

ORLANDO RAPHAEL LOPASSO JUNIOR

AVALIAÇÃO DO ANTIBIOGRAMA GLOBAL, COMO
MÉTODO DE SELEÇÃO DE MEDICAMENTOS, PARA O
CONTROLE DA MAMITE BOVINA

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial
para obtenção do grau de
mestre, em Medicina
Veterinária.

Área: Medicina Veterinária
Preventiva

Orientador: José Britto
Figueiredo

BELO HORIZONTE
UFMG - ESCOLA DE VETERINÁRIA
1996
U. F. M. G. - BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA



103749605

NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA

91/103
103

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

22/02/96

1037496-05

11/3/96

L864a Lopasso Junior, Orlando Raphael - 1964

Avaliação do antibiograma global,
como método de seleção de medicamentos
para controle da mamite bovina / Orlando
Raphael Lopasso Junior, Belo Horizonte:
UFMG - Escola de Veterinária, 1996

66 p.: il.


Dissertação (Mestrado)

1. Bovino - Doenças - Teses. 2.
Mastite - Teses. 3. Testes de Sensibilidade
Bacteriana - Teses. I. Título.

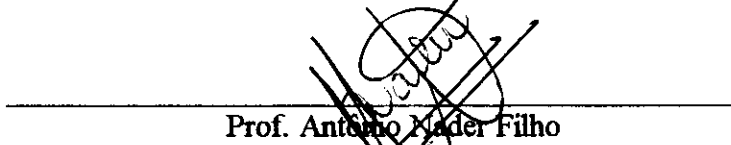
CDD- 636.089 69



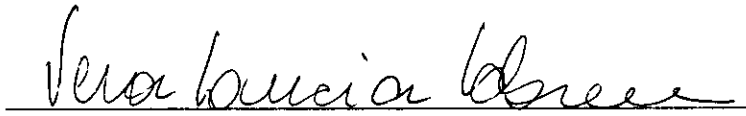
Dissertação defendida e aprovada em 29/05/1996, pela Comissão Examinadora constituída por:


Prof. José Britto Figueiredo
Orientador


Prof. Midelverson Oliveira


Prof. Antônio Nader Filho


Prof. José Eurico Faria


Profa. Vera Lúcia Viegas de Abreu



**À IZABELA, ESPOSA E
AMIGA, E AO LUCAS,
RECÉM-CHEGADO AO
MUNDO, POR TUDO QUE
ME PROPORCIONAM**

AGRADECIMENTOS

Ao prof. José Britto Figueiredo, pelos ensinamentos, paciência, compreensão, exemplo e acima de tudo pela amizade. Foi um privilégio tê-lo como orientador.

Aos professores Antônio Náder Filho, Midelverson Oliveira, Vera Lúcia Viegas Abreu e José Eurico Faria pela valiosa contribuição na feitura dessa dissertação.

Aos professores do mestrado que contribuíram muito para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos meus pais, Orlando Raphael Lopasso e Eise Ferraz Lopasso, pelo exemplo e grande apoio.

Ao amigo Zé Eurico, pelas idéias, sugestões, apoio e por me mostrar Viçosa.

À Deborah, grande amiga de todas as horas, pela força, apoio moral, sushis, cafês, bate-papos, xadrez, cartas, burros, cervejas e outras *coisitas más...*

Ao departamento de Veterinária da UFV na figura de sua chefe profa. Marlene Isabel V. Villoria pelo apoio logístico e cessão dos laboratório de microbiologia

Aos funcionários do setor de Medicina Veterinária Preventiva do departamento de Veterinária da UFV, Renato, Elcio, Luiz Carlos, Monteiro, Batalha, Marquinho e Divino pela ajuda e convívio durante as análises laboratoriais.

Aos professores Ivan Barbosa Machado Sampaio e Enrico Antônio Colosimo pela valiosa contribuição no entendimento da estatística.

Aos funcionários da Biblioteca da Escola de Veterinária da UFMG em especial a Rosilene pela grande auxílio.

À Dorinha e Chicão pela passagem do resumo para o inglês.

Aos micreiros Dr Mauro, Júlio César, Tânia e Fernanda pela utilização dos computadores.

Aos amigos da Pós e Departamento pelo convívio. Um carinho especial para com a turma do confinamento, companheiros de algumas batalhas e muita alegria.

Aos membros e funcionários do Colegiado dos Cursos de Pós-graduação pelo imprescindível apoio.

À Escola de Veterinária pela oportunidade de realização do curso.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Fatalmente esqueci alguém. Me desculpe, não é ingratidão. É falta de memória mesmo.

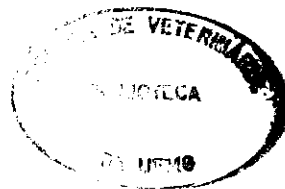


"Eu quase que nada sei, mas desconfio de muita coisa."

Guimarães Rosa

"De tudo ficaram três coisas: a certeza de que estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro."

Fernando Sabino



SUMÁRIO

	página
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE GRÁFICOS	15
RESUMO	17
SUMMARY	19
1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1. PRINCIPAIS AGENTES ETIOLÓGICOS	25
2.2. CONTAGEM GLOBAL DE CÉLULAS SOMÁTICAS	27
2.3. CONTROLE E TRATAMENTO	28
2.4. ANTIBIOGRAMA	29
2.4.1. Sensibilidade dos principais patógenos da mamite	30

	Página
2.5. MÉTODOS ALTERNATIVOS DE ANTIBIOGRAMA PARA MAMITE E INFLUÊNCIA DOS COMPONENTES DO LEITE	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. ÉPOCA E LOCAL DA EXECUÇÃO DO TRABALHO	35
3.2. ANIMAIS E MANEJO	35
3.3. SELEÇÃO E COLHEITA DE AMOSTRAS	36
3.4. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO	37
3.5. CONTAGEM GLOBAL DE CÉLULAS SOMÁTICAS	38
3.6. ANTIBIOGRAMAS	38
3.6.1. Leitura	40
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5. CONCLUSÕES	57
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE TABELAS

	Página
TAB. 1 - Sensibilidade de bactérias isoladas de casos de mamites bovinas, testadas pelo método de Kirby-Bauer, segundo vários autores.	31
TAB. 2 - Identificação presuntiva de patógenos, em amostras de leite oriundas de glândulas mamárias infectadas, em três fazendas situadas na região de Viçosa - MG, 1995.	49
TAB. 3 - Frequência de microrganismos sensíveis a antibacterianos, testados pelos métodos de Kirby-Bauer (KB), Ágar Sangue Direto (ASD), Cérebro Coração Direto (CCD), Ágar Sangue Incubado (ASI), Cérebro Coração Incubado (CCI), de amostras de leite oriundas de glândulas mamárias infectadas, em três fazendas situadas na região de Viçosa - MG, 1995.	51
TAB. 4 - Sensibilidade e especificidade dos métodos de antibiogramas globais propostos, considerando o método de BAUER et al (1966) como padrão, de amostras de leite oriundas de glândulas mamárias infectadas, em três fazendas situadas na região de Viçosa - MG, 1995.	52

Página

53

TAB. 5 - Influência das variáveis sobre a concordância entre as técnicas de antibiogramas com sementeiras enriquecidas e o método de BAUER et al (1966), calculada pelo índice Kappa, de amostras de leite oriundas de glândulas mamárias infectadas, em três fazendas situadas na região de Viçosa - MG, 1995.

54

TAB. 6 - Influência das variáveis na sensibilidade dos antibiogramas globais, realizados com sementeiras enriquecidas, considerando o método de BAUER et al (1966) como padrão, de amostras de leite oriundas de glândulas mamárias infectadas, em três fazendas situadas na região de Viçosa - MG, 1995.

55

TAB. 7 - Influência das variáveis na especificidade dos antibiogramas globais, realizados com sementeiras enriquecidas, considerando o método de BAUER et al (1966) como padrão, de amostras de leite oriundas de glândulas mamárias infectadas, em três fazendas situadas na região de Viçosa - MG, 1995.



LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Distribuição das amostras de leite de acordo com contagem global de células somáticas categorizadas em 3 faixas, oriundas de glândulas mamárias infectadas, em três fazendas situadas na região de Viçosa, 1995.

Página
50

RESUMO

Foram avaliados antibiogramas alternativos, denominados GLOBAIS, no controle da mamite bovina. Utilizou-se quatro variações metodológicas, com pequenas alterações entre si, todos comparados ao método de antibiograma clássico, proposto por BAUER et al (1966). Dois destes métodos utilizaram como inóculo, leite não enriquecido e foram denominados Ágar Sangue Direto (ASD) e Cérebro Coração Direto (CCD). Nos restantes, Ágar Sangue Incubado (ASI) e Cérebro Coração Incubado (CCI), foi usado inóculo enriquecido por incubação prévia do leite a 37°C por 15-18 horas. Os métodos diretos, ASD e CCD, apresentaram baixa taxa de crescimento. A incubação prévia do leite melhorou o desempenho dos antibiogramas propostos. A utilização das medidas de diâmetros indicadas para o método clássico apesar da sensibilidade baixa, manteve a especificidade alta, permitindo sua utilização como método de exclusão daqueles antibióticos para os quais os patógenos sejam resistentes. O isolamento de mais de uma bactéria por amostra refletiu em diminuição da sensibilidade

PALAVRAS-CHAVES: Mamite bovina - Antibioticoterapia - Antibiograma

SUMMARY

Alternative antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis control, referred to as TOTALS were evaluated. Four methods showing small variations were used and the results were compared with those obtained by the Kirby-Bauer antimicrobial susceptibility test. In two of these methods, referred to as Direct Blood Agar (DBA) and Direct Brain Heart (DBH), non-enriched milk was used as an inoculum. For the other testing methods - Incubated Blood Agar (IBA) and Incubated Brain Heart (IBH) - inoculum enriched by previous incubation of milk at 37° C for 15-18 hours was used. The direct methods - DBA and DBH - showed a low bacterial growth rate. Previous incubation of milk resulted in improved performance of the tests proposed. When zone diameter measurements as indicated for the classic testing procedure were used, sensitivity was low, yet specificity was high, thus permitting exclusion of those antibiotics to which the pathogens are resistant. Isolation of more than one bacterial species per sample resulted in diminished sensitivity.

KEY WORDS - Bovine Mastitis - Antibiotic therapy - Antimicrobial Susceptibility Test



1 INTRODUÇÃO

A mamite é o maior problema de saúde do rebanho leiteiro. É responsável por reduções na produção e alterações na composição e qualidade do leite (BALDASSI et al, 1991). Vem, há tempos, desafiando pesquisadores experimentados no mundo inteiro, mobilizando grandes investimentos, sendo mantida em constante prioridade sócio-econômica.

Foi considerada por DAVIDSON et al (1982) a maior responsável por perdas econômicas na pecuária leiteira. Admitindo-se perda de 10% na produção leiteira brasileira, índice observado por NADER FILHO et al (1983) em rebanhos de São Paulo, e considerando a produção de 14.484.414.000 litros no ano de 1991 (ANUÁRIO..., 1992), o Brasil deixou de produzir mais de um bilhão de litros de leite.

Para ser controlada requer medidas ligadas a higiene, manejo e tratamento, inclusive o preventivo, que devem ser aplicadas de forma conjunta para obtenção de melhores resultados. Segundo MATTHEWS et al (1992), a antibioticoterapia é importante componente dos programas de controle, seja a imediata ao diagnóstico dos casos clínicos durante a lactação ou a terapia programada para o início do período seco. A decisão de tratar vacas com mamite depende da análise dos custos de descarte do leite,

medicação, serviços laboratoriais, profissionais, repetições de tratamento quando necessário, analisados frente aos benefícios decorrentes da normalização da produção de leite e a não propagação da infecção (YAMAGATA et al, 1987).

A via intramamária para a administração de antibióticos, visando o combate da mamite, é prática e conveniente naqueles casos em que a inflamação ainda não obstruiu o canal e/ou a cisterna do teto, como também para tratamento no período seco (McKELLAR, 1991). Entretanto, torna-se difícil combater ou controlar a mamite, tendo como base tratamento, sem o conhecimento da sensibilidade bacteriana para antibióticos, obtido através de testes denominados antibiogramas. Estes devem ser realizados periodicamente (McDONALD & ANDERSON, 1981; MATTHEWS et al, 1992).

A utilização indiscriminada de antibióticos como principal forma de controle da mamite, vem gerando grande incidência de agentes resistentes. Esta observação é corroborada por LOUHI et al (1992), quando asseguram que o não conhecimento da resistência bacteriana seria o principal mecanismo de falência no tratamento da mamite.

É necessário ressaltar que, nem sempre, a seleção do antibiótico por indicação de sensibilidade *in vitro* significa resultado efetivo *in vivo*, seja por influência de fatores relativos ao animal e/ou ao agente, principalmente quando em associação com outros germes, mesmo os de baixa patogenicidade. Ou seja, o patógeno isolado pode ser sensível aos antibióticos no teste laboratorial mas, no campo, não fornece resposta satisfatória.

Para vários autores (PRICE et al, 1956; OWENS & WATTS, 1987; SAPERSTEIN, 1993; LOUHI-LEHTIÖ et al, 1994; WATTS & YANCEY JUNIOR, 1994), no caso específico das mamites, os componentes do leite podem ser importantes fator responsável por

essas discrepâncias. Justifica-se portanto, o desenvolvimento de métodos de antibiogramas que minimizem a influência destes elementos.

Assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver e avaliar técnica de antibiograma alternativo, denominado global, o qual, dentro da realidade brasileira, possibilite amenizar possíveis distorções de resultados em menor tempo de processamento, com custos também reduzidos, considerando a influência de três variáveis observadas: número de espécies de germes isolados, propriedade de origem da amostra e contagem global de células somáticas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. PRINCIPAIS AGENTES ETIOLÓGICOS

MURPHY (1956) agrupou os mais importantes agentes da infecção do úbere em quatro grandes categorias: *Streptococcus agalactiae*, outros *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus* e germes bacilares, considerando-os como responsáveis por 99% dos casos de mamite.

FIGUEIREDO (1962), estudando casos de mamite em 99 vacas do município de Betim-MG, observou *Streptococcus agalactiae* em 1,06% das amostras, outros *Streptococcus* em 35,10%, *Staphylococcus aureus* em 57,44% e bacilares em 4,25%. Foi observado 2,12% de *Corynebacterium pyogenes* considerados patogênicos pelo autor. Apesar de observar *Staphylococcus coagulase negativo* em 5,05% do total de amostras, estes não foram considerados patogênicos.

NÁDER FILHO et al (1983) observaram em isolamentos de mamites ditas subclínicas oriundas de rebanhos de Barretos-SP, *Staphylococcus aureus* em 58,08% das amostras, *Streptococcus agalactiae* em 10,42%, outros *Streptococcus* em 29,16%, *Staphylococcus coagulase negativo* em 6,25% e *Escherichia coli* em 2,08%. Não foi isolado nenhum patógeno em 14,29% das amostras.

No isolamento de agentes etiológicos da mamite nos rebanhos de 17 municípios do estado de São Paulo foi observado *Corynebacterium bovis* em 32,50% das amostras, com variação, entre municípios, de 0 a 73,57% (COSTA et al, 1985a).

HOGAN et al (1989) e GONZALEZ et al (1990) observaram, em propriedades da Califórnia, uma maior prevalência de coliformes em amostras oriundas de mamites no período das chuvas, nos meses de verão.

Os agentes causais das mamites ambientais (coliformes, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*) costumam permanecer pouco tempo no úbere, sendo baixo o número de infecções crônicas (GONZALEZ et al, 1990).

LANGONI et al (1991) analisando 702 amostras selecionadas pela prova de Whiteside, de propriedades da região de Botucatu- SP, observaram predomínio dos gêneros *Staphylococcus sp* (58,72%), *Corynebacterium sp* (13,72%) e *Streptococcus sp* (10,97%).

BALDASSI et al (1991) observaram, em infecções subclínicas da glândula mamária, na região de Ribeirão Preto - SP, *Staphylococcus sp* em 45,5% das amostras, *Streptococcus sp* em 25,2%, *Corynebacterium sp* em 13,0% e coliformes em 7,2%.

Para WILSON (1995), quando a mamite contagiosa é bem controlada, o *Staphylococcus coagulase negativo* costuma ser o mais freqüente patógeno.

COSTA et al (1995) examinando 3.574 casos clínicos, de 28 propriedades dos estados de São Paulo e Minas Gerais, observaram, principalmente, os gêneros *Staphylococcus sp* (34,09%), *Streptococcus sp* (28,05%) e *Corynebacterium sp* (21,77%).

2.2. CONTAGEM GLOBAL DE CÉLULAS SOMÁTICAS

BROLUND (1985), estudando 1080 vacas em lactação, de 29 rebanhos, observou que a contagem global de células somáticas (CGCS) é influenciada, principalmente, pelo "status" bacteriológico da glândula mamária. Outros fatores não bacteriológicos, como número de lactações, produção leiteira, período de colheita (manhã ou tarde) e estágio da lactação também influenciam. Afora este último, o de maior importância é o número de lactações que, com seu aumento, tende a elevar o afluxo de células somáticas. Assim sendo, a classificação da glândula, sob o ponto de vista patológico, não deveria ter limites fixos.

Segundo o mesmo autor, o diagnóstico da mamite através do CMT seria questionável, por ser método irregular para estimar a contagem celular, considerando a influência do número de lactações e outros fatores não bacterianos. NÁDER FILHO et al (1983) e BALDASSI et al (1991), observaram em amostras selecionadas por CMT ++ e +++, resultado bacteriologicamente negativo em 14,9% e 19,8% das amostras, respectivamente. Por outro lado, HILL et al (1978) observaram, experimentalmente, o desaparecimento de *Escherichia coli* antes do surgimento de sinais clínicos devido a ação de neutrófilos.

Em rebanhos com alta CGCS tem sido observado predomínio de infecções por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, enquanto que naqueles com baixa CGCS ocorrem, principalmente, coliformes e *Streptococcus* ambientais - *Strep. uberis* e *Strep. dysgalactiae* (ERSKINE et al, 1988; HOGAN et al, 1989, SCHUKKEN et al, 1989).

HARMON & LANGLOIS (1989) observaram, em relação a *Staphylococcus* coagulase negativo, que 48,3% das amostras

oriundas de mamites estabelecidas possuíam CGCS menor que 100.000 e apenas 10,5% possuíam mais de 500.000 células.

2.3. CONTROLE E TRATAMENTO

Tratamentos de mamites devido ao *Streptococcus agalactiae*, utilizando penicilina, obtiveram ótimos resultados com até 90% de cura (EDWARDS, 1954; ROBERTS et al, 1963). YAMAGATA et al (1987) consideraram economicamente viável o tratamento de infecções subclínicas por esse agente.

Programas de controle para mamite são baseados em higienização da sala de ordenha, desinfecção pós-ordenha, terapia imediata dos casos clínicos e de todas vacas no início do período seco (NEAVE et al, 1969). Para GONZALEZ et al (1990) esse programa tende a diminuir a contagem de células somáticas dos tanques e os casos de infecção por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, mas não a taxa de infecções clínicas, que passa a ter predomínio de bactérias ambientais.

Para McDONALD & ANDERSON (1981) e NÁDER FILHO et al (1983) a eficácia do tratamento melhora quando administrado o mais precocemente possível quando a inflamação da glândula está, ainda, nas proximidades da cisterna do teto.

McDONALD & ANDERSON (1981) ressaltam a importância de antibiogramas periódicos para a eficácia de programas de controle da mamite bovina. NÁDER FILHO et al (1986) observam que os tratamentos de mamite geralmente limitam-se a aplicação por tentativa dos medicamentos disponíveis.

Para SMITH (1983) a maioria dos casos clínicos é tratada com pouca ou nenhuma idéia do patógeno responsável. HOBLET et al (1993) afirmam que o isolamento é necessário para determinação da causa e definição da estratégia de controle.

Isolamentos a partir de infecções subclínicas podem não justificar, economicamente, tratamento durante a lactação, mas possibilitam selecionar o antibiótico a ser usado durante o período seco (HOBLET et al, 1993).

OWENS et al (1995), avaliando tratamento com associação de penicilina e novobiocina, frente a patógenos sensíveis aos mesmos, observaram alterações na eficácia do tratamento relacionadas a severidade da infecção. Infecções recentes com *Staphylococcus aureus* apresentaram 91% de cura, enquanto casos crônicos apenas 38%.

MAGALHÃES (1995) em estudo para detecção de resíduos de inibidores bacterianos em leites comercializados na grande Belo Horizonte, observou alto grau de positividade para os dos tipos "B" e "Integral/fazenda" atribuído, entre outras razões, ao uso indiscriminado de agentes antimicrobianos.

2.4. ANTIBIOGRAMA

BAUER et al (1966) padronizaram o antibiograma mais utilizado na rotina - o de difusão em ágar - também chamado de prova de Kirby-Bauer, o qual utiliza discos de papel impregnados com doses específicas e conhecidas de antibióticos, colocados sobre meio de cultura distribuído em placas de Petri, recém semeada com a cultura pura a ser testada.

Uma das desvantagens do método de Kirby-Bauer é o tempo gasto entre colheita da amostra e resultado, o que, segundo GREENWOOD (1981) obriga, muitas vezes, a iniciar a terapia antes de se conhecer o resultado do antibiograma.

Os antibiogramas tem por princípio aferir o crescimento bacteriano, em meio artificial, frente a ação de agentes inibidores. Os meios básicos destes testes, como o Mueller-Hinton, foram originalmente desenvolvidos para simular o soro ou fluido intestinal de pacientes, nem sempre refletindo fielmente o ambiente de infecção, principalmente em relação a mamite (LOUHI-LETHIÖ et al, 1994). FERREIRO (1978), apesar da imprecisão da extrapolação dos dados, considera que antibiogramas são válidos, no mínimo, como teste de exclusão.

2.4.1. Sensibilidade dos principais patógenos da mamite

Muitos autores avaliaram sensibilidade de bactérias isoladas de casos de mamite, pelo método de Kirby-Bauer. A TAB. 1 resume alguns dos trabalhos selecionados da literatura corrente, os quais apresentam, aproximadamente, os mesmos antimicrobianos.

TABELA 1 - Sensibilidade de bactérias isoladas de casos de manites bovinas, testadas pelo método de Kirby-Bauer, segundo vários autores.

Autores	Agentes	CO	ET	PN	TT	GN	SFT	CF
MCDONALD & ANDERSON (1981)	<i>Staph. coagulase positiva</i> <i>Staph. coagulase negativa</i>	98,9 99,8	68,7 71,4	25,6 57,3	96,8 82,0	100,0 99,6	— —	99,6 99,6
COSTA et al (1985b)	<i>Staphylococcus sp</i> <i>Streptococcus sp</i> <i>Corynebacterium sp</i>	26,0 72,0 91,0	10,0 0,0 —	6,0 35,0 13,0	20,0 30,0 84,0	55,0 43,0 90,0	55,0 46,0 77,0	90,0 92,0 100,0
DAVIDSON et al (1982)	<i>Staph. aureus</i> <i>E. coli</i>	— —	58,0 52,0	96,0 69,0	50,0 8,0	1,0 0,0	— —	11,0 8,0
NÁDER FILHO et al (1986)	<i>Staph. aureus</i>	67,6	—	13,5	70,3	94,6	62,2	—
LANGONI et al (1991)	<i>Staph. aureus</i> <i>Strep. agalactiae</i> <i>E. coli</i>	75,3 84,6 64,3	— — —	13,7 57,7 —	57,2 69,2 21,4	72,1 38,5 71,4	8,2 30,8 25,0	82,0 8,6 —
MATHEUS et al (1992)	<i>Staphylococcus sp</i> <i>Streptococcus sp</i>	— —	92,0 19,0	65,0 100,0	66,0 96,0	100,0 46,0	— —	100,0 100,0

CO = cloranfenicol
GN = gentamicina

ET = estreptomicina
SFT = sulfazotrim

PN = penicilina
CF = cefalotina

TT = tetraciclina

2.5. MÉTODOS ALTERNATIVOS DE ANTIBIOGRAMA PARA MAMITE E INFLUÊNCIA DOS COMPONENTES DO LEITE

PRICE et al (1956), avaliando a influência do leite no resultado de antibiogramas, utilizaram como diluente leite pasteurizado, integral ou desnatado, oriundo de vacas com número baixo de leucócitos. Foram observados aumentos na concentração mínima necessária para inibição e ação letal com ambos diluentes, sendo maiores os do leite integral.

MAISI et al (1984) estudando a diferença de crescimento bacteriano nos leites “mamítico” e “sadio”, observaram crescimento diferenciado das bactérias entre os leites, maior no mamítico devido ao fato da glândula com infecção ter aumento da permeabilidade, ocorrendo entrada de hemo-componentes, principalmente proteínas e ferro, podendo originar estímulos ao desenvolvimento bacteriano.

OWENS & WATTS (1987) utilizaram Ágar Mueller-Hinton reconstituído usando leite integral (3% de gordura), em substituição a água destilada, para antibiograma de difusão de amostras oriundas de mamites por *Staphylococcus aureus*, resultando em diminuição do diâmetro dos halos de todos os antibióticos testados. Assim, na opinião dos autores, antibiogramas que utilizassem leite seriam mais preditivos da situação real de eficácia terapêutica que antibiogramas em meio artificial.

Para KAARTINEN et al (1989), o leite “mamítico” conteria produtos da quebra da caseína, utilizados como fonte de aminoácidos pelas bactérias, além de substâncias inibitórias naturais presentes em altos níveis que facilitariam a proliferação bacteriana patogênica por inibir os não patógenos.

SUTRA et al (1990) observaram a formação de cápsula mucosa de polissacarídeos, expressada pelo *Staphylococcus aureus* quando se multiplica em leite, sugerindo que a presença de lactose poderia influenciar sua manifestação. Para SANDHOLM et al (1991), esta cápsula protegeria a bactéria de antibacterianos de origem exógena e/ou endógena.

HOBLET et al (1993) e SAPERSTEIN (1993) avaliando "kit" comercial de antibiograma por diluições que utilizava diferentes concentrações do leite afetado, observaram grande número de agentes contaminantes.

Componentes como proteínas, lipídeos, íons e pH do leite podem reduzir a atividade antimicrobiana através de ligações e/ou inativações. Também, a expressão fenotípica, volume do inóculo e taxa de crescimento da bactéria podem ter influência no efeito do antibacteriano (LOUHI-LEHTIÖ et al, 1994).

Para WATTS & YANCEY JUNIOR (1994) antibiogramas que utilizam leite como um de seus componentes, não possibilitam padronização tão boa quanto a obtida com os meios artificiais como o Ágar Mueller-Hinton. A dificuldade de padronização são devidas, principalmente, a variações nas proteínas, gordura e cátions.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ÉPOCA E LOCAL DA EXECUÇÃO DO TRABALHO

O experimento foi conduzido no período de fevereiro a abril de 1995, em três fazendas da região de Viçosa - MG denominadas "A", "B" e "C". Este período correspondia ao final do ciclo das chuvas, e equivalia ao término do verão e meados do outono. As análises laboratoriais foram executadas no laboratório de microbiologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

3.2. ANIMAIS E MANEJO

Foram utilizadas vacas no estágio médio da lactação, havendo nos rebanhos predomínio da raça Holandesa e, mestiços com Zebu, em graus variados de sangue. Os animais utilizados no experimento tinham de três a oito anos, e estavam entre a primeira e quinta lactação.

Um dos rebanhos, o da propriedade "A", com 120 animais produzindo leite e 42 (35%) vacas com mamites clínicas, utilizava ordenha manual em condições higiênicas precárias. Há que destacar

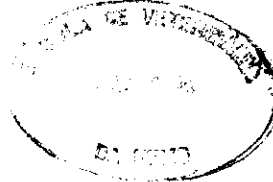
serem a higienização do úbere e a imersão dos tetos, após a ordenha, realizadas de forma inadequada. A imersão não era completa, sendo umedecida apenas a região próxima ao meato. As baixas condições de higiene, inclusive na sala de ordenha, refletiam nas condições sanitárias do rebanho, com animais positivos para brucelose e tuberculose. O controle da mamite era baseado na utilização indiscriminada de antibióticos, sem seleção prévia por antibiograma.

O rebanho "B" utilizava ordenhadeira mecânica e possuía melhores condições sanitárias. Eram manejadas 25 vacas em lactação com 2 (8,0%) casos de infecções clínicas. A higienização era feita através de lavagem do úbere e tetos com água de boa procedência, adicionada de hipoclorito de sódio, numa concentração de 400 ppm, e secados com toalhas de papel descartáveis. Após a ordenha os tetos eram imersos em solução de iodo-glicerinado, tipo "Bovidine". A sala de ordenha comportava dois animais de cada vez e possuía paredes revestidas por azulejos, permitindo uma eficiente higienização da sala.

O rebanho "C", com 70 vacas lactantes e apresentando 12 (17,1%) casos clínicos, tinha bom manejo de ordenha (também mecânica) porém inferior a utilizada por "B", e com uma sala de ordenha para 50 animais, não utilizada totalmente e higienizada de forma imperfeita.

3.3. SELEÇÃO E COLHEITA DE AMOSTRAS

Os tetos eram imersos em álcool-iodado a 10% e, após rápida secagem, era feita a colheita de leite em recipiente estéril. Após ter sido desprezado o primeiro jato, foram obtidas 45 amostras todas



oriundas de quartos mamários em que havia reação positiva (++) ou fortemente positiva (+++), ao "California Mastitis Test" (CMT)¹, segundo SCHALM & NOORLANDER (1957).

Foram utilizadas no experimento somente as 32 amostras bacteriologicamente positivas quando foi possível isolar, pelo menos, um agente bacteriano considerado patogênico.

3.4. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

O isolamento foi realizado em Ágar² adicionado de 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Após incubação por 18-24 horas, a 37°C, com auxílio de alça de platina, amostras das colônias sugestivas foram recolhidas e transferidas para tubos com Caldo Cérebro Coração³ (3C). Foi realizada identificação presuntiva dos possíveis agentes patogênicos, através das características das colônias e observações morfo-tinturais pelo método de Gram.

Posteriormente, as cocáceas, em suspensão, foram triadas através do teste de catalase. Para os microrganismos catalase-positivo, foi feita a prova de coagulase, com plasma de coelho diluído 1:4. As amostras catalase-negativa foram testadas pela prova de CAMP (CHRISTIE et al, 1944).

1. CMT FATEC - Av. Fatec, 1900 - Arujá - SP

2. MERCK S.A. Indústrias químicas - Estrada dos Bandeirantes, 1099.

3. DIFCO LABORATORIES - Detroit, Michigan - USA

Os bacilos Gram negativos foram reconhecidos, presuntivamente, pelos testes de fermentação da lactose, através de repique em meio de Ágar EMB Levine¹ e formação de gás no Ágar Ferro Açúcar Triplo²(TSI).

3.5. CONTAGEM GLOBAL DE CÉLULAS SOMÁTICAS

Foi feita a Contagem Global de Células Somáticas (CGCS), segundo técnica de PRESCOTT & BREED (1910), modificada por FIGUEIREDO (1962). Os esfregaços foram corados segundo método de CHARLETT (1954).

3.6. ANTIBIOGRAMAS

As amostras de leite foram processadas mediante cinco métodos. O método número um, considerado o de referência, obedeceu a técnica do antibiograma clássico, padronizado por BAUER et al (1966), comumente denominado método de Kirby-Bauer. Os demais com metodologia diversificada e denominados GLOBAIS, possuíam variações entre si.

No método dois, intitulado Ágar-Sangue Direto (ASD), as amostras foram semeadas, diretamente, sobre Ágar, acrescentado de 5% de

1. DIFCO LABORATORIES - Detroit, Michigan - USA

2. DIFCO LABORATORIES - Detroit, Michigan - USA

sangue desfibrinado de carneiro, utilizando-se leite "fresco" ou seja, não incubado, desde que com menos de oito horas de colheita. A distribuição sobre a placa de Petri com Ágar-sangue foi feita com "swab", ligeiramente enxugado para eliminação do excesso de leite. Após secagem em estufa a 37°C, por 15 minutos, os discos impregnados com antibiótico eram distribuídos, segundo esquema padrão seguido em todos métodos.

O método três, assemelhado ao dois, porém com utilização de Ágar Cérebro Coração¹, em placa de Petri, sendo nomeado Cérebro Coração Direto (CCD).

Nos métodos quatro, Ágar-Sangue Incubado (ASI) e cinco, Cérebro Coração Incubado (CCI), foram utilizados os mesmos meios de cultura dos métodos dois e três, sendo o inóculo pré-incubado por 15-18 horas, a 37°C.

Todas placas foram incubadas em estufa a 37°C, e a leitura realizada após 24 horas. Decorridos 48 horas da semeadura, era feita a segunda e última leitura sempre que não ocorrera crescimento bacteriano, em quantidade adequada, nas primeiras 24 horas.

Os antibacterianos utilizados para impregnação dos discos² foram: cloranfenicol (30 mcg), estreptomicina (10 mcg), penicilina G (10UI), tetraciclina (30 mcg), gentamicina (10 mcg), sulfazotrim (25 mcg) e cefalotina (30 mcg).

1. DIFCO LABORATORIES - Detroit, Michigan - USA

2. SENSIBIODISC

CECON - Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico Ltda
R. Maranguape Vila Sônia- São Paulo-SP

3.6.1. Leitura

A leitura foi feita pela mensuração do diâmetro dos halos. Nos antibiogramas GLOBAIS, quando eram observados halos superpostos, utilizava-se o diâmetro do menor.

Na leitura final, também foi considerado microrganismo resistente aqueles que apresentaram halos de inibição em faixa intermediária de classificação clássica.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os antibiogramas modificados tiveram sensibilidade e especificidade calculadas comparadas ao método clássico, utilizado como padrão.

Para avaliação dos resultados comparativos entre antibiograma clássico e modificados, foi aplicado o Índice de Concordância Kappa (FLEISS, 1981). Foram analisadas três variáveis: número de espécies encontradas na amostra, as condições existentes na propriedade de origem e a contagem de células somáticas.

Em relação as variáveis as amostras foram agrupadas em uma e duas ou mais espécies isoladas; pela propriedade de origem da amostra e em contagens menores de 500.000, entre 501.000 e 1.000.000 e para maiores de 1.001.000 células/ml.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das amostras positivas ao CMT, 29,0% não foram utilizadas no experimento por não ter sido possível o isolamento de algum agente patogênico, mesmo após a incubação do leite. Esta porcentagem está acima das observadas por NÁDER FILHO et al (1983) e BALDASSI et al (1991), 14,29% e 19,8%, respectivamente. Este resultado pode ser creditado a falência no isolamento do microorganismo (BROLUND, 1985; LANGONI et al, 1991), talvez pela eliminação prévia do agente pelo animal (HILL et al, 1978; GONZALES et al, 1990) ou por falhas de especificidade do CMT como indicativo de infecção.

Nos métodos de antibiograma direto, sem incubação, não foi possível leitura em 24 das 32 (75,0%) amostras trabalhadas, devido a ausência ou crescimento disperso. O pequeno número de amostras com crescimento (oito), a partir do leite não enriquecido semeado diretamente sobre os meios de cultura, indicam a importância da utilização de pré-incubação, pelo menos em amostras oriundas de infecções subclínicas, como no presente trabalho, quando, normalmente, é menor o número de patógenos. Confirmando a observação, todas as amostras incubadas apresentaram crescimento adequado a leitura.

Os agentes isolados foram identificados, presuntivamente, conforme o item 3.5 de Material e Métodos. Bacilares Gram positivos e leveduras foram considerados apenas como agentes contaminantes, de caráter não patogênico. O crescimento de, pelo menos, um agente contaminante foi observado em 14 amostras ou seja, 43,75%. HOBLET et al (1993) e SAPERSTEIN (1993) trabalhando com "Kit" comercial que utilizava o leite afetado, também observaram "um alto grau de agentes contaminantes", sem citar a porcentagem obtida.

O isolamento dos agentes, presuntivamente, patogênicos (TAB. 2) mostra um predomínio do gênero *Staphylococcus*, presente em 62,50% das amostras. Resultado compatível com os observados por FIGUEIREDO (1962), NÁDER FILHO et al (1983), LANGONI et al (1991), BALDASSI et al (1991), COSTA et al (1995) que obtiveram, respectivamente 62,49%, 64,33%, 58,72%, 45,5%, 34,09% de amostras contendo este gênero.

A alta porcentagem de amostras com presença de bacilares formadores de gás no Ágar Ferro Açúcar (TSI +), 28,13%, pode ser devido a época de realização do experimento, o verão, como observado nos trabalhos de HOGAN et al (1989) e GONZALES et al (1990), aliada às condições precárias de higiene do rebanho "A", responsável por 44,4% dos casos de bacilares.

Dentre os agentes considerados de maior importância na patologia da glândula mamária apenas o gênero *Corynebacterium* não foi isolado. COSTA et al (1985a) avaliando rebanhos de vários municípios, observam grande variação da frequência do *Corynebacterium*, também não ocorrendo isolamento deste patógeno em alguns deles.

Nesta pesquisa, houve apenas um caso de isolamento duplo de agentes patogênicos na mesma amostra (TAB. 2). Resultado bem

abaixo dos obtidos por BALDASSI et al (1991) e LANGONI et al (1991), de 20,6% e 23,76%, respectivamente.

Não foram observado agentes da mamite bovina, hoje classificados de contagiosos, no rebanho "B", no qual era realizado adequadamente programa de controle, segundo os parâmetros de NEAVE et al (1969). Foi observado um predomínio de *Staphylococcus* coagulase negativo (71,0%) e presença de alguns agentes ambientais (29,0%), concordando com as afirmações de GONZALES et al (1990) e WILSON (1995).

A correlação entre infecção da glândula mamária e manejo, principalmente ligado a métodos de controle, esta bem expressada no índice encontrado na fazenda "B", 8,0% de casos clínicos, desempenho melhor que em "A" e "C" com 35,0% e 17,1%, respectivamente.

A TAB. 3 mostra a sensibilidade, *in vitro*, das 32 amostras analisadas frente aos diversos métodos realizados. Vários autores (TAB. 1) citam grande variação de sensibilidade dos diferentes agentes isolados, ocorrendo até em germes de mesmo gênero e/ou espécie. Assim, por exemplo, a sensibilidade do gênero *Staphylococcus* varia para o cloranfenicol de 26,0% para COSTA et al (1985b) a 99,8% na pesquisa de McDONALD & ANDERSON (1981); em relação a gentamicina de 1,0% (DAVIDSON et al, 1982) a 100,0% (McDONALD & ANDERSON, 1981; MATTHEWS et al, 1992). Amostras de *Escherichia coli* mostram variações de resultados para gentamicina, desde 0,0% (DAVIDSON et al, 1982) a 71,4% (LANGONI et al, 1991). Resultados díspares podem estar ligados a regiões, época e, talvez, manejo do rebanho. Assim, a utilização de antibiogramas realizados anteriormente, a não ser que sejam recentes e da mesma propriedade, não devem ser utilizados, a menos que não haja possibilidade de novo teste.

Além disso, com frequência, tem sido observado a presença emergencial de diferentes patógenos numa mesma propriedade, contribuindo, ainda mais, para a necessidade de resultados recentes de antibiogramas.

O antibiograma global procura identificar a sensibilidade, sem preocupação com a classificação taxonômica do agente patogênico. Ao contrário do que pensam SMITH (1983) e HOBLET et al (1993) para avaliação de sensibilidade a fármacos, não é necessário a identificação do agente; isto tem importância para os métodos de controle, mas não precisa, necessariamente, ser simultâneo ao antibiograma. A não preocupação com isolamento permite maior rapidez nos resultados, indispensável em muitos, e desejada em todos casos de mamite bovina, principalmente nos processos agudos. Esta é uma das mais importantes premissas do desenvolvimento do antibiograma global. Ao se referir a técnicas de execução de antibiogramas GREENWOOD (1981) diz ser a lentidão dos resultados uma das principais desvantagem do método de Kirby-Bauer.

Embora não de destacada importância, entre as vantagens do método global, está a economia, pois, a rigor, pode custar cerca de 50% menos.

O GRÁFICO 1 mostra a distribuição das amostras em função do número global de células somáticas, com predomínio de contagens na faixa de 501.000 a 1.000.000 células/ ml de leite (43,8%). A preponderância desta faixa, possivelmente, pode estar relacionada a utilização de amostras oriundas de infecções subclínicas.

Elevações do número global de células somáticas por curto espaço de tempo, podem não estar relacionadas com a saúde do rebanho, o que limitaria a avaliação do estado sanitário através de único exame.

Assim, é aconselhável o acompanhamento dos animais através de exames periódicos que, indireta mas de modo bastante efetivo, pode indicar anormalidade de secreção ligada a infecção da glândula mamária.

Os métodos diretos, ASD e CCD, apresentaram níveis de concordância quase insignificantes quando comparados pelo índice Kappa, ao método clássico de Kirby-Bauer, 0,094 e 0,042, respectivamente. Com relação aos métodos ASI e CCI, ambos trabalhando com leite previamente incubados, os níveis de concordância foram classificados como regulares, isto é, 0,434 para ASI e 0,348 para CCI. Este resultado demonstra, claramente, melhora no desempenho dos antibiogramas quando é usado a incubação prévia do leite.

Todos os métodos propostos apresentaram baixa sensibilidade (TAB. 4). Quanto a especificidade, conforme a mesma tabela, os resultados foram de bom a ótimos, como ocorreu com os métodos em que o leite usado para semeadura era enriquecido.

As análises estatísticas de ASD e CCD foram obtidas utilizando apenas dados de 25% do total das amostras. Assim, tendo havido crescimento bacteriano que possibilitasse leitura em apenas oito amostras, foi impossível a análise segmentada dos antibiogramas globais diretos em relação as variáveis número de espécies bacterianas encontradas na amostra, propriedade de origem e contagem global de células somáticas. A influência das variáveis para ASI e CCI foi analisada em relação ao índice Kappa, registrada na TAB. 5. Com relação a sensibilidade na TAB. 6, e a especificidade na TAB. 7.

Quando ocorreu isolamento de patógenos, simultaneamente a outro ou a germes contaminantes, foi observado queda no índice Kappa (TAB. 5), refletindo principalmente na sensibilidade (TAB. 6).

Com relação às propriedades, a que ofereceu melhores resultados ao índice Kappa, a sensibilidade e a especificidade foi a "A", com rebanho de manejo menos técnico, com maior possibilidade de infecção. Sem que sejam feitas novas e ampliadas pesquisas, fora dos objetivos do projeto, é difícil apresentar aceitável explicação.

O índice Kappa aumentou progressivamente com a contagem global de células somáticas no método ASI e foi, no CCI, menor no intervalo de 501.000 a 1.000.000 células/ml (TAB. 5). A sensibilidade foi menor no intervalo <500.000 células/ml do método ASI e pouca variação no CCI (TAB. 6). A especificidade, aparentemente, sofreu pouca influência apresentado-se ligeiramente menor no intervalo de 501 a 1000 células (TAB. 7). Os resultados não possibilitaram elucidar a influência do número de células.

A utilização do leite semeado diretamente sobre o meio de cultura parece dificultar a difusão do antibiótico, gerando uma diminuição no diâmetro dos halos. Assim, muitas amostras classificadas como sensíveis no antibiograma clássico, foram, nos globais, consideradas resistentes (TAB. 3). Estes resultados são semelhante aos observados por OWENS & WATTS (1987). Esse fato pode significar maior precisão na seleção do antibiótico pois, como observou PRICE et al (1956), a concentração necessária para inibição dos patógenos no leite é maior que no meio de cultura. Tais evidências sugerem a conveniência de alterações no diâmetro dos halos indicativos de resultados de sensibilidade, com observações clínicas da ação comparativa dos antibacterianos.

Entretanto, há que considerar vários outros fatores, como alterações no agente quando em multiplicação no leite (SUTRA et al, 1990; SANDHOLM et al, 1991) ou os relacionados a componentes do próprio leite (LOUHI-LEHTIÖ et al, 1994).

Além de incorporar esses fatores, os resultados dos antibiogramas globais parecem ser influenciados pela presença simultânea de outros microorganismos e por alterações verificadas somente em leites anormais ou "mamíticos", como observam MAISI et al (1984) e KAARTINEN et al (1989).

Todas estas variáveis, sem dúvida, falam em benefício dos métodos de antibiogramas globais pois, evidentemente, elas concorrem para maior segurança dos resultados.

A precisão dos testes globais não pôde ser evidenciada pelo presente trabalho por exigir maior volume de pesquisa e demanda de tempo também maior. Mas, ao aceitarmos o método de Kirby-Bauer como 100% preciso, ou seja, sensibilidade e especificidade iguais a 1,00, ASI e CCI possuiriam sensibilidades baixas mas especificidades alta (TAB. 4), mesmo considerando as variáveis - número de espécies isoladas, propriedade analisada, contagem global de células somáticas (TAB. 7), indicando que o teste pode ser utilizado como método seguro de exclusão daqueles antibióticos para os quais os patógenos sejam resistentes (FERREIRO, 1978).

Finalmente, até que novas e amplas pesquisas sejam produzidas, é justificável a recomendação de manutenção dos diâmetros indicados para o método clássico mantendo a especificidade alta, pois, o falso sensível é mais prejudicial que o falso resistente. Haveria acréscimo de custo por aplicações repetidas, e demora no tratamento efetivo do caso clínico, com comprometimento da cura (McDONALD & ANDERSON, 1981; NADER FILHO et al, 1983; OWENS et al, 1995) além do aumento de resíduos de antibióticos no leite (MAGALHÃES, 1995).

A ressalva de WATTS & YANCEY JUNIOR (1994) quanto a dificuldade de padronização dos antibiogramas devido a variação dos componentes do leite, não procede em relação aos antibiogramas globais, já que o resultado obtido está relacionado as

condições reais do leite afetado, isto é, envolve além das alterações quantitativas e/ou qualitativas de seus componentes, a eventual presença de mais de um patógeno, ou de contaminantes, que podem exercer simbiose microbiana com alteração da patogenicidade de um dos microrganismos, talvez o principal agente etiológico.

TABELA 2- Identificação presuntiva de patógenos, em amostras de leite oriundas de glândulas mamárias infectadas, em três fazendas situadas na região de Viçosa - MG, 1995.

Agentes isolados	Rebanhos			Total	Freq. relativa (%)
	A	B	C		
<i>Staphylococcus coag</i> +	1	0	5	6	18,75
<i>Staphylococcus coag</i> -	3	5	5	13	40,62
<i>Streptococcus CAMP</i> +	0	0	1	1	3,13
<i>Streptococcus CAMP</i> -	0	1	2	3	9,37
Bacilares	4	1	3	8	25,00
Bacilares TSI + c/ gás e	0	0	1	1	3,13
<i>Staphylococcus coag.</i> +					
TOTAL	8	7	17	32	100,0

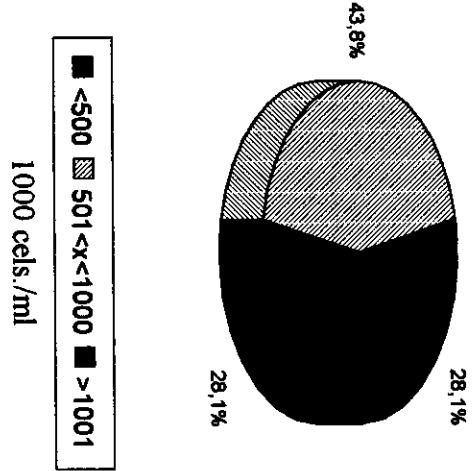


GRÁFICO 1 - Distribuição das amostras de leite de acordo com a contagem global de células somáticas categorizadas em 3 faixas, oriundas de glândulas mamárias infectadas, em três fazendas situadas na região de Viçosa - MG, 1995.

TABELA 3 -
 Frequência de microrganismos sensíveis a antibacterianos testados, pelos métodos de Kirby-Bauer (KB), Ágar Sangue Direto (ASD), Cérebro Coração Direto (CCD), Ágar Sangue Incubado (ASI), Cérebro Coração Incubado (CCI), de amostras de leite oriundas de glândulas mamárias infectadas, em três fazendas situadas na região de Viçosa - MG, 1995.

	KB		ASD		CCD		ASI		CCI	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
CO	25	78	05	63	04	50	13	41	11	34
ET	07	22	0	0	02	25	01	03	02	06
PN	04	12	03	37	03	37	0	0	0	0
TT	12	37	02	25	03	37	01	03	03	09
GN	32	100	03	37	03	37	27	84	23	72
SFT	23	72	0	0	01	13	04	12	01	03
CF	19	59	05	63	04	50	14	44	14	44
CO = cloranfenicol			ET = estreptomina		PN = penicilina		TT = tetraciclina			
GN = gentamicina			SFT = sulfazotrim		CF = cefalotina					

TABELA 4- Sensibilidade e especificidade dos métodos de antibiogramas globais propostos, considerando o método de BAUER et al (1966) como padrão, de amostras de leite oriundas de glândulas mamárias infectadas, em três fazendas situadas na região de Viciosa - MG, 1995.

	ASD	CCD	ASI	CCI
Sensibilidade	0,394	0,363	0,475	0,418
Especificidade	0,740	0,652	0,980	0,940
ASD - Ágar Sangue Direto		CCD - Cérebro Coração Direto		
ASI - Ágar Sangue Incubado		CCI - Cérebro Coração Incubado		

TABELA 5- Influência das variáveis sobre a concordância entre as técnicas de antibiogramas com seneaduras enriquecidas e o método de BAUER et al (1966), calculada pelo índice Kappa, de amostras de leite oriundas de glândulas mamárias infectadas, em três fazenda situadas na região de Viçosa - MG, 1995.

VARIÁVEIS	ÍNDICE KAPPA	
	ASI	CCI
Número de espécies de germes isolados	1	0,528
	>2	0,325
Propriedade	A	0,592
	B	0,427
	C	0,365
Contagem de células somáticas 1000/ml	< 500	0,331
	501 < x < 1.000	0,417
	>1.001	0,448
ASI - Ágar Sangue Incubado	CCI - Cérebro Coração Incubado	0,407
		0,313
		0,401

TABELA 6- Influência das variáveis na sensibilidade dos antibiogramas globais, realizados com sementes enriquecidas, considerando o método de BAUER et al (1966) como padrão, de amostras de leite oriundas de glândulas mamárias infectadas, em três fazendas situadas na região de Viçosa - MG, 1995.

VARIÁVEIS	SENSIBILIDADE	
	ASI	CCI
Número de espécies de germes isolados	1	0,547
	>2	0,397
Propriedade	A	0,545
	B	0,533
	C	0,429
Contagem de células somáticas 1000/ml	< 500	0,347
	501 < x < 1.000	0,483
	>1.001	0,448
		0,423
		0,414
		0,422

ASI - Ágar Sangue Incubado

CCI - Cérebro Coração Incubado

TABELA 7- Influência das variáveis na especificidade dos antibiogramas globais, realizados com sementes enriquecidas, considerando o método de BAUER et al (1966) como padrão, de amostras de leite oriundas de glândulas mamárias infectadas, em três fazendas situadas na região de Viçosa - MG, 1995.

VARIÁVEIS	ESPECIFICIDADE		
	ASI	CCI	
Número de espécies de germes isolados	1 >2	0,984 0,975	0,951 0,975
Propriedade	A	1,0	1,0
	B	0,948	0,894
	C	0,981	0,959
Contagem de células somáticas 1000/ml	< 500	1,0	1,0
	501 < x < 1.000	0,957	0,915
	>1.001	1,0	1,0
ASI - Ágar Sangue Incubado		CCI - Cérebro Coração Incubado	

5 CONCLUSÕES

O método de antibiograma global, além da rapidez dos resultados, oferece indicações mais abrangentes.

A incubação prévia do leite, para realização dos antibiogramas globais, reduz eventuais dificuldades de leitura e aumenta a sensibilidade e especificidade dos testes.

O isolamento de mais de uma espécie na amostra, alterou a sensibilidade e especificidade do teste, mas sem comprometer o valor de seu resultado.



6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUÁRIO estatístico do Brasil. Rio de Janeiro, v. 52, 1992, 1116p.

BALDASSI, L., FERNANDES FILHO, M., HIPÓLITO, M., MOULIN, A. A. P., CALIL, E. M. B., PIRES, D. C. Etiologia da mastite subclínica na bacia leiteira de Ribeirão Preto, estado de São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 58, n. 1/2, p. 29-36, 1991.

BAUER, A. W., KIRBY, W. M., SHERRIS, J.C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 45, n. 4, p.493-496, 1966.

BROLUND, L. Cells counts in bovine milk - causes of variação and applicability for diagnosis of subclinical mastitis. *Acta Veterinaria Scandinavica*, supplementum 80, p. 1-125, 1985.

CHARLETT, S. M. An improved staining method for the direct microscopical containing bacteria in milk. *Dairy Industries*, v.19, n. 8, p. 652-653, 1954.

- CHRISTIE, R., ATKINS, N. E., MUNCH-PETERSEN, E. A note on the lytic phenomenon shown by group beta Staphylococci. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v. 22, n. 3, p. 197-200, 1944.
- COSTA, E. O., BENITES, N. R., MELVILLE, P. A., PRADO, 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., CARVALHO, V. M., COUTINHO, S. D., CASTILHO, W., CARAMORI, L. F. L. *Corynebacterium bovis* e sua importância na etiologia da mastite bovina no estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 5, n. 4, p. 117-120, 1985a.
- COSTA, E. O., COUTINHO, S. D., CASTILHO, W., TEIXEIRA, C. M. Sensibilidade a antibióticos e quimioterápicos de bactérias isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 5, n. 2, p. 65-69, 1985b.
- DAVIDSON, J. N., BABISH, J. G., DUNNY, G. M. Bovine mastite: antimicrobial resistance patterns. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 180, n. 2, p. 153-155, 1982.
- EDWARDS, S. J. The control and treatment of certain forms of mastitis. **Veterinary Record**, v. 66, n. 3, p. 37-40, 1954.
- ERSKINE, R. J., EBERHART, R. J., HUTCHINSON, L. J., SPENCER, S. B., CAMPBELL, M. A. Incidence and types of clinical mastitis in dairy herds with high and low somatic cell

- counts. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 6, p. 761-765, 1988.
- FERREIRO, L. Agentes etiológicos e terapêutica da mastite bovina no Brasil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 6, n. 1, p.77-88, 1978.
- FLEISS, J. L. **Statistical Methods for Rates and Proportions**. 2° ed. New York: John Wiley & Sons. 1981. 321p.
- FIGUEIREDO, J. B. Estudo sobre a mamite bovina no município de Betim, Minas Gerais. **Arquivos da Escola de Veterinária da UFMG**, v. 14, p. 257-295, 1962.
- GONZALEZ, R. N., JASPER, D. E., KRONLUND, N. C., FARVER, T. B., CULLOR, J. S., BUSHNELL, R. B., DELLINGER, J. D. Clinical mastitis in two California dairy herds participating in contagious mastitis control programs. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 3, p. 648-660, 1990.
- GREENWOOD, D. *In vitro veritas?* Antimicrobial susceptibility test and their clinical relevance. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 144, n. 4, p. 380-385, 1981.
- HARMON, R. J., LANGLOIS, B. E. Mastitis due to coagulase negative *Staphylococcus* species. **Agri-practice**, v. 10, n. 1, p.29-34, 1989.
- HILL, A. W., SHEARS, A. L., HIBBITT, K. G. The elimination of serum-resistant *Escherichia coli* from experimentally infected single mammary glands of healthy cows. **Research in Veterinary Science**, v. 25, n. 1, p. 89-93, 1978.

- HOBLET, K. H., QUEEN, W. G., HOWARD, R. R. Antibiotic susceptibility testing in mastitis: A comparison of commercial test kit with Kirby-Bauer methods. **Agri-practice**, v. 14, n. 7, p.45-51, 1993.
- HOGAN, J.S., SMITH, K. L., HOBLET, K. H., SCHOENBERGER, P. S., TODHUNTER, D. A., HUESTON, W. D., PRITCHARD, D. E., BOWMAN, G. L., HEIDER, L. E., BROCKETT, B. L., CONRAD, H. R. Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 6, p. 1547-1556, 1989.
- KAARTINEN, L., ALI-VEHMAS, T., MATTILA, T., SANDHOLM, M. Bacterial growth in mastitic whey in relation to bacterial association with mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 21, n. 2, p.155-163, 1989.
- LANGONI, H., PINTO, M. P., DOMINGUES, P. F., LISTONI, F. J. P. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina sub clínica. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 43, n. 6, p. 507-515, 1991.
- LOUHI-LEHTIÖ, M., SANDHOLM, M., MYLLYS, V., HONKANEN-BUZALSKI, T. Antibacterial susceptibility of bovine-mastitis pathogens tested directly in milk from infected quarters. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 41, n. 2, p.101-112, 1994.
- LOUHI, M., INKINEN, K., MYLLYS, V. SANDHOLM, M. Relevance of sensitivity testing (MIC) of *S. aureus* to predict the antibacterial action in milk. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 39, n. 4, p. 253-262, 1992.

- MAGALHÃES, N. A. **Detecção de resíduos de inibidores bacterianos em leite pasteurizado tipos "A", "B", "C" e "Integral/fazenda" comercializados na grande Belo Horizonte.** Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1995, 98p. Tese (mestrado em Medicina Veterinária)
- MAISI, P., MATTILA, T., SANDHOLM, M. Mastitis whey - a good medium for bacteria? *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.25, n. 2, p.297-308, 1984.
- MATTHEWS, K. R., OLIVER, S. P., JAYARAO, B. M. Susceptibility of staphylococci and streptococci isolated from bovine milk to antibiotics. *Agri-practice*, v. 13, n. 3, p. 18-24, 1992.
- McDONALD, J. S., ANDERSON, A. J. Antibiotic sensitivity of *S. aureus* and coagulase negative staphylococci isolated from infected bovine mammary glands. *Cornell Veterinarian*, v. 71, n.4, p. 391-396, 1981.
- McKELLAR, Q. A. Intramammary treatment of mastitis in cows. *In Practice*, v. 13, n. 6, p. 244-249, 1991.
- MURPHY, J. M. Mastitis - the struggle for understanding. *Journal of Dairy Science*, v. 39, n. 12, p.1768-1773, 1956.
- NÁDER FILHO, A., ROSSI JUNIOR, O. D., SCHOKEN-ITURRINO, R. P., AMARAL, L. A. Sensibilidade *Staphylococcus aureus* isolados em casos de mastite bovina à ação de antibióticos e quimioterápicos. *Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 38, n. 4, p. 581-586, 1986.

NÁDER FILHO, A., SHOCKEN-ITURRINO, R. B., ROSSI JUNIOR, O. D. Mastite subclínica em rebanhos produtores tipo B. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 35, n. 5, p. 621-630, 1983.

NEAVE, F. K., DODD, F. H., KINGWILL, R. G., WESTGARTH, D. R. Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. **Journal of Dairy Science**, v. 52, n. 5, p. 696-707, 1969.

OWENS, W. E., RAY, C. H., WATTS, J. L., YANCEY JR., R. J. Correlation of antibiotic therapy success during lactation with antimicrobial susceptibility test results for bovine mastitis. In: Annual Meeting National Mastitis Council, 34, 1995, Fort Worth. **Proceedings...** Arlington. National Mastitis Council: 1995. p. 142-143.

OWENS, W. E., WATTS, J. L. Effects of milk on activity of antimicrobics against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine udders. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 9, p. 1946-1951, 1987.

PRESCOTT, S. C., BREED, R. S. The determination of the number of the body cells in milk by a direct method. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 5, p. 632-640, 1910.

PRICE, K. E., GALLIAN, M. J., HEATHER, C. D., LUTHER, H. G. The influence of milk and other media on antibiotic sensitivity of mastitis organisms. **Antibiotics Annual**, V. 3, p. 753-762, 1956.

ROBERTS, S. J., HODGES, H. C., FINCHER, M. G., TEMPLE, H.C., BROWN, H. L., CHENEY, J. B., JOHNSON, S. D.,

- LINQUIST, W.E., REED, F.I., GUNTHRIE, R.S. Studies of the *Streptococcus agalactiae* form of mastitis in dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.143, n. 11, p. 1193-1201, 1963.
- SANDHOLM, M., LOUHI, M., MYLLYS, V. Milk reduces antistaphylococcal efficacy of antibacterials. A possible explanation for failures of therapy in mastites. **Acta Veterinaria Scandinavica**, sup. 87, p.115-118, 1991.
- SAPERSTEIN, G. Clinical applications of an antibiotic susceptibility test for mastitis. **Agri-practice**, v.14, n. 4, p. 25-28, 1993.
- SCHALM, O. W., NOORLANDER, D. O. Experiences and observations leading to development of California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.130, n. 5, p. 199-204, 1957.
- SCHUKKEN, Y. H., GROMMERS, F. J., VAN DE GEER, D., BRAND, A. Incidence of clinical mastitis on farms with low somatic cell counts in bulk milk. **Veterinary Record**, v. 125, n.3, p. 60-63, 1989.
- SMITH, K. L. Mastitis control: a discussion. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 8, p. 1790-1794, 1983.
- SUTRA, L., MENDOLIA, C., RAINARD, P., POUTREL, B., Encapsulation of *Staphylococcus aureus* isolates from mastitic milk: relationship between capsular polysaccharide types 5 e 8 and colony morphology in serum-soft agar, chumping factor, teichoic acid, and protein A. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p.447-451, 1990.

WATTS, J. L., YANCEY JR., R. J. An update on antimicrobial susceptibility testing of mastitis pathogens. In: Annual Meeting National Mastitis Council, 33, 1994, Orlando. **Proceedings...** Arlington. National Mastitis Council: 1994. p. 14-19.

WILSON, D. J. Coagulase-negative Staphylococcus species mastitis: interpretation of diagnostic results and her problem solving. In: Annual Meeting National Mastitis Council, 34, 1995, Fort Worth. **Proceedings...** Arlington. National Mastitis Council: 1995. p. 78-82.

YAMAGATA, M., GOODGER, W. J., WEAVER, L., FRANTI, C. The economic benefit of treating subclinical *Streptococcus agalactiae* mastitis in lactating cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.191, n. 12, p. 1556-1561, 1987.