatment of clinical mastitis in cows.**

Abstract

This study compared the *in vitro* and *in vivo* efficacy of sodium cefoperazone, gentamicin and ciprofloxacin for the intramammary treatment of clinical mastitis in cows. Thirty cows suffering from non-systemic, clinical mastitis were divided into three groups of ten animals each. One of the above mentioned antibiotics was used in each group for conventional (i.e., three administrations of the drug, each 12 hours) and extended (i.e., six administrations of the drug, each 12 hours) treatments of mastitis. The most common microorganisms isolated from cows were *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. and enterobacteria. The efficacy of clinical cure of the conventional treatment was 50%, 70% and 50% for the groups treated with sodium cefoperazone, gentamicin and ciprofloxacin, respectively. Regarding the extended treatment, efficacy was 90%, 100% and 80%, for sodium cefoperazone, gentamicin and ciprofloxacin, respectively. Efficacy of bacteriological cure was 100% for sodium cefoperazone, and 90% for both gentamicin and ciprofloxacin using the

conventional treatment. By using the extended treatment, efficacy of bacteriological cure was 100% for gentamicin and 90% for both cefoperazone and ciprofloxacin. Statistical differences ($p>0.01$) were not found in clinical or in bacteriological cure into the same group or among groups. Similarly, statistical differences between the conventional and extended treatments were not found. The results from this study reinforce the importance of performing microbiological culture of milk and *in vitro* antimicrobial sensitivity tests for supporting the intramammary treatment of clinical mastitis in cows. The clinical and bacteriological efficacy of sodium cefoperazone, gentamicin and ciprofloxacin in lactating cows was also observed in both conventional and extended treatments provided the use of sensitivity tests *in vitro*. Extended treatments should be used in selected cases of bovine mastitis.

Key words: clinical mastitis in cows; intramammary treatment; clinical cure; bacteriological cure; antimicrobial sensitivity test.

Eficacia *in vitro* e *in vivo* de la cefoperazona sódica, la gentamicina y el ciprofloxacino en el tratamiento intramamario de la mastitis clínica bovina.

RESUMEN

El presente estudio comparó la eficacia *in vitro* e *in vivo* de la cefoperazona sódica, la gentamicina y el ciprofloxacino en el tratamiento intramamario de la mastitis clínica bovina. Fueron utilizadas 30 vacas con mastitis clínica sin signos sistémicos divididas en tres grupos de diez animales. En cada grupo fue utilizado uno de los antibióticos citados antes, para realizar tratamiento convencional (tres aplicaciones cada 12 horas) y extendido (seis aplicaciones cada 12 horas) contra mastitis. Los principales microorganismos aislados de vacas con mastitis fueron *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. y enterobacterias. La eficacia de la cura clínica usando tratamiento convencional fue de 50% para el grupo de cefoperazona sódica, 70% para gentamicina y 50% para ciprofloxacino. Con el tratamiento extendido la eficacia de la cura clínica fue de 90%, 100% y 80%, respectivamente. La eficacia de la cura bacteriológica fue de 100% para el grupo cefoperazona sódica y de 90% para los grupos gentamicina y ciprofloxacino utilizando el tratamiento convencional. Así mismo, se observó 100% de cura bacteriológica para gentamicina y 90% para los grupos cefoperazona sódica y ciprofloxacino utilizando el tratamiento extendido. No fueron observadas diferencias estadísticas ($P>0.01$) para la cura clínica y bacteriológica ni dentro ni entre los grupos de antimicrobianos. Tampoco se encontró diferencia entre los tratamientos convencional y extendido dentro del mismo grupo o entre los grupos. Los resultados del presente estudio refuerzan la importancia del cultivo de la leche y de las pruebas de sensibilidad microbiana *in vitro* como respaldo para los tratamientos intramamarios en vacas con mastitis clínica. Los resultados permiten inferir también que la cefoperazona sódica, la gentamicina y el ciprofloxacino son eficaces para la cura clínica y bacteriológica de la mastitis clínica, siempre que se utilicen en combinación con exámenes de sensibilidad microbiana *in vitro*. La terapia extendida deberá estar reservada al tratamiento de casos especiales de la mastitis bovina.

Palabras clave: mastitis clínica bovina; tratamiento intramamario; cura clínica; cura bacteriológica; perfil de sensibilidad a los antimicrobianos.

1. INTRODUÇÃO

A mastite figura dentre as doenças que mais oneram a criação de bovinos de leite, devido à redução na produção, alterações na composição, gastos com medicamentos, honorários veterinários e reposição de animais (1). No entanto, no Brasil poucos estudos tem se preocupado em avaliar os custos da mastite, no que tange a redução na produção de leite, depreciação dos animais e gastos com medicamentos, incluindo o tratamento (2; 3).

A mastite bovina caracteriza-se por processo inflamatório da glândula mamária, que provoca alterações físicas, químicas, celulares e bacteriológicas do leite, bem como por modificações patológicas do tecido glandular, podendo determinar lesões irreversíveis no parênquima mamário (4).

No ano de 2012, o Brasil produziu cerca de 32 bilhões de litros, com efetivo de rebanho leiteiro ao redor de 25 milhões de vacas ordenhadas. Apesar do grande volume de produção de leite no país, os índices de produção por animal/dia (3 a 5 litros/vaca) e por animal em lactação (ao longo de 300 dias) são considerados baixos, ao redor de 1270 litros/vaca/ano. Esta produção representa 30 a 50% da média obtida nos principais países produtores de leite. Em contraste, várias regiões do país possuem ótimas condições de produção, com médias superiores a 20 litros/vaca/dia. Fatores de manejo (qualidade e manejo das instalações e práticas de ordenha), nutricionais, de produção (estágio da lactação) e dos animais (raça, idade, condição física do teto, resistência genética à mastite), além de baixo investimento em infra-estrutura e mão de obra desqualificada podem influenciar na ocorrência da mastite (5; 6; 7).

As infecções da glândula mamária em bovinos se notabilizam pela pluralidade etiológica. Convencionalmente, os micro-organismos envolvidos na gênese da mastite bovina estão agrupados em contagiosos e ambientais, com base nas fontes de infecção e vias de transmissão (3; 4; 8). Os contagiosos são encontrados na microbiota da pele e mucosas dos animais, transmitidos fundamentalmente no momento da ordenha, pelas mãos do ordenhador, pelo úbere, pelo próprio equipamento de ordenha ou pelo bezerro ao mamar. Em contraste, os ambientais estão amplamente distribuídos no meio ambiente dos animais, veiculados para a glândula mamária a partir do solo, fezes, ar, água, vetores, utensílios e fômites (7).

A mastite é classicamente subdividida em clínica e subclínica, de acordo com a severidade e exteriorização do processo inflamatório (1; 4). A mastite clínica caracteriza-se por alterações visíveis na glândula mamária e/ou no leite (3; 8). Nestes casos, a glândula mamária pode apresentar sinais de edema, dor, calor, rubor e perda momentânea da função, além de alterações visíveis no leite (formação de grumos, pus, dessora, coágulos) (1; 2; 3).

Na forma subclínica, somente se observa a redução na produção de leite. Nestes animais, o diagnóstico somente é alcançado utilizando métodos que permitam a detecção de alterações na composição e constituintes celulares do leite (4).

A adoção do tratamento utilizando antimicrobianos é um dos principais procedimentos na abordagem da mastite em animais domésticos (7). Diversos protocolos terapêuticos são utilizados na prática veterinária no tratamento da mastite em vacas na lactação e no período de secagem (8).

O tratamento imediato dos casos clínicos e a terapia/profilaxia da vaca seca com o uso de antimicrobianos em todos os quartos mamários, no momento da secagem, estão entre as medidas mais frequentemente recomendadas na abordagem terapêutica da mastite em vacas (1; 4).

Os maiores índices de cura no tratamento por via intramamária da mastite bacteriana em vacas são obtidos com 3 a 5 aplicações, em intervalos de 8, 12 a 24 h (dependendo das características e vida média de cada antimicrobiano). Nos casos de mastite subclínica, não existe consenso sobre o tratamento no decorrer da lactação, ficando geralmente estes animais

para serem tratados na terapia da vaca seca, na qual os animais são tratados com dose única do anti-mastítico, em cada teto do animal, no dia da secagem (7; 9).

Nos casos de mastite por micro-organismos refratários ao tratamento no decorrer da lactação, notadamente por *Staphylococcus aureus*, tem-se preconizado, alternativamente, a terapia estendida, que consiste em 6 a 8 aplicações de anti-mastíticos via intramamária, com intuito de melhorar as taxas de cura clínica e bacteriológica (10). No entanto, esta modalidade alternativa de tratamento apresenta maior custo ao produtor, em virtude do maior número de anti-mastíticos requeridos por animal (7).

Diferentes antimicrobianos estão disponíveis comercialmente para o tratamento intramamário da mastite em vacas no Brasil (9). Segundo Ribeiro (7), os princípios ativos de antimicrobianos mais utilizados pertencem ao grupo das penicilinas e derivados, aminoglicosídeos, fluorquinolonas, tetraciclinas e sulfas potencializadas pelo trimetoprim.

O uso indevido ou não racional de antimicrobianos (dose reduzida, interrupção do tratamento) no tratamento da mastite, pode aumentar a pressão seletiva para linhagens com resistência múltipla (1; 3).

Toda e qualquer indicação do tratamento da mastite em animais deveria ser respaldada em testes “in vitro” de sensibilidade microbiana (antibiograma). Entretanto, na prática, por questões econômicas, por desconhecimento, dificuldade de acesso aos laboratórios e pessoal capacitados, ou em casos graves de mastite clínica com sinais sistêmicos que necessitam de terapia emergencial; os testes de sensibilidade microbiana “in vitro” não são realizados, recaindo a escolha do fármaco, na grande maioria das vezes, na experiência acumulada dos profissionais em tratamentos anteriores, ou mesmo no apelo comercial de determinados produtos (7). Ademais, apesar da notória diferença entre a eficácia “in vitro” ou “in vivo” dos antimicrobianos utilizados no tratamento da mastite, são escassos os estudos conduzidos no intuito de confrontar o resultado “in vitro” de determinada linhagem frente a um dado fármaco, com a eficácia “in vivo” deste mesmo antimicrobiano por via intramamária.

Considerando que a mastite é a principal doença infectocontagiosa que acomete bovinos de produção leiteira, os diferentes protocolos de tratamento (convencional e estendido) e princípios ativos anti-mastíticos disponíveis no Brasil, a variação entre a eficácia “in vitro” e “in vivo” dos fármacos e a escassez no país de dados sobre a relação custo/benefício do tratamento; o presente estudo investigou a eficácia “in vitro” e “in vivo” da cefoperazona sódica, gentamicina e ciprofloxacino no tratamento intramamário, convencional e estendido, na mastite clínica bovina.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Delineamento experimental

Foi comparada a cura clínica e bacteriológica, no tratamento intramamário convencional e estendido, em vacas com mastite clínica, naturalmente infectadas, utilizando a cefoperazona sódica, gentamicina e ciprofloxacino.

2.2. Animais

Foram utilizadas 30 vacas holandesas e mestiças que apresentaram mastite clínica, não sistêmica e que não receberam tratamento prévio no decorrer da lactação, procedentes de propriedades leiteiras da região de Botucatu, SP.

2.3. Diagnóstico da mastite clínica

O diagnóstico de mastite clínica foi fundamentado em alterações macroscópicas do leite na prova de Tamis (caneca telada de fundo escuro) e/ou na presença de sinais de inflamação na glândula mamária (dor, calor, hiperemia, sensibilidade dolorosa, recusa em permitir o aleitamento dos bezerras). Foi realizado exame físico completo do úbere dos

animais (6). As vacas que apresentaram sinais gerais de mastite (taquicardia, taquipnéia, febre, atonia ruminal, decúbito) não foram utilizadas no estudo.

Cada quarto mamário com mastite clínica foi considerado uma unidade animal. Desta forma, o estudo utilizou de 10 animais diferentes para cada grupo de antimicrobiano, não se utilizando mais de um quarto mamário do mesmo animal a título da composição dos grupos de tratamento, ou para fins de cálculo dos valores de cura bacteriológica e cura clínica.

2.4. Grupos de tratamento

Foram constituídos três grupos de tratamento para cada antimicrobiano comercial, como segue: G1 = cefoperazona sódica (10 animais); G2 = gentamicina (10 animais) e G3 = ciprofloxacino (10 animais).

2.5. Protocolos de tratamento intramamário (convencional e estendido)

O tratamento intramamário foi realizado respeitando condições adequadas de anti-sepsia (7). Foi iniciado imediatamente após o diagnóstico da mastite clínica, antes do envio do material para o diagnóstico microbiológico. Todos os animais tratados que permaneceram na composição dos três grupos de tratamento apresentaram, obrigatoriamente, sensibilidade “in vitro” do isolado ao antimicrobiano do grupo. Com efeito, todos os animais componentes de cada grupo foram tratados com antimicrobianos que apresentaram 100% de efetividade “in vitro” para o isolado. Os animais que, mesmo depois de iniciado o tratamento, acusaram isolados com resultados “in vitro” parcialmente sensíveis ou resistentes no teste de sensibilidade microbiana foram excluídos.

Os animais receberam tratamento intramamário, a cada 12 horas, com seis aplicações por animal, constituindo os seguintes momentos (M): M1 (dia zero – diagnóstico da mastite e início do tratamento), M2 (12 horas após M1), M3 (24 horas após M1), M4 (36 horas após M1), M5 (48 horas após M1) e M6 (60 horas após M1). Foi considerado, no mesmo animal, o **tratamento convencional** encerrado na terceira aplicação do antimicrobiano (M3) e o **tratamento estendido** ao final da sexta aplicação (M6).

2.6. Isolamento e caracterização dos micro-organismos

As amostras de leite dos animais com mastite clínica foram colhidas assepticamente de todos os animais nos três grupos no M1, M4 e 12 horas após M6 (M7). As amostras foram transportadas sob temperatura de refrigeração (4–8°C) para o Laboratório de Diagnóstico Microbiológico de Enfermidades Infecciosas dos Animais da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP. Em seguida, foram semeadas nos meios de ágar suplementado com sangue bovino desfibrinado (5%) e ágar MacConkey, mantidos a 37°C, em condições de aerobiose. As culturas foram avaliadas com 24, 48 e 72 horas de incubação e os micro-organismos, identificados segundo as características morfo-tintoriais, bioquímicas e de cultivo (11).

2.7. Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”

Todos os micro-organismos isolados dos animais com mastite nos três grupos de estudo foram submetidos ao teste de sensibilidade microbiana “in vitro”, frente ao antimicrobiano de tratamento, respectivo de cada grupo: G1 = cefoperazona sódica (75µg), G2 = gentamicina (10µg) e G3 = ciprofloxacino (5µg).

2.8. Acompanhamento dos animais

Durante o tratamento ao longo dos dias de estudo, os animais foram monitorados quanto aos parâmetros fisiológicos, exame da glândula mamária e teste de Tamis (6).

2.9. Avaliação da cura clínica e cura bacteriológica

A cura clínica foi considerada nos animais que, ao final do tratamento intramamário, não apresentaram quaisquer alterações clínicas nos parâmetros fisiológicos gerais (temperatura, frequências cardíaca e respiratória, movimentos ruminais), na glândula mamária (edema, nódulos, hipertermia), tampouco nas características macroscópicas do leite (teste de Tamis). A cura bacteriológica foi considerada nos quartos mamários que não se obteve o reisolamento do mesmo micro-organismo identificado no M1.

2.10. Grupo controle negativo

Não foi formado grupo controle negativo, devido aos riscos das mastites clínicas, sem instituição de tratamento, visto que foram utilizados animais de terceiros.

2.11. Critérios de exclusão de animais

Foram excluídos animais que, no início ou ao longo do tratamento intramamário, apresentaram qualquer uma das seguintes condições: desenvolveram sinais sistêmicos de mastite (febre, taquicardia, taquipnéia, atonia ruminal, decúbito), não apresentaram sensibilidade “in vitro” ao fármaco do grupo antes do início do tratamento (parcialmente sensíveis ou resistentes), contraíram outras infecções que houvesse necessidade do uso de antimicrobianos por via parenteral, impossibilidade de qualquer tratamento e/ou colheita de leite segundo protocolo de estudo, isolamento de micro-organismos não convencionais e/ou usualmente não responsivos a terapia antimicrobiana (fungos, leveduras, algas).

2.12. Tratamento estatístico dos resultados

Foram comparados os diferentes momentos (M1, M2, M3, M4, M5, M6), segundo a efetividade de cura bacteriológica do produto, utilizando o teste bilateral ou de Qui-quadrado (Teste de McNemar), considerando significância estatística para valores de $P < 0,01$. Para a definição do universo amostral (n) para efeito de comparação entre os grupos de antimicrobianos foram necessários, no mínimo, dez animais com mastite (segundo os itens 4.2 a 4.4), adotando efetividade “in vitro” de no mínimo 80% de cada fármaco e erro estatístico de 1% (12). Para tanto, a efetividade “in vitro” de $\geq 80\%$ de antimicrobiano testado foi embasada em levantamento retrospectivo destes fármacos em dados do Serviço de Diagnóstico de Mastite em Animais da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP (Tabelas 1, 2 e 3).

Tabela 1. Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, pelo método de difusão com discos, em diferentes linhagens bacterianas isoladas de vacas com mastite, frente à cefoperazona sódica. Botucatu, SP, 2008 a 2012*.

Sensibilidade	Sensível	Parcialmente sensível	Resistente
Micro-organismo	nº linhagens/nº total (%)	nº linhagens/nº total (%)	nº linhagens/nº total (%)
<i>Corynebacterium</i> sp.	29/29 (100)	0	0
<i>S. aureus</i>	22/32 (68,7)	7/32 (21,8)	3/32 (9,3)
<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	18/18 (100)	0	0
<i>Streptococcus</i> spp.	13/16 (81,3)	3/16 (18,7)	0
<i>Staphylococcus</i> spp.	7/10 (70)	3/10 (30)	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	6/6 (100)	0	0
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	6/6 (100)	0	0
<i>Staphylococcus</i> beta hemolítico	4/10 (28,5)	5/10 (64,3)	1/10 (7,2)
<i>T. pyogenes</i>	2/2 (100)	0	0
<i>Edwardsiella tarda</i>	1/1 (100)	0	0
<i>Escherichia coli</i>	1/1 (100)	0	0
<i>Micrococcus</i> sp.	1/1 (100)	0	0
<i>Staphylococcus intermedius</i>	1/1 (100)	0	0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1/1 (100)	0	0
<i>Streptococcus</i> beta hemolítico	1/1 (100)	0	0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1/1 (100)	0	0
Total	114/136 (83,8)	18/136 (13,3)	4/136 (2,9)

T. pyogenes = *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes*

S. aureus = *Staphylococcus aureus*

* Fonte = Serviço de Diagnóstico de Mastite em Animais – Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais – FMVZ-UNESP/Botucatu, SP

ATCC = American Type Culture Collection

Tabela 2. Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, pelo método de difusão com discos, em diferentes linhagens bacterianas isoladas de vacas com mastite, frente à gentamicina. Botucatu, SP, 2008 a 2012*.

Sensibilidade	Sensível	Parcialmente sensível	Resistente
Micro-organismo	nº linhagens/nº total (%)	nº linhagens/nº total (%)	nº linhagens/nº total (%)
<i>Staphylococcus beta hemolítico</i>	57/63 (90,4)	3/63 (4,8)	3/63 (4,8)
<i>Staphylococcus aureus</i>	37/40 (92,5)	2/40 (5,0)	1/40 (2,5)
<i>Corynebacterium sp.</i>	29/29 (100)	0	0
<i>Staphylococcus hyicus</i>	11/14 (78,6)	1/14 (7,1)	2/14 (14,3)
<i>Staphylococcus spp.</i>	11/14 (78,6)	1/14 (7,1)	2/14 (14,3)
<i>Streptococcus spp.</i>	7/13 (53,8)	0	6/13 (46,2)
<i>Streptococcus alfa hemolítico</i>	9/12 (75,0)	1/12 (8,3)	2/12 (16,7)
<i>Escherichia coli</i>	6/6 (100)	0	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	4/4 (100)	0	0
<i>T. pyogenes</i>	3/6 (50)	1/6 (16,6)	2/6 (33,4)
<i>Edwardsiella tarda</i>	2/2 (100)	0	0
<i>Nocardia sp.</i>	2/2 (100)	0	0
<i>Pasteurella multocida</i>	2/2 (100)	0	0
<i>Staphylococcus intermedius</i>	1/1 (100)	0	0
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1/3 (33,3)	0	2/3 (66,7)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	1/1 (100)	0	0
Total	183/212 (86,3)	9/212 (4,3)	20/212 (9,4)

T. pyogenes = *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes*

* Fonte = Serviço de Diagnóstico de Mastite em Animais – Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais – FMVZ-UNESP/Botucatu, SP

ATCC = American Type Culture Collection

Tabela 3. Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, pelo método de difusão com discos, em diferentes linhagens bacterianas isoladas de vacas com mastite, frente ao ciprofloxacino. Botucatu, SP, 2008 a 2012*.

Sensibilidade	Sensível	Parcialmente sensível	Resistente
Micro-organismo	nº linhagens/nº total (%)	nº linhagens/nº total (%)	nº linhagens/nº total (%)
<i>Streptococcus</i> spp.	36/43 (83,7)	4/43 (9,3)	3/43 (7,0)
<i>Staphylococcus</i> spp.	36/37 (97,3)	0	1/37 (2,7)
<i>Corynebacterium</i> sp.	29/29 (100)	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	12/24 (50)	9/24 (37,5)	3/24 (12,5)
<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	12/18 (66,7)	6/18 (33,3)	0
<i>Escherichia coli</i>	4/5 (80)	0	1/5 (20)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	4/4 (100)	0	0
<i>T. pyogenes</i>	1/1 (100)	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	1/3 (33,3)	1/3 (33,3)	1/3 (33,3)
<i>Micrococcus</i> spp.	1/1 (100)	0	0
<i>Nocardia</i> sp.	1/1 (100)	0	0
<i>Staphylococcus hyicus</i>	1/5 (20,0)	2/5 (40,0)	2/5 (40,0)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1/1 (100)	0	0
<i>Streptococcus</i> beta hemolítico	1/1 (100)	0	0
<i>E. coli</i> ATCC 15221	1/1 (100)	0	0
Total	141/174 (81,1)	22/174 (12,6)	11/174 (6,3)

T. pyogenes = *Trueperella* (*Arcanobacterium*) *pyogenes*

* Fonte = Serviço de Diagnóstico de Mastite em Animais – Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais – FMVZ-UNESP/Botucatu, SP
ATCC = American Type Culture Collection

3. RESULTADOS

Para a formação dos três grupos de tratamento, constituídos de dez animais por grupo, foram utilizados 54 animais, dos quais 22 para o grupo de tratamento com cefoperazona sódica, 19 para o grupo de gentamicina e 13 para o ciprofloxacino. Desta forma, ao longo da constituição dos grupos, foram excluídos 24 animais, principalmente cujos isolados foram parcialmente sensíveis ou resistentes no perfil de sensibilidade microbiana “in vitro” antes do tratamento (M1), que apresentaram isolamento de micro-organismos não convencionais de mastite (fungos, algas e certos actinomicetos) ou, com menor frequência, que não foi possível a colheita de material em algum dos momentos de acompanhamento do animal ou que desenvolveram sinais de mastite clínica sistêmica.

O Quadro 1 apresenta os micro-organismos causadores de mastites em cada animal, dentro de cada grupo de antimicrobiano constituído para o tratamento intramamário, em vacas com mastite clínica, naturalmente infectadas.

Quadro 1. Micro-organismos isolados, em cultura pura ou em associação, em 30 vacas com mastite clínica, naturalmente infectadas, segundo três grupos de tratamento antimicrobiano por via intramamária. Botucatu, SP, 2010 a 2011.

GRUPO ANIMAL	CEFOPERAZONA SÓDICA (G1)	GENTAMICINA (G2)	CIPROFLOXACINO (G3)
1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Corynebacterium bovis</i>
2	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
3	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
4	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico <i>Trueperella</i> (<i>Arcanobacterium</i>) <i>pyogenes</i>	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico
5	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico
6	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus aureus</i>
7	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico
8	<i>Staphylococcus intermedius</i>	<i>Staphylococcus hyicus</i>	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico <i>Staphylococcus aureus</i>
9	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
10	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus aureus</i>

Foi observado predomínio dos gêneros *Streptococcus* e *Staphylococcus* nos três grupos de estudo, seguido em menor frequência de enterobactérias (*Escherichia coli* e *Edwardsiella tarda*) e actinomicetos [*Corynebacterium bovis* e *Trueperella (Arcanobacterium) piogenes*].

Os Quadros 2, 3 e 4 sumarizam os resultados da cura clínica e bacteriológica nos três grupos de tratamento intramamário (convencional e estendido), utilizando a cefoperazona sódica, gentamicina e ciprofloxacino, em vacas com mastite clínica naturalmente infectadas.

Quadro 2. Cura clínica e bacteriológica em dez vacas com mastite por diferentes micro-organismos, utilizando a cefoperazona sódica no tratamento convencional (3 aplicações do anti-mastítico) e no estendido (6 aplicações do anti-mastítico). Botucatu, SP, 2010 a 2011.

Animal	Isolamento - M 1	Tratamento convencional (cura clínica)	Isolamento - M4 (cura bacteriológica)	Tratamento estendido (cura clínica)	Isolamento - M7 (cura bacteriológica)
1	<i>S. agalactiae</i>	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
2	<i>S. agalactiae</i>	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
3	<i>Staphylococcus</i> spp.	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
4	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico <i>T. pyogenes</i>	insucesso	Negativo	sucesso	Negativo
5	<i>Edwardsiella tarda</i>	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
6	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	insucesso	Negativo	sucesso	Negativo
7	<i>Streptococcus</i> spp.	insucesso	Negativo	sucesso	Negativo
8	<i>S. intermedius</i>	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
9	<i>S. aureus</i>	insucesso	Negativo	insucesso	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>Streptococcus</i> spp.
10	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	insucesso	Negativo	sucesso	Negativo

S. agalactiae = *Streptococcus agalactiae*

T. pyogenes = *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes*

S. intermedius = *Staphylococcus intermedius*

S. aureus = *Staphylococcus aureus*

E. coli = *Escherichia coli*

Quadro 3. Cura clínica e bacteriológica em dez vacas com mastite por diferentes micro-organismos, utilizando a gentamicina no tratamento convencional (3 aplicações do anti-mastítico) e no estendido (6 aplicações do anti-mastítico). Botucatu, SP, 2010 a 2011.

Animal	Isolamento - M 1	Tratamento convencional (cura clínica)	Isolamento - M4 (cura bacteriológica)	Tratamento estendido (cura clínica)	Isolamento – M7 (cura bacteriológica)
1	<i>Streptococcus</i> spp.	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
2	<i>Escherichia coli</i>	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
3	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
4	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	insucesso	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	sucesso	Negativo
5	<i>Streptococcus</i> spp	insucesso	Negativo	sucesso	Negativo
6	<i>Streptococcus</i> spp.	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
7	<i>Streptococcus</i> spp.	insucesso	Negativo	sucesso	Negativo
8	<i>Staphylococcus hyicus</i>	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
9	<i>Streptococcus</i> spp	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
10	<i>Streptococcus</i> spp	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo

Quadro 4. Cura clínica e bacteriológica em dez vacas com mastite por diferentes micro-organismos, utilizando o ciprofloxacino no tratamento convencional (3 aplicações do anti-mastítico) e no estendido (6 aplicações do anti-mastítico). Botucatu, SP, 2010 a 2011.

Animal	Isolamento - M 1	Tratamento convencional (cura clínica)	Isolamento - M4 (cura bacteriológica)	Tratamento estendido (cura clínica)	Isolamento – M7 (cura bacteriológica)
1	<i>Corynebacterium bovis</i>	sucesso	<i>Corynebacterium bovis</i>	sucesso	Negativo
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	insucesso	Negativo	sucesso	Negativo
3	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	insucesso	Negativo	insucesso	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
4	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
5	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	insucesso	Negativo	insucesso	Negativo
6	<i>Staphylococcus aureus</i>	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
7	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo
8	<i>Streptococcus</i> alfa hemolítico <i>Staphylococcus aureus</i>	insucesso	Negativo	sucesso	Negativo
9	<i>Streptococcus</i> spp.	insucesso	Negativo	sucesso	Negativo
10	<i>Staphylococcus aureus</i>	sucesso	Negativo	sucesso	Negativo

As Tabelas 4 e 5 apresentam o tratamento estatístico dos dados de cura clínica e bacteriológica das vacas com mastite, segundo os três grupos de antimicrobianos.

Tabela 4. Eficácia da cura clínica do tratamento intramamário (convencional e estendido) de vacas com mastite clínica, utilizando cefoperazona sódica (G1), gentamicina (G2) e ciprofloxacino (G3). Botucatu, SP, 2010 a 2011.

Grupo	Tratamento	
	Convencional	Estendido
	% (n)	% (n)
Cefoperazona Sódica ¹	50 (5)	90 (9)
Gentamicina ²	70 (7)	100 (10)
Ciprofloxacino ³	50 (5)	80 (8)

(n) = número de animais do grupo correspondente.

1 = Estatística: valor de $P=0,1336$ (Teste de χ^2 de McNemar).

2 = Estatística: valor de $P=0,2482$ (Teste de χ^2 de McNemar).

3 = Estatística: valor de $P=0,2482$ (Teste de χ^2 de McNemar).

Não foi observada diferença estatística significativa ($P>0,01$) em nenhum grupo de fármaco, quando se comparou o tratamento convencional e o tratamento estendido dentro do mesmo grupo. No entanto, no grupo tratado com cefoperazona sódica foram observados cinco animais (50%) que apresentaram cura clínica após o tratamento convencional e nove animais (90%) após o tratamento estendido. Depois de efetuado o tratamento convencional no grupo da gentamicina, sete animais (70%) apresentaram cura clínica e a totalidade do grupo (100%) se mostrou curado após o tratamento estendido. O grupo tratado com ciprofloxacino apresentou cinco animais (50%) com cura clínica após o tratamento convencional e oito animais (80%) apresentaram cura clínica após o tratamento estendido.

Tabela 5. Eficácia de cura bacteriológica do tratamento intramamário (convencional e estendido) de vacas com mastite clínica, utilizando cefoperazona sódica (G1), gentamicina (G2) e ciprofloxacino (G3). Botucatu, SP, 2010 a 2011.

Grupo	Tratamento	
	Convencional	Estendido
	% (n)	% (n)
Cefoperazona Sódica ¹	100 (10)	100 (10)
Gentamicina ²	90 (9)	100 (10)
Ciprofloxacino ³	90 (9)	100 (10)

(n) = número de animais do grupo correspondente.

1 = Estatística: valor de $P=1,0000$ (Teste de χ^2 de McNemar).

2 = Estatística: valor de $P=1,0000$ (Teste de χ^2 de McNemar).

3 = Estatística: valor de $P=0,4795$ (Teste de χ^2 de McNemar).

A eficácia da cura bacteriológica foi observada nos três grupos, sem diferença estatística significativa ($P>0,01$) em nenhum dos grupos quando o tratamento convencional foi comparado com o tratamento estendido. Apenas um animal tratado com gentamicina e outro com ciprofloxacino apresentaram reisolamento do agente causal inicial da mastite clínica, respectivamente, *Streptococcus* alfa hemolítico e *Corynebacterium bovis*.

4. DISCUSSÃO

O tratamento com antimicrobianos é um dos principais procedimentos na abordagem da mastite em animais domésticos (7; 9). Existe consenso na literatura especializada,

internacional e nacional, que todos os casos de mastite clínica, com sinais sistêmicos ou restritos à glândula mamária, devem ser imediatamente tratados (6; 9; 10; 13).

Para o tratamento da mastite clínica sem sinais sistêmicos em vacas se recomenda, em geral, de 3 a 5 aplicações do anti-mastítico por via intramamária, a cada 12 a 24 horas, dependendo do princípio ativo do antimicrobiano (9; 10). Em condições ideais, o tratamento destes casos deveria ser instituído precedido de testes “in vitro” de sensibilidade microbiana. No entanto, devido as dificuldades práticas e de custo inerentes ao envio de leite para os laboratórios, ou mesmo pela emergência de certos casos, na prática, a escolha do antimicrobiano em situações de campo recai na experiência do profissional em tratamentos anteriores, no apelo comercial de certos produtos, ou com base no perfil de sensibilidade “in vitro” realizado em outra oportunidade no mesmo plantel (7).

O antimicrobiano ideal para o tratamento da mastite bovina deveria apresentar várias características consideradas desejáveis, como amplo espectro, ação bactericida, estabilidade, atingir altas concentrações terapêuticas no tecido mamário, boa ação na presença de material purulento, atóxico para o tecido glandular e neonatos, ausência ou baixo resíduo no leite, baixo custo, disponibilidade no mercado, bem como outras propriedades químicas como pH levemente alcalino e baixa ligação às proteínas e gordura. No entanto, poucos antimicrobianos disponíveis atualmente no mercado reúnem a maioria destas características (7; 9).

No Brasil, existem aproximadamente 25 princípios ativos diferentes de anti-mastíticos disponíveis comercialmente para o tratamento intramamário, na lactação, da mastite em vacas (7; 9). O grande número de ativos de anti-mastíticos no mercado brasileiro permite boa alternativa de opções para os técnicos e produtores para o tratamento da mastite em vacas, minimizando os efeitos de resistência dos isolados, contanto que o tratamento fosse instituído com respaldo no perfil “in vitro” de sensibilidade aos antimicrobianos (7). O número excessivo de anti-mastíticos disponíveis comercialmente no Brasil pode ser reflexo da exploração abusiva destes antimicrobianos no mercado nacional, e gera certa confusão na escolha do fármaco para o tratamento. Ainda, a grande proximidade de espectro de ação de certos ativos comerciais de anti-mastíticos no mercado nacional (como as cefalosporinas) com nomes comerciais diferentes (nome fantasia), pode gerar a falsa impressão ao produtor de estar utilizando antimicrobianos completamente distintos no plantel, fato que seria salutar na abordagem terapêutica da mastite, evitando o uso sistemático ou repetido de um mesmo grupamento de fármaco por períodos prolongados no rebanho.

No presente estudo foi investigada a ação da cefoperazona sódica, gentamicina e ciprofloxacino por via intramamária em casos de mastite clínica em vacas, que se constituem em representantes, respectivamente, de cefalosporinas, aminoglicosídeos e fluorquinolonas, considerados os principais grupamentos de antimicrobianos em uso no Brasil no tratamento intramamário de vacas com mastite na lactação (7; 9; 10).

Devido ao grande número de tratamentos de vacas com mastite realizados no Brasil sem o respaldo da cultura microbiológica e de testes “in vitro” de sensibilidade microbiana, a resolução clínica (cura clínica) dos casos é um parâmetro prático adotado na rotina das propriedades para avaliar a eficácia do tratamento. Nestes animais, se considera que a resolução favorável dos casos ocorre quando após 2 ou 3 aplicações do antimicrobiano por via intramamária, se observa regressão da hiperemia e do edema do úbere e tetos, além da normalização do aspecto do leite (7).

Com base no teste de sensibilidade microbiana “in vitro” (100% de sensibilidade dos isolados ao fármaco do grupo), foi obtido nos 30 animais estudados à cura clínica em 50% das vacas utilizando a cefoperazona sódica, 70% dos animais com a gentamicina e 50% dos casos para a ciprofloxacino no tratamento convencional, enquanto no tratamento estendido foi obtida a cura clínica para os mesmos animais e fármacos em, respectivamente, 90%, 100% e 80%. Utilizando outro antimicrobiano do grupo das cefalosporinas (cefacetril), Auginer e

Austin (13) obtiveram valor similar, com 82% de cura clínica na terapia intramamária de vacas com mastite clínica. Os resultados obtidos no presente estudo indicam que é possível utilizar a cura clínica de vacas como parâmetro prático de resolução dos casos de mastite em vacas, sem sinais sistêmicos, tratadas por via intramamária, contanto que a instituição do tratamento (convencional ou estendido) tenha sido respaldada em testes “in vitro” de sensibilidade microbiana.

O cultivo microbiológico do leite é o melhor parâmetro de avaliação do tratamento no decorrer da lactação de casos de mastite em vacas, pois permite atestar a ausência de isolamento do agente causal no leite, depois de encerrado o tratamento (cura bacteriológica) [7]. Nos 30 animais tratados no presente estudo, foi obtida a cura bacteriológica utilizando a cefoperazona sódica em 100% dos animais e em 90% dos casos com a gentamicina e ciprofloxacino no tratamento convencional, enquanto para os mesmos animais e fármacos, foi obtida cura bacteriológica em, respectivamente, 90%, 100% e 90% no tratamento estendido. Não foi observada diferença estatisticamente significativa ($P > 0,01$) na cura bacteriológica entre os tratamentos convencional e estendido nos 30 animais supracitados. No Rio de Janeiro, Langenegger et al. (14) avaliaram a eficiência terapêutica de outra cefalosporina (cefacetil) em 47 quartos mamários com mastite subclínica, e assinalaram resultados semelhantes, obtendo 74% de cura bacteriológica nos quartos com infecções por *Staphylococcus* sp. Langoni et al. (15), no estado de São Paulo, realizaram o tratamento intramamário de sete quartos mamários de vacas com mastite clínica utilizando fluorquinolona de segunda geração (enrofloxacin) e observaram cura bacteriológica em seis quartos (85,7%). Costa et al. (16), no estado de São Paulo obtiveram, obtiveram êxito na cura clínica de, respectivamente, 81,82% e 90,48% de 18 casos de mastite (clínica) em vacas causadas por *Staphylococcus* sp e 19 por *Streptococcus* sp, utilizando derivados β -lactâmicos.

As nuances entre os percentuais de efetividade de cura clínica e/ou bacteriológica dos fármacos nos diferentes estudos podem encontrar reflexo na ação intrínseca de cada fármaco frente aos isolados, na presença de linhagens resistentes - estafilococos produtores de β -lactamases -, assim como no tratamento de micro-organismos não responsivos aos antimicrobianos convencionais (fungos, algas e certos actinomicetos).

No presente estudo, houve incremento na cura bacteriológica de somente 10% (animal 4) do tratamento convencional comparado ao estendido no grupo da gentamicina. Nos demais, foi observada à mesma taxa de cura (90%) para o ciprofloxacino e decréscimo em 10% (animal 9) da cura bacteriológica no tratamento estendido, utilizando a cefoperazona sódica. Neste último grupo (G1), o não isolamento de *S. aureus* no momento 4 (tratamento convencional) e reisolamento no momento 7 (tratamento estendido), poderia encontrar justificativa na eliminação intermitente de *S. aureus* pela glândula mamária ou pela característica intracelular da bactéria, que dificultam o tratamento no decorrer da lactação (6; 10; 17).

Nas 30 vacas com mastite clínica tratadas por via intramamária com três fármacos distintos, foi observada cura clínica entre 50% a 70% dos casos quando submetidos ao tratamento convencional, enquanto a cura bacteriológica (com os mesmos animais e fármacos) varia de 90% a 100%. Tal disparidade entre a cura clínica e bacteriológica poderia ser justificada pelo fato de que apesar dos três fármacos apresentarem efetividade na cura bacteriológica, o processo inflamatório e, conseqüentemente, os sinais clínicos mamários ainda persistem por sete dias ou mais, depois de encerrado o tratamento, mesmo com a inativação do agente causal da mastite (10; 18)

No presente estudo foi observado déficit de somente 10% entre a sensibilidade “in vitro” dos isolados e a cura bacteriológica após o tratamento intramamário “in vivo”, tanto na forma convencional como na estendida. Em contraste, Apparao et al. (19) nos EUA, compararam o perfil de sensibilidade microbiana e o tratamento “in vivo” com pirlimicina de

132 vacas (178 glândulas mamárias) com mastite subclínica causadas por 194 linhagens bacterianas, e não observaram melhora significativa nos índices de cura nos isolados sensíveis “in vitro” ao fármaco. Apesar da divergência dos autores sobre a eficácia do perfil de sensibilidade “in vitro” como base para o tratamento intramamário de vacas com mastite (7; 9; 10; 17; 20), os achados do presente estudo mostraram concordância entre a sensibilidade “in vitro” de bactérias convencionais de mastite, obtidas de vacas naturalmente infectadas, e reforça a indicação do teste de sensibilidade microbiana “in vitro” previamente a instituição da terapia, visando o uso racional de antimicrobianos no tratamento da mastite clínica bovina.

No tratamento da mastite, os isolados sensíveis “in vitro” cuja cura bacteriológica não é obtida “in vivo” depois do tratamento, poderiam ser justificados pela presença de outros fatores que concorrem para a resolução dos processos de mastite – além da ação dos antimicrobianos –, como a viabilidade intracelular de bactérias, formação de microabscessos ou (pio)granulomas mamários, produção de enzimas (β -lactamases) e excesso de material purulento, que dificultam a ação de certos antimicrobianos no foco infeccioso na glândula mamária (6; 7; 9; 10).

Para a formação dos três grupos de dez animais para o tratamento, com cada fármaco, foi necessário utilizar, ao todo, 54 animais. Desta forma, foram excluídos 24 animais, dos quais em cerca de 90% dos casos foram retirados dos grupos de estudo, posto que apresentavam isolados resistentes ou parcialmente sensíveis ao fármaco do grupo, ou eram micro-organismos não responsivos aos tratamentos com antimicrobianos convencionais por via intramamária - como fungos, algas e certos actinomicetos - quesitos considerados de descarte nos critérios de exclusão do presente estudo. Esta conduta na formação dos grupos, reforça a importância do teste de sensibilidade microbiana “in vitro” previamente a instituição do tratamento intramamário dos casos clínicos de mastite em vacas, visto que, dentre os 24 animais excluídos supracitados com isolados não sensíveis aos fármacos, ou micro-organismos não convencionais na casuística de mastite, certamente resultariam em insucesso terapêutico em condições de campo. Este resultado salienta, também, a importância do exame microbiológico antes do início do tratamento dos casos de mastite bovina, que possibilita nortear as ações de controle/profilaxia da mastite, distintas para micro-organismos de origem contagiosa e ambiental (10; 17). A lactocultura permite, reconhecer micro-organismos não convencionais de mastite, ou não responsivos aos tratamentos intramamários e/ou parenterais em casos de mastite bovina ao longo da lactação, cuja recomendação seria a ablação química dos quartos, ou mesmo o descarte precoce dos animais (7).

A terapia estendida é uma modalidade de tratamento da mastite em vacas indicada no decorrer da lactação, realizada com 6 a 8 aplicações de antimicrobianos por via intramamária, que tem mostrado incremento nas taxas de cura em certos casos de mastite (10). No presente estudo, não foi obtida diferença estatisticamente significativa ($P > 0,01$) na cura bacteriológica comparando o tratamento convencional e o estendido, para os três fármacos utilizados em animais com mastite clínica. Em estudo similar, Kasravi et al. (21) no Irã, compararam o efeito do tratamento convencional e do estendido em vacas com mastite subclínica utilizando a cefquinoma. Foram constituídos três grupos de animais, dos quais o grupo 1 (25 vacas e 52 quartos) foi tratado com tratamento convencional (três aplicações a cada 16 horas), o grupo 2 (26 vacas e 58 quartos) com tratamento estendido (seis aplicações a cada 16 horas) e o terceiro grupo não tratado (22 vacas e 40 quartos). Os principais agentes isolados foram estafilococos coagulase negativos, estreptococos e coliformes. A cura bacteriológica nos três grupos foi, respectivamente, 84,61%, 91,37% e 20%. Não foi observada diferença estatística significativa entre o tratamento convencional e estendido. Em contraste, Roy et al. (22), no Canadá, investigaram a eficácia da terapia estendida em vacas cronicamente infectadas por *S. aureus* utilizando a cefapirina sódica. Foram tratadas 31 vacas cronicamente infectadas provenientes de 14 rebanhos selecionados aleatoriamente, tratadas por 5 dias consecutivos, a

cada 12 horas, comparados a outro grupo de 30 animais não tratados. A cultura microbiológica foi realizada com 10, 24 e 31 dias após o encerramento do tratamento. Foram observadas taxas de cura nos grupos tratados e controle de, respectivamente, 25,8% e 3,3% ($P=0,013$), mostrando incremento nas taxas de cura do tratamento estendido em vacas com infecções persistentes por *S. aureus*.

Tais achados sinalizam que a terapia mamária estendida deve ser reservada para situações específicas de tratamento – como infecções recorrentes por *S. aureus* ou por agentes não convencionais de mastite, que se opta por tratar ao longo da lactação (7) – em virtude do aumento no manejo na propriedade, devido ao maior número de aplicações mamárias por animal, bem como pelo custo adicional dos anti-mastíticos.

5. CONCLUSÕES

- ✓ As taxas de cura clínica dos animais acima de 90% utilizando a cefoperazona sódica, gentamicina ou ciprofloxacino indicam que estes fármacos se constituem em ótimas alternativas para o tratamento da mastite clínica em vacas na lactação;
- ✓ Com base no perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, previamente ao tratamento intramamário, foi obtida entre 90 a 100% de cura bacteriológica nos animais utilizando os três fármacos, reforçando a importância de instituição do tratamento da mastite clínica em vacas com respaldo em testes de sensibilidade microbiana “in vitro”;
- ✓ Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as taxas de cura bacteriológica comparando o tratamento intramamário convencional e o estendido para os três grupos de antimicrobianos, em vacas com mastite clínica, naturalmente infectadas, sinalizando que a terapia estendida deve ser reservada para casos específicos de mastite bovina.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LANGONI, H. Agentes emergentes na etiologia da mastite. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.19, p.238-240, 1997.
2. COSTA, E. O.; GARINO, F.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R.; SILVA, J.A.B.; WATANABE, E.T.; VALLE, C.R. Estudo da etiologia das mastites bovinas nas sete principais bacias leiteiras do Estado de São Paulo. **Revista do Núcleo de Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, n.4, p.6-13, 2000.
3. NADER FILHO, A.; MANGERONA, A.C.S.; MOURA, E.S. Eficácia da associação sinérgica de betalactâmicos em suspensão oleosa no tratamento intramamário da mastite de vacas em lactação. **Revista do Núcleo de Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, n.1, p.20-22, 2002.
4. COSTA, E.O.; GARINO, JR.F.; PADOVESE, L.; SANTOS, E.; Avaliação da eficácia de tratamentos de mastite clínica em vacas em lactação. **Revista do Núcleo de Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, n.1, p. 3-9, 2003.
5. FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. Lemos Editorial: São Paulo, 2000. 175p.
6. RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C. et al. **Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. 10. ed. London: W. B. Saunders, 2007.
7. RIBEIRO, M.G. Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. In: ANDRADE, S.F. (Eds). **Manual de Terapêutica Veterinária**. 3.ed. Roca: São Paulo, p.759-771, 2008.

8. LANGONI, H.; TONI, F.B.; CABRAL, K.G.; CAVALIERO, M. J. Tratamento da mastite bovina com associação ampicilina + cloxacilina. **Revista do Núcleo de Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, n. 3, p.21-23, 1999.
9. COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: Spinosa, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. Cap. 42, p. 422-433.
10. SANTOS, M.V., FONSECA, L.F.L. (Eds.) **Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade do Leite**. São Paulo: Manole, 2007. 314p.
11. QUINN, P.J., MARKEY, B.K, CARTER, M.E., DONNELLY, W.J., LEONARD, F.C. In: **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**.1 ed., São Paulo: Artmed, 2005, 512p.
12. TRIOLA, M.F. **Introdução à Estatística**. 9.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 682p.
13. AUGINER, S. P. M.; AUSTIN, F. H. A study of efficacy of intramammary antibiotics in the treatment of clinical mastites. *British Veterinary Journal*, v.143, p.88-90, 1987.
14. LANGENEGGER, J.; FIGUREDIO, M. P.; REZENDE, E. F. Eficácia terapêutica do cefacetil frente aos micro-organismos dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* isolados de mastites subclínicas. *Revista Veterinária*, n.30, p.24-27, 1986.
15. LANGONI, H.; PULGA, M.E.; DOMINGUES, P.F.; SILVA, A.V. Eficácia da enrofloxacin no tratamento de casos de mastite bovina de origem ambiental em propriedade leiteira. **Revista do Núcleo de Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, v.4, n.1, p.19-22, 2001.
16. COSTA, E.O.; GARINO, JR.F.; PADOVESE, L.; SANTOS, E.; Avaliação da eficácia de tratamentos de mastite clínica em vacas em lactação. **Revista do Núcleo de Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, n.1, p. 3-9, 2003.
17. PHILPOT, W. N. & NICKERSON, S. C. **Vencendo a Luta Contra a Mastite** Ed. Milkbuzz, Brasil. p. 6 – 13, 2002.
18. SCHALM, O. W.; CARROL, E.; JAIN, N. C. **Bovine mastitis**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1971. 360 p.
19. APPARAO, D.; OLIVEIRA, L.; RUEGG, P.L. Relationship between results of in vitro susceptibility tests and outcomes following treatment with pirlimycin hydrochloride in cows with subclinical mastitis associated with gram-positive pathogens. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, vol. 234, n.11, p.1437-46, 2009.
20. HOE, F.G.; RUEGG, P.L. Relationship between antimicrobial susceptibility of clinical mastitis pathogens and treatment outcome in cows. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.227, n.9, p.1461-1468, 2005.
21. KASRAVI, R.; BOLOURCHI, M.; FARZANEH, N.; SEIFI, H.A.; BARIN, A.; HOVARESHTI, P.; GHARAGOZLOU, F. Efficacy of conventional and extended intramammary treatment of persistent sub-clinical mastitis with cefquinome in lactating dairy cows. *Trop. Anim. Health Prod.*, v.43, n.6, p. 1203-10, 2011.
22. ROY, J.P.; DESCÔTEAUX, L.; DUTREMBLAY, D.; BEAUDRY, F.; ELSENER, J. Efficacy of a 5-day extended therapy program during lactation with cephalixin sodium in dairy cows chronically infected with *Staphylococcus aureus*. **Can. Vet. J.**, v.50, n.12, p.1257-62, 2009.