

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Conselho de Pós - Graduação

Escola de veterinária



MAMITE BOVINA EM REBANHOS DA "BACIA" LEITEIRA DE BELO HORIZONTE,
MINAS GERAIS; I - Controle através de antibioticoterapia
coadjuvada pelo dimetilsulfóxido (DMSO). II - Contribuição ao
estudo epidemiológico.

U. F. M. G. - BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA



NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA

05/03/04/16

BELO HORIZONTE

Minas Gerais

1989

1636.000 6º
P
273

José Ricardo Almeida de Andrade

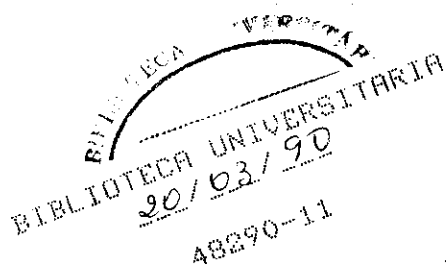
MAMITE BOVINA EM REBANHOS DA "BACIA" LEITEIRA DE BELO HORIZONTE,
MINAS GERAIS; I - Controle através de antibioticoterapia
coadjuvada pelo dimetilsulfóxido (DMSO). II - Contribuição ao
estudo epidemiológico

Tese apresentada a Escola de Veterinária
da Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para a obtenção do
gráu de Mestre em Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva.

Belo Horizonte
Minas Gerais

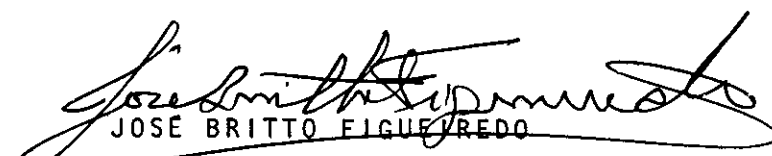
1989



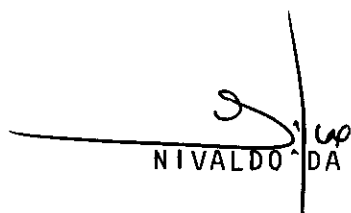
636.208 969 2

A553m Andrade, José Ricardo Almeida de, 1948 -
 Mamite bovina em rebanhos da "bacia"
 leiteira de Belo Horizonte, Minas Gerais :
 I - Controle através de antibioticoterapia
 coadjuvada pelo dimetilsulfóxido (DMSO).
 II- Contribuição ao estudo epidemiológico.
 Belo Horizonte : Escola de Veterinária da
 UFMG, 1989.
 98 p. : il.
 Tese (Mestrado)
 1. Mastite - Tratamento - Minas Gerais.
 2. Mastite - Epidemiologia - Minas Gerais.
 3. Bovinos - Doenças. I. Título.

APROVADA EM 20 / 12 / 1989.


JOSE BRITTO FIGUEIREDO
(Orientador)


JOSE EURICO DE FARIA


NIVALDO DA SILVA


EDSON CLEMENTE DOS SANTOS

A meus grandes amigos e pais José Milton e Léa, a minha companheira e esposa Nadia, a meus queridos filhos Ricardo e Alexandre, pelo estímulo recebido.



AGRADECIMENTOS

Ao Prof. JOSÉ BRITTO FIGUEIREDO, pela firme e valiosa orientação durante todo o curso.

Aos Profs. NIVALDO DA SILVA e MIDELVIRSON OLIVEIRA, pela amizade e confiança que sempre me ofereceram.

Ao Prof. Luiz Bernardes do Departamento de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, pela valiosa colaboração no desenvolvimento das fórmulas medicamentosas.

Aos Profs. Ivan Barbosa Sampaio e Henrique Nunes de Oliveira, pelo indispensável auxílio dos cálculos estatísticos

Aos Professores da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, especificamente, aos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, pelos ensinamentos dispensados.

A todos colegas e amigos particularmente à Max Augusto Jorge e Luciano Freitas Henriques Alcioli Lins, pelo apoio e incentivo que sempre demonstrados

Aos funcionários da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, em especial, aos Srs. Luis

André Lima e Geraldo Márcio da Costa e às Srtas. Rosilene Figueiredo Almeida e Claudia Kafuri, pelo eficiente apoio demonstrado.

A amiga Prof.^a Ibirajara de Faria Arruda pela importante ajuda na revisão gráfica

A Empresa Goiana de Pesquisa Agropecuária (EMGOPA) e Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de Goiás (SAGRIA), pela oportunidade de realização deste curso.

Aos colegas veterinários do Centro de Ensino e Desenvolvimento Agropecuário de Florestal (CEDAF) da Universidade de Viçosa e da Fazenda Experimental Santa Rita da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), pelo apoio no desenvolvimento dos trabalhos de campo da tese.

A Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento parcial da tese.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pelas bolsas concedidas.

BIOGRAFIA DO AUTOR

JOSÉ RICARDO ALMEIDA DE ANDRADE, filho de José Milton Almeida de Andrade e Léa Almeida de Andrade, nasceu em Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, em 29 de Julho de 1948.

Graduado em Medicina Veterinária pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, em dezembro de 1975.

Em abril de 1976, através de concurso público interno, foi contratado pela Secretaria da Agricultura do Estado de Goiás com o cargo de Médico Veterinário, desempenhando a função de chefe de sub - área da Campanha de Combate à Febre Aftosa. Em junho de 1980, passou a integrar o quadro técnico do Centro de Diagnósticos e Pesquisas Veterinárias desta mesma pasta, respondendo pelo setor de campilobacteriose.

Em julho de 1986 foi colocado à disposição da Empresa Goiana de Pesquisa Agropecuária, com a função de pesquisador.

Em março de 1985 iniciou o curso de Pós-graduação na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais na área de Medicina Veterinária Preventiva, ora concluído.



RESUMO

Na presente pesquisa foram estudadas fórmulas de tratamento da mamite bovina, em três rebanhos da "bacia" leiteira de Belo Horizonte (Minas Gerais), com penicilina, nos seus sais G potássica e G procaína em associação com o sulfato de estreptomicina, em veículos aquoso-oleoso e aquoso, com e sem adição de 20,0% de dimetilsulfóxido (DMSO). Paralelamente, foram observadas a frequência dos agentes etiológicos e a eficiência de testes de diagnóstico.

Os cocos Gram positivos apresentaram prevalência de 94,7% e os bacilos Gram negativos 5,3%, confirmando serem os cocos Gram positivos os agentes predominantes nas mamicas bovinas. A mamite sub-clínica (97,0%) foi a forma predominante

Apesar do elevado percentual de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina (84,4%) e estreptomicina (45,8%), a associação destes antibióticos mostrou ser eficiente no tratamento deste tipo de mamite, obtendo percentuais médios de glândulas bacteriológicamente negativas, às 120 horas, de 70,5% em veículo aquoso-oleoso e 79,4% em veículo aquoso. A medicação foi única, via intra-mamária.

A adição do DMSO nas fórmulas medicamentosas, não apresentou significância ao teste "T" a nível de 5,0%. No rebanho da UFMG, com mamite tipicamente crônica, as fórmulas com DMSO obtiveram grau de significância de 0,5, sugerindo que a ação do DMSO é mais ou menos exaltada em conformidade com a evolução da doença.

As glândulas tratadas com as fórmulas contendo DMSO apresentaram menor contagem global de células somáticas (C.G.C.S.) do que suas similares sem DMSO, em especial nas primeiras 24 horas, provavelmente devido ao efeito anti-inflamatório do DMSO.

O DMSO, adicionado ao meio de cultura, nas concentrações de 10,0 e 15,0%, parece não modificar o comportamento das amostras bacterianas resistentes aos antibióticos utilizados; porém, aumenta a sensibilidade das amostras moderadamente sensíveis e sensíveis.

Na concentração de 10,0% o DMSO não inibiu o crescimento de nenhuma das amostras isoladas, a 15,0% inibiu 27,6% e, a 20,0% inibiu 100,0%.

Os testes de "California Mastitis Test" (CMT), contagem global de células somáticas (C.G.C.S.) e bacterioscopia obtida pela coloração de Charlett, são de fácil aplicação e, quando executados adequadamente podem contribuir para melhorar os programas de controle e profilaxia das mamites bovinas. Contudo, não substituem a bacteriologia como diagnóstico definitivo.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	01
2.	REVISÃO DE LITERATURA	05
2.1.	Etiopatogenia	05
2.2.	Apresentação clínica	09
2.3.	Incidência da mamite bovina	13
2.4.	Controle	15
2.4.1.	Manejo e desinfecção	15
2.4.2.	Contagem global de células somáticas (C.G.C.S) bacterioscopia e bacteriologia	16
2.5.	Tratamento das mamicas bovinas	18
2.5.1.	Resistência bacteriana	18
2.5.2.	Antibioticoterapia	20
2.5.2.1.	Generalidades	20
2.5.2.2.	Uso da penicilina e estreptomicina	22
2.5.2.3.	Irritabilidade causada pela antibioticoterapia	24
2.5.3.	Dimetilsulfóxido (DMSO) como adjuvante da antibioticoterapia	25



x

2.5.4. Liberação de resíduos de antibióticos no leite.....	25
2.6. Dimetilsulfóxido (DMSO) como auxiliar do tratamento das mamites bovinas	29
2.6.1. Metabolismo do DMSO	29
2.6.2. Atividades do DMSO	30
2.6.2.1. Penetração de membranas	30
2.6.2.2. Permeabilização de membranas.....	30
2.6.2.3. Efeito anti-inflamatório	31
2.6.2.4. Atividades antimicrobianas do DMSO	31
2.6.2.4.1. Atividade bactericida e/ou bacteriostática .	31
2.6.2.4.2. DMSO como potenciador de antibióticos	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. Rebanhos trabalhados.....	35
3.2. Manejo dos rebanhos	35
3.2.1. Alimentação	35
3.2.2. Ordenha	36
3.2.3. Sanitário	36
3.3. Instalações	37
3.4. Seleção dos animais	38
3.5. Colheita do material	39
3.6. Diagnóstico da mamite	40
3.6.1. Clínico	40
3.6.2. Exames complementares	40
3.6.2.1. Coadura do leite e "California	

Mastitis Test" (CMT)	40
3.6.2.2. Bacteriologia e identificação presuntiva	40
3.6.2.3. Bacterioscopia e contagem global de células somáticas (C.G.C.S.) ...	41
3.7. Fórmulas medicamentosa	41
3.7.1. Antibióticos	41
3.7.2. Emulsões oleosas	42
3.7.3. Fórmulas aquosas	43
3.8. Medicação intramamária	43
3.8.1. Sensibilidade bacteriana	43
3.8.2. Fórmulas medicamentosas e administração.....	43
3.8.3. Resíduos de antibióticos	44
3.8.3.1. Liberação de antibióticos no leite.	44
3.8.3.2. Quantificação dos resíduos de antibió- ticos	44
3.8.4. Correção dos halos de inibição em função da produção individual da glândula mamária	44
3.8.5. Difusão da medicação através da glândula mamária	45
3.8.6. Análise estatística	45
4. RESULTADOS	46
5. DISCUSSÃO	59
5.1. Prevalência dos agentes etiológicos	59
5.1.1. Estafilococcias	60
5.1.2. Estreptococcias	62
5.1.3. Enterobacterioses	64

5.1.4. Infecções mistas	65
5.2. Tratamento da mamite via intra-mamária	65
5.2.1. Fórmula medicamentosa	65
5.2.2. Tratamento	68
5.2.3. Comparação das fórmulas	69
5.3. Resistência bacteriana	72
5.4. DMSO como potenciador de antibióticos	74
5.5. Liberação de resíduos de antibióticos	76
5.6. Irritabilidade provocada pelas fórmulas	77
5.7. " California Mastitis Test" (CMT), bacterioscopia, bacteriologia	79
6. CONCLUSÕES	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

LISTA DE TABELAS E GRÁFICO

TABELA I	- Número e percentagens de patógenos, identificados presuntivamente, em rebanhos da "bacia" leiteira de Belo Horizonte, Minas Gerais, 1987	47
TABELA II	- Número e percentagens de quartos tratados e não, negativos a bacteriologia às 120 horas após aplicação das fórmulas, 1987	48
TABELA III	- Sensibilidade dos microorganismos frente à penicilina, sem e com DMSO no meio de cultura, 1987	50
TABELA IV	- Sensibilidade dos microorganismos frente à estreptomicina, sem e com DMSO no meio de cultura, 1987	51
TABELA V	- Liberação de resíduos de antibióticos em glândulas mamárias, testadas com fórmulas em base oleosa, 1987	52
TABELA VI	- Liberação de resíduos de antibióticos em	

	glândulas mamárias, testadas com fórmulas em base aquosa, 1987	52
TABELA VII -	Contagem de células somáticas do leite e escore linear das glândulas correlacionadas com as fórmulas medicamentosas empregadas e os achados bacteriológicos finais	55
TABELA VIII-	Comparação entre CMT, bacteriologia e bacterioscopia, em casos de mamite na bacia leiteira de Belo Horizonte, 1987	57
TABELA IX -	Comparação entre os graus de positividade do CMT, bacteriologia e bacterioscopia, com percentual de concordância, em casos de mamite da "bacia" leiteira de Belo Horizonte, 1987	57
TABELA X -	Percentuais de concordância entre os resultados da bacteriologia e bacterioscopia dos casos de mamite da "bacia" leiteira de Belo Horizonte, 1987	57
TABELA XI -	Correlação entre os achados bacterioscópicos e bacteriológicos, em casos de mamite na bacia leiteira de Belo Horizonte, 1987	58
GRÁFICO I -	Médias das diluições dos antibióticos usados, sem e com DMSO em "Skim Milk".....	54



1. INTRODUÇÃO

Em países desenvolvidos ou em desenvolvimento as vantagens do leite, como alimento básico e de primeira categoria, são plenamente reconhecidas.

A adequada provisão de leite como alimento para o homem, principalmente na infância, promove a saúde pública e funciona como importante incentivo à infra-estrutura do progresso e estabilização sócio-econômica das áreas rurais, particularmente em países, onde o êxodo rural crescente se transforma em grandes problemas.

Segundo GIESECKE (1985), não obstante as diferentes condições prevalentes nos diversos países, é necessário que a pecuária leiteira seja economicamente viável, fornecendo produto com características nutritivas de pureza e higiene, apropriadas ao consumo humano, "in natura" ou como laticínio.

É unânime o reconhecimento que a mamite é a principal causa de alterações das características do leite e que o produto de glândulas mamárias enfêrmas é sempre inaceitável para o consumo humano. Defeitos de composição, características

organolépticas, não podem ser corrigidos pela pasteurização ou outro tratamento. Portanto, não é possível transformar um mesmo leite de qualidade inferior em outro de melhor qualidade através de artifícios.

Recentes trabalhos demonstram que a patogenia das mamites é dinâmica e associada a vários fatores, que vão desde ambientais até susceptibilidades individuais, inclusive entre quartos do mesmo úbere, porém, todos os tipos de mamite tem em comum uma característica maior: a lesão do epitélio mamário que, em maior ou menor grau, provoca modificações físicas, químicas e microbiológicas no leite (CARROL,1977 ; GIESECKE,1985 ; Du PREEZ,1986)

Os prejuízos oriundos da perda de leite, medicação, custos de assistência médico veterinária, da desvalorização, descarte e reposição de animais, tornam a mamite a mais importante doença que afeta o rebanho leiteiro bovino, em especial, nos países em que sua exploração é intensiva (DERBYSHIRE,1962 ; ROBERTS et alii, 1969 ; BRAMLEY & DODD,1984). Nos EUA, tais prejuízos são estimados de 0,5 a 2 milhões de dólares anuais, considerando que metade das vacas leiteiras tenham dois quartos infectados e que 75% destas infecções sejam sub-clínicas (ROBERTS et alii,1969 ; JANZEM,1970 ; DOBBINS JR,1977 ; SEYKORA & Mc DANIEL,1985). Por volta de 1955, ficou claro que o tratamento com antibióticos é componente essencial e eficaz no controle das mamites bovinas (DODD,1983). HUBER (1977) afirma que os efeitos terapêuticos de drogas antimicrobianas dependem de sua correta aplicação. Algumas das

razões para as falhas da antibioticoterapia são : impossibilidade da droga de alcançar as partes mais altas do úbere, ligadas ou não à capacidade secretora da glândula; número de ordenhas e componentes biológicos que funcionam como barreiras orgânicas a passagem de vários compostos (ZIV-SILBERMAN,1967 ; LORDA & GRIMALDI,1979).

As propriedades dos produtos usados como veículo do antibiótico são de capital importância terapêutica, e isto é especialmente enfatizado no caso das infecções do úbere onde, além da preservação ou exaltação da ação terapêutica dos componentes básicos da formulação, deve ser evitada a irritação da glândula (ZIV-SILBERMAN,1967 ; LORDA & GRIMALDI,1979).

O dimetilsulfóxido (DMSO) tem sido citado como possuidor de propriedades farmacológicas que o tornam eficiente auxiliar no tratamento das mamites bovinas. Vários pesquisadores o tem correlacionado com a permeabilização de membranas tissulares a compostos geralmente considerados não dialisáveis, enquanto a penetração de íons dialisáveis é facilitada, com pequeno ou nenhum efeito residual. O composto tem grande poder como solvente, facilita a penetração de drogas através de membranas tissulares, apresenta características anti-inflamatórias, previne ou suprime o efeito local do fenômeno de Shwartzman, tem certa ação diurética, e, ainda é bacteriostático e/ou bactericida para muitos microorganismos, inclusive coliformes tão frequentes nas mamites de origem ambiental (STANLEY et alii,1964; JACOB et alii,1964 ; POTTZ et alii,1967 ; CARROL et alii,1974 ; BLACK,1977).

A total eliminação da mamite não é meta realista mas, a redução da incidência a níveis econômicos aceitáveis poderá ser alcançada (SMITH,1983); assim , no desenvolvimento de novos programas de controle , devem ser considerados a eliminação das infecções, sendo essencial a prevenção de novas infecções através da introdução de eficientes técnicas de manejo (DODD,1983).

Há no Brasil, ainda, predominância do sistema de exploração leiteira denominado "retiro", onde a permanência do bezerro junto a vaca por longo tempo dificulta a utilização de técnicas medicamentosas apropriadas ao controle ou tratamento da mamite.

Os objetivos desta pesquisa são: contribuir ao conhecimento da etiologia da mamite bovina na "bacia" leiteira de Belo Horizonte(MG.); comparar a eficiência de alguns métodos de diagnóstico; estudar a ação do dimetilsulfóxido (DMSO) como aditivo ao veículo da medicação da mamite, via intramamária ; o grau de irritação provocado na glândula ; a interferência sobre a ação terapêutica dos produtos específicos utilizados, seja pela ampliação da ação medicamentosa, melhor dispersão dos medicamentos ou pela maior retenção dos mesmos na glândula mamária.



2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Etiopatogenia

Na etiopatogenia da mamite mais de 30 diferentes tipos de patógenos tem sido responsabilizados ou indiciados. Triagens de campo, em vários países, inclusive o Brasil, citam que, aproximadamente, 95 a 97% das mamites bovinas são causadas por cocos Gram-positivos e o restante engloba os demais microorganismos, incluindo os Gram-negativos, que respondem por 1% das infecções da glândula mamária. (ROBERTS et alii, 1969 ; FIGUEIREDO, 1973 ; FERREIRO et alii, 1979; LANGENEGGER et alii, 1981 ; SILVA et alii, 1983).

Streptococcus agalactiae e *Staphylococcus aureus* diferem dos outros microorganismos por terem como principal reservatório o úbere infectado, sendo classificados como patógenos contagiosos, cuja transmissão é feita, principalmente, durante a ordenha, de quarto de úbere infectado para outro. Podem sobreviver no meio ambiente por curto espaço de tempo. (MURPH, 1956 ; NEWBOUD, 1965 ; SMITH et alii, 1985a).

Enquanto *Streptococcus agalactiae* é considerado como

patógeno quase que obrigatório do interior da glândula mamária, desaparecendo rapidamente na pele íntegra ou lesada, o mesmo não ocorre com o *Staphylococcus aureus* que, devido suas propriedades de degradação enzimática de carboidratos, pode colonizar por longo espaço de tempo na pele lesada, donde 70% das tetas acabam por serem, em algum momento, infectadas pela bactéria (NEAVE et alii, 1969; Mc DONALD, 1977). Outra importante característica deste cocos é de se abrigar em neutrófilos ou em microabcessos no interior da glândula onde permanece relativamente protegido, de acordo com SILVA (1977) e BRAMLEY & DODD (1984).

Apesar de existirem reservatórios extra-mamários de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, estes desempenham papel de pequena importância na patogênica da doença. A eliminação das infecções do rebanho é alcançada pelo controle da transmissão durante a ordenha, combinado com descarte e antibioticoterapia. Estas fontes extra-mamárias, no entanto, continuam responsáveis pela baixa taxa de reinfecção dos rebanhos controlados (DALEEL & FROST, 1967; KINGWILL et alii, 1970; BRAMLEY & DODD, 1984). Tentativas de isolamento do *Staphylococcus aureus* do piso e da cama utilizados por 62 vacas com mamite estafilocócica, não obtiveram sucesso (NEWBOUD, 1965).

A infecção do úbere causada por patógenos outros que *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* é denominada, por muitos autores, de mastite ambiental e definida como infecção por microorganismos cujo reservatório natural ou habitat está intimamente ligado ao meio em que o animal vive. Os causadores mais frequentes deste tipo de infecção são

denominados bacilares ou coliformes. A primeira expressão é inadequada por ,obviamente , não incluir cocáceas como *Staphylococcus epidermidis* ; *Streptococcus dysgalactiae* ; *Streptococcus uberis* ; *Streptococcus faecalis* e outros do gênero,também considerados ambientais. A última, além das incorreções acima citadas, inclui outros microorganismos fermentadores de lactose da família Enterobacteriáceae não pertencente a tribo Escherichia, Assim sob a denominação de coliformes estão reunidos germes do gênero *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, frequentes agentes da mamite ambiental em bovinos(MURPH,1956 ; EBERHART,1977 ; SMITH et alii,1985a ; OZ et alii,1985).

Streptococcus dysgalactiae e *Streptococcus uberis* podem ser transmitidos durante a ordenha. Entretanto,outras fontes de contaminação extra úbere infectado são importantes, pois existem evidências da sobrevivência e multiplicação destes patógenos em vários outros reservatórios, destacando-se cama e piso de estábulos ou da casa de ordenha. O *Streptococcus dysgalactiae* tem relacionamento mais estreito com a ordenha. Assim, novas infecções podem ser controladas com algum sucesso pela higiene e terapia adequada, enquanto que, com referência ao *Streptococcus uberis* é baixo o índice de eficiência destas medidas(JACKSON,1970 ; BRAMLEY,1982). Entretanto, há que ser considerada a possibilidade de que infecções possam ocorrer em novilhas e vacas "secas", demonstrando independência com a ordenha (BRAMLEY & DODD,1984). Segundo citação de KING (1981) o *Streptococcus uberis* difere dos outros cocos causadores de

mamite por ser isolado de várias outras partes do organismo animal, em ausência de mamite. Todavia, tem sido encontrado em grande número no úbere, sugerindo que sua patogenicidade está mais ligada à glândula mamária.

FORBES & HEBERT (1968), estudando oito amostras de *Staphylococcus epidermidis*, sugeriram que esta bactéria poderia ser patogênica para a glândula mamária, por estar relacionada a contagens de 1.000.000 células/ml de leite. Esta hipótese foi confirmada por HOLMBERG (1973), que demonstrou em infecções experimentais que o *Staphylococcus epidermidis* provocava reações no úbere com contagens acima de 500.000 células/ml de leite. O meio ambiente é a principal fonte de contaminação do úbere por coliformes, especialmente naqueles rebanhos em regime de estabulação. Estes germes, realmente, não colonizam no canal ou nas lesões da teta, (HILL et alii, 1979 ; BRAMLEY et alii, 1979). Somente a contaminação ambiental por coliformes não produz infecção das glândulas mamárias. Fatores adicionais são requeridos para iniciar a invasão e o processo patogênico, como o estresse e a taxa de infecção ambiental (DeHART et alii, 1979).

FIGUEIREDO (1962), trabalhando em casos de mamite, no município de Betim, Minas Gerais, identificou a seguinte frequência para os agentes etiológicos: *Staphylococcus aureus* 55,4% ; *Streptococcus spp.* 35,1% ; *Escherichia coli* 3,2% ; *Klebsiella pneumoniae* 1,1% ; *Corynebacterium pyogenes* 2,1% e *Streptococcus agalactiae* 1,1%.

SILVA (1977), em rebanho do município de Florestal, Minas Gerais, encontrou a seguinte frequência para os casos de

mamite: *Staphylococcus aureus* 83,5% ; *Staphylococcus coagulase* negativa 0,7% ; *Streptococcus uberis* 13,9% ; *Streptococcus dysgalactiae* 0,7% e infecções mistas 1,1%.

LANGONI et alii (1984), trabalhando com 150 vacas em lactação de duas granjas produtoras de leite tipo B, encontraram como microorganismos mais prevalentes os estafilococos com 55,8%, vindo a seguir as enterobactérias com 18,3%, as corynebactérias com 9,6% e por último os estreptococos com 9,2%. As médias de prevalência foram, respectivamente para as granjas 1 e 2: *Staphylococcus aureus* 39,9 e 33,6% , *Staphylococcus epidermidis* 17,7 e 20,4% , *Micrococcus spp.* 2,0 e 9,9% , *Streptococcus agalactiae* 6,1 e 1,9% , *Streptococcus dysgalactiae* 1,0 e 0,0% , *Streptococcus uberis* 3,1 e 3,3% e *Streptococcus zooepidemicus* 0,0 e 2,9% entre outros microorganismos isolados.

MASCARENHAS JUNIOR (1988), trabalhando com cinco rebanhos da "bacia" leiteira de Belo Horizonte (MG.), não relatou o encontro do *Streptococcus agalactiae*, entre os microorganismos isolados. De 208 testes de Hotis positivos para estafilococos, foi possível isolar 120 amostras secretoras de coagulase.

LINS(1988), em pesquisa realizada em um rebanho do município de Florestal (MG.), não encontrou o *Streptococcus agalactiae* entre os microorganismos presuntivamente identificados, tendo o *Staphylococcus sp.* dominado a etiologia com 22,39% de isolamentos.

2.2. Apresentação Clínica

A infecção da glândula mamária pode variar de

manifestações clínicas a sub-clínicas e/ou de super aguda a crônicas. As mastites causadas por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* são, raramente, agudas ou super agudas. Apresentam-se em geral como sub-clínicas ou crônicas de longa duração. O quadro agudo causado por estafilococos coagulase negativos, e *Streptococcus* outros que o *Streptococcus agalactiae* são relativamente mais frequentes, porém, o super agudo é raro. Já a mastite sub-clínica por *Enterobacteriaceae* é incomun, predominando a forma super aguda ou aguda (EBEHART et alii, 1979 ; BRAMLEY & DODD, 1984).

NEAVE et alii (1968), trabalhando com cerca de 1.100 vacas em lactação, provenientes de 16 rebanhos, na Inglaterra, num período de seis a 12 meses, encontraram 1.414 infecções do úbere, distribuídas em mastites clínicas e sub-clínicas. Destas, *Staphylococcus aureus* representou 47,0%, *Streptococcus agalactiae* 2,0%, *Streptococcus dysgalactiae* 28,0%, *Streptococcus uberis* 15,0% e outros patógenos 4,0%. Das infecções sub-clínicas, 50,0% tornaram-se clínicas no prazo de um ano.

Durante 20 anos de estudos em mastite, em Nova York, USA, (1946 a 1965), compilados por ROBERTS et alii (1969), foram examinadas 242.871 vacas, originárias de 7.320 rebanhos, obtendo-se 27,0% de *Streptococcus agalactiae*, 18,0% de outros *Streptococcus*, 13,0% de *Staphylococcus* e 1,0% de bacilares. Aproximadamente 75,0% das infecções foram sub-clínicas, 24,0% com moderados sinais clínicos e 1,0% com severos sinais clínicos, inclusive sistêmicos. Os bacilos Gram-negativos foram os principais responsáveis pelos casos severos, seguidos em



ordem decrescente pelos *Staphylococcus*, outros *Streptococcus* que o *agalactiae* e pelo *Streptococcus agalactiae*.

LOTAN (1970), em uma série de 31 infecções por *Escherichia coli*, classificou 15,0% de severas.

BUSHNEL (1974), em grande rebanho no qual coliformes foi a predominante causa de mamite clínica, estimou em 10,0% a forma super aguda tóxica e destas 10,0% levaram à morte, 70,0% das tetas tornaram-se agalacticas e 20,0% retornaram a produção. Algumas vacas agalacticas voltaram a produção em lactações subsequentes.

JASPER et alii (1975), relataram o isolamento de 158 coliformes de oito rebanhos da Califórnia, USA, sendo 63,0% de *Escherichia coli*, 11,0% de *Klebsiella pneumoniae* e 10,0% de *Enterobacter aerogenes*. Em um destes rebanhos o percentual de mamites clínicas foi de 30,0 a 47,0%, com cerca de 80,0% destas causadas por coliformes.

EBERHART (1977), relata que em oito rebanhos do Estado de Nova York, USA, incluídos em programa de controle de mamite, durante seis anos, a média de casos clínicos por coliformes foi de 18,5% ao ano, ou 24,0% de todas as mamites clínicas.

EBERHART & BUCKALEW (1977), acompanhando rebanho de 150 vacas em lactação, por 3 anos, na Pennsylvania, EUA, detectaram 2,9% de mastite clínica causada por *Streptococcus agalactiae*, 32,2% por outros estreptococos, 7,5% de *Staphylococcus aureus* e 35,5% por Gram-negativos. Entre novas infecções ocorridas no mesmo período, 8,2% foram por *Streptococcus agalactiae*, 10,7%

por *Staphylococcus aureus*, 54,1% por outros estreptococos e 25,7% por Gram-negativos.

MCDONALD (1977), compilando trabalhos realizados em matadouros, concluiu que *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* foram responsáveis por 22,4% e 19,6%, respectivamente, dos quartos infectados e ambos por 20,0% dos animais infectados; *Streptococcus agalactiae* respondeu por 7,7% dos quartos e 3,2% dos animais; outros estreptococos infectaram 9,4% dos quartos e 44,0% dos úberes; outros agentes são indiciados em 2,0% das infecções e em 11,0% dos animais.

KING (1981), relata panorama da prevalência da mamite em vários países, encontrando percentuais médios para *Streptococcus agalactiae* de 6,3%, *Streptococcus dysgalactiae* 1,1%, *Streptococcus uberis* 1,3% e *Staphylococcus aureus* 13,4%; as infecções evoluíram para o estágio clínico na proporção de: 6,0 a 90,0 das devidas a *Streptococcus dysgalactiae*, 3,9 a 44,0 das por *Streptococcus agalactiae*, 0,3 a 50,0 das por *Streptococcus uberis* e 1,9 a 24,1 das por *Staphylococcus aureus*.

FRANCIS et alii (1986), trabalharam, durante três anos, com 641 rebanhos, encontrando o *Streptococcus uberis* como o mais prevalente em casos de mamite clínica, com o percentual médio de 16,0 a 18,0%.

LANGENEGGER et alii (1986), trabalhando com três rebanhos isolaram de casos sub-clínicos de mamite bovina 64 amostras bacterianas da família Micrococcaceae e 63 culturas da família Strptococcaceae apresentando, respectivamente, os seguintes percentuais: *Staphylococcus aureus* 76,5,

Staphylococcus epidermidis 10,9, *Micrococcus spp* 12,5, para a segunda família foram encontrados *Streptococcus agalactiae* 71,4%, *Streptococcus dysgalactiae* 11,1% *Streptococcus uberis* 11,1% e outros *Streptococcus* 6,4%. Consideram, ainda, que a situação epidemiológica quanto a agentes da mamite bovina não alterou, significativamente, nos últimos decênios.

2.3. Incidência da mamite bovina

Infeções causadas por enterobactérias são, principalmente, de curta duração. MURPHY & HANSON (1943), trabalhando em New Jersey, EUA, verificaram que de 79 infecções por *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes*, 12 (15,1%) permaneceram apenas durante o colostro, 28 (35,4%) persistiram em média por 14 dias, 11 (13,9%) duraram aproximadamente 30 dias e 28 (35,4%) tornaram-se crônicas persistindo por até 20 meses.

Exposições dos animais por longo tempo em fontes de contágio, como água e cama contaminados, aumentam a taxa de novas infecções por coliformes (RADOSTITIS, 1961 ; HOWEL, 1972).

ROBERTS et alii (1969), sugerem que as lesões de teta e pele contaminadas, associadas a pouca higiene, tendem a aumentar o número de casos por patógenos contagiosos. Quando práticas de higiene e desinfecção são adotadas estas infecções tendem a diminuir, demonstrando correlação mais estreita ou obrigatória com o animal.

LOTAN (1970), relatou que em 31 casos clínicos de mastite por *Escherichia coli*, 24 (77,5%) tiveram recuperação, sem nenhum tratamento, em oito dias.

Quando o nível de bactérias excede 10⁶ /gramas de

peso seco das camas já utilizadas, as taxas de mamite tendem a aumentar, indicando estreita correlação entre os níveis de microorganismos na cama e piso dos animais e a incidência de mamite ambiental (BRAMLEY & NEAVE,1975).

A maior taxa de incidência de infecções por microorganismos, mormente os ambientais, ocorre durante as estações mais quentes e coincide com a maior taxa de bactérias no meio ambiente. Alguns autores associam estas infecções com o estresse causado nos animais, em especial, naqueles de boa produção, pelo aumento da temperatura e da umidade (CARROL,1977 ; EBERHART et alii,1979 ; HILL et alii,1979).

BRAMLEY & DODD (1984), estudando vários rebanhos durante um ano, citam que 90,0% das infecções por estafilococos persistem por mais de três meses e que 80,0% das infecções presentes no início do período "seco" se mantêm até a próxima lactação. SMITH et alii (1985a) citam que das infecções por estreptococos, 36,0% se mantêm por 30 dias ou menos, e, 20,0% persistem por 100 dias ou mais. GROMMERS et ali (1985), estudando 249 infecções por estreptococos e 433 por estafilococos, determinaram que 49,0% das infecções por estreptococos e 54,0% das por estafilococos tiveram eliminação espontânea. A média da duração das infecções por *Streptococcus agalactiae* foi de 10,8 semanas, 9,9 para *Streptococcus dysgalactiae*, 10,4 para *Streptococcus uberis* e 12,8 para *Staphylococcus aureus*.

SMITH et alii (1985a), trabalhando com 270 animais durante cinco anos,determinaram que, aproximadamente, 57,0% das

infecções por coliformes duraram menos que 10 dias, 69,0% mantiveram-se por 30 dias ou menos e 13,4% permaneceram por 100 dias ou mais. Afirmaram, ainda, que a taxa de infecção intramamária no verão foi três vezes maior que nas outras estações e foi associada ao elevado número de bactérias no piso e cama dos animais.

2.4 Controle

2.4.1 Manejo e Desinfecção

Estabulação adequada, destacando os fatores ligados a iluminação, umidade, circulação de ar e área disponível por animal, podem minimizar o estresse e o risco de contaminação da glândula mamária (HOWELL, 1972; TURNE & SALMOSEN, 1973).

OLIVER et alii (1956), compararam diferença de manejo e incidência de novas infecções em rebanho livre de *Streptococcus agalctiae* entre 279 quartos em início de "secagem", dos quais 138 lavados com toalhas embebidas em hipoclorito de sódio (800 ppm) e imersos, por 20 segundos, em tintura de iodo a 5,0%, repetindo-se 24 horas depois, e 141 quartos controle. A diferença entre os dois grupos foi altamente significativa para *Staphylococcus aureus*, não sendo, entretanto, efetivo para *Streptococcus* outros que o *agalctiae*.

Seleção genética, imunização, higiene dos animais e ordenhadores antes e após ordenha, das instalações e controle da ordenhadeira mecânica são itens correlacionados com o combate da mamite (ROBERTS et alii, 1969).

SILVA (1979), avaliando emulsão de chlorexidine a 1,5% na prevenção de novas infecções por imersão de tetas de 31

vacas, concluiu que a redução da incidência de novas infecções, na média de 56,5%, era estatisticamente significativa, sendo que para *Staphylococcus aureus* a redução foi de 55,6% e para *Streptococcus agalactiae* de 60,0%.

SILVA et alii (1983), em sistema de ordenha mecânica, avaliaram o desempenho de solução de iodo glicerizada (KI-0,85%, I-0,85% e glicerina a 15,0%), demonstrando sua efetividade em condições normais de ordenha na redução de 67,6% dos casos de infecções por *Staphylococcus aureus* e de 44,4% de *Streptococcus uberis*. Entretanto, a redução de novos casos em condições de sobre-ordenha e flutuações do vácuo, não foi estatisticamente significativa, sendo que o número de isolamentos foi reduzido em 23,6% e 3,0%, respectivamente, para *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis*.

BODIE & NICKERSON (1986), avaliaram o grau de proteção conferido contra novas infecções por imersão das tetas em solução a 1,5% de dodecylaminoalkyl glicine. As tetas foram desafiadas, diariamente, durante cinco semanas frente a suspensão de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. Comparado às testemunhas, foi obtida redução da incidência das infecções em 8,2% e 67,5%, respectivamente, para *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*.

2.4.2. Contagem global de células somáticas (C.G.C.S), bacterioscopia e bacteriologia

Os microorganismos causadores de mamite, ao invadirem e colonizarem na glândula mamária, provocam reação na qual há o aumento dos níveis normais de células do leite, tanto

parênquimatosas como leucocitárias. A quantificação destes valores foi considerada como parâmetro indicativo de infecção da glândula. MERCHANT & PACKER (1949), citam que alguns pesquisadores consideram contagens acima de 250×10^3 células/ml de leite como indicativo de anormalidade ou de infecção. Para PLASTRIDGE (1958), porém o leite de quartos sadios pode conter até 500×10^3 células/ml, sendo consideradas contagens maiores como indicativo de infecção ou leite não regular

FIGUEIREDO (1962), pesquisando 129 vacas de rebanhos do município de Betim, Minas Gerais, em sistema de retiro, considerou contagens acima de 500×10^3 células/ml de leite como sinal de anormalidade ou de infecção da glândula. Concomitantemente, observou concordância de 85,2% entre a bacterioscopia e a bacteriologia nos casos positivos e 83,3% nos negativos. Observou que a menor eficiência da bacterioscopia para espécimes negativos pode ser devida a escassez de bactérias ou falhas na técnica de coloração ou de microscopia.

SCHULTZ (1977), considera como normal a glândula com até 500×10^3 células/ml de leite, mesmo com o isolamento de algum microorganismo considerado patogênico para o úbere.

SILVA (1977), utilizando a C.G.C.S. e bacterioscopia como critério para o diagnóstico de infecção do úbere de bovinos, obteve a correlação de 85,4% entre a bacterioscopia e a bacteriologia para os casos positivos e 85,2% para os negativos. A diferença de 12,6% entre as reações CMT positivas com bacterioscopia negativa, poderia ser ocasionada por injúrias



mecânicas à glândula, enquanto o percentual de 6,4% encontrado entre bacterioscopia positivo e CMT negativo pode ser decorrência de contaminação das amostras. Os resultados observados para CMT positivo e bacterioscopia positiva sugerem estar as glândulas realmente infectadas.

De acordo com KIRK (1984a), alguns autores consideram contagens abaixo de 100×10^3 células/ml como leite normal, de 100 a 400×10^3 células/ml como indicativos de infecção em desenvolvimento e acima destes parâmetros, como infecção estabelecida. O mesmo autor (1984b), baseado nas quedas de produção dos quartos afetados e os teores globais de células somáticas, elaborou uma escala denominada " Escore Linear " com o qual se obtém maiores amplitudes para julgamento das contagens de células somáticas no diagnóstico da mamite bovina.

2.5. Tratamento das Mamites Bovinas

2.5.1. Resistência Bacteriana

O uso de antibióticos e quimioterápicos de maneira abusiva e indiscriminada, quase que empírica, além de não oferecer resultados satisfatórios, encarece os programas de controle e propicia o aparecimento de amostras bacterianas resistentes. (FIGUEIREDO,1962 ; ROBERTS et alii,1969 ; LEITE et alii,1976 ; LANGONI et alii,1984).

A resistência pode ser transferida de um microorganismo a outro, do mesmo clone ou não, inclusive a espécies diferentes, patogênicas ou não, desenvolvendo resistência cruzada a uma droga ou, geralmente, a várias outras. Este fenômeno acontece "in vitro" a concentrações muito

superiores as alcançadas pelas drogas "in vivo" (WATANABE, 1963 ; TRABULSI, 1973).

EVANS et alii (1968), relatam o cultivo de duas amostras de *E. coli*, no México, em 1956, com fatores de resistência com alto grau de especificidade para penicilinas semi-sintéticas, como ampicilina, antes mesmo que estas fossem produzidas, indicando que o desenvolvimento de resistência não implica, necessariamente, no contato direto com a droga.

O fenômeno da resistência dos microorganismos às drogas, considerado mutação cromossômica espontânea de amostras sensíveis, assumiu relevante importância com a descoberta, em fins da década de 1950, da resistência bacteriana transferível ou "resistência infecciosa" devido a facilidade com que se propaga (MORENO, 1973 ; TRABULSI, 1973).

Esse fator de resistência seria um cromossoma adicional, menor que o próprio cromossoma, denominado de plasmídeo ou epissoma. Em sua molécula estariam contidos vários genes determinantes da replicação, infectividade, resistência a agentes antimicrobianos e, inclusive, caracteres de virulência (DATTA, 1973 ; OLARTE & GALINDO, 1973).

COSTA et alii (1985), estudaram "in vitro" a sensibilidade de 951 amostras de *Staphylococcus spp* e 590 de *Streptococcus spp*, obtidas de casos de mamite bovina, identificando como resistentes, a penicilina e estreptomicina, 92,0 e 65,0% das amostras de *Staphylococcus spp*, respectivamente,; pouco sensíveis 2,0 e 25,0% e 6,0 e 10,0% como sensíveis. Quanto aos *Streptococcus spp* os percentuais de

resistência para penicilina e estreptomicina foram 60,0 e 91,0% respectivamente, 27,0 e 9,0% para a categoria de pouco sensível e 13,0 e 0,0 para a sensível.

HINCKLEY et alii (1985), avaliaram os graus de sensibilidade a vários antibióticos em 15 rebanhos infectados por *Streptococcus spp* e sete por *Staphylococcus spp*, relatando 80,0% de sensibilidade à penicilina para os estreptococos, 20,0% de pouca sensibilidade, não encontrando nenhuma amostra resistente. Para os estafilococos os padrões de susceptibilidade foram de 14,4% de amostras sensíveis, 42,8% de sensibilidade intermediária e 42,8% de resistentes. Relatam, ainda, que a correlação entre os padrões de sensibilidade dos grupos tratados e a eficiência dos tratamentos, foi superior 47,0% do previsto; as taxas de curas foram 37,0% similares as esperadas enquanto que 16,0% se situaram abaixo do previsto pelos padrões de sensibilidade "in vitro".

LANGENEGGER et alii (1986), avaliaram a eficácia "in vitro" da penicilina frente a *Staphylococcus spp* e *Streptococcus spp*, encontrando taxas de sensibilidade para os estafilococos de 41,1%, 11,8% de pouca sensibilidade e 47,1% de resistência. Os estreptococos foram 61,2% sensíveis e 38,8% pouco sensíveis, não encontrando resistência à penicilina.

2.5.2. Antibioticoterapia

2.5.2.1. Generalidades

Tanto a mamite sub-aguda como a aguda podem ter recuperação após apropriada antibioticoterapia ou, mesmo, espontânea. Infecções de glândula mamária não tratadas podem

permanecer por longo tempo como sub-clínica ou progredir para clínica e, novamente, retornar a sub-clínica. Porém, a grande maioria apresenta recuperação espontânea (MURPHY, 1956 ; DODD, 1964 ; SMITH et alii, 1985b).

Sem dúvida, a antibióticoterapia é de grande auxílio no tratamento das mamites. Para tanto é necessário, porém, que o medicamento atenda certos princípios básicos como base farmacológica efetiva contra os agentes infecciosos; capacidade de atingir o local infectado e manutenção de concentrações terapêuticas pelo tempo necessário para debelar a infecção; fácil excreção em tempo hábil mínimo, prejudicando o menos possível a utilização do leite "in natura" ou industrializado como sugerido por MARTH & ELLICKSON (1959) e STANG (1977). Estes autores demonstraram considerável variação nas dosagens da penicilina e estreptomicina, via intramamária, que vão desde 10.000 a 1.000.000 de UI para a penicilina e 22 a 1.000 mg para a estreptomicina. Relatam, ainda, que a partir de 1957 o FOOD DRUG ADMINISTRATION recomenda 100.000 UI como dose máxima para a penicilina, via intramamária, visto que esta possui maior rapidez de excreção com os mesmos efeitos terapêuticos de doses superiores. Além disto, é importante o desempenho dos veículos e adjuvantes que devem preservar e, se possível, exaltar os efeitos terapêuticos das bases farmacológicas, sem agredir as estruturas glandulares (ZIV-SILBERMAN, 1976 ; LORDA & GRIMALD, 1979). Há, ainda, a considerar a facilidade de difusão dos medicamentos intra-úbere, considerada como principal causa dos fracassos da antibióticoterapia. Esta difusão é dificultada pelas barreiras

orgânicas e físicas como capacidade produtora, número e tipo de ordenhas e mesmo a força da gravidade, de acordo com LORDA & GRIMALDI (1979).

HUBER (1977), cita que a efetividade das drogas antimicrobianas depende de vários fatores, entre eles, do agente etiológico, da utilização apropriada da droga, da fase da infecção e de medidas de controle sanitário. Cita, também, que a susceptibilidade a droga é estreitamente relacionada ao gênero e espécie do microorganismo.

2.5.2.2. Uso da penicilina e estreptomicina

BLACKBURN (1956), avaliou o efeito de três formulações de uso intramamário para o controle de 338 quartos com mamite por *Staphylococcus* coagulase positivo, *Streptococcus* hemolítico em infecções isoladas ou mistas, utilizando formulação com 100.000 UI de penicilina, outra com 25 mg de diidroestreptomicina e a combinação de 100.000 UI de penicilina mais 10 mg de diidroestreptomicina. Os tratamentos variaram de uma única aplicação até três consecutivas, alcançando, para a fórmula associada, 61,0% de cura dos estafilococos e 80,0% dos estreptococos, sendo que o percentual de cura para infecções recentes foi de 70,0 e 86,0% e para casos crônicos de 55,0 e 75,0% , respectivamente, para estafilococos e estreptococos. Também concluíram que a associação dos antibióticos obteve melhores resultados do que quando empregados isoladamente.

SANDERSON (1966), comparou o efeito terapêutico intramamário da penicilina G procaína, veiculada em bases de liberação lenta (óleo mineral mais monoestearato de alumínio) e

rápida (óleo vegetal), contra infecções intramamárias por *Streptococcus agalactiae*. O tratamento com base de liberação rápida alcançou 85,0% de cura na dose de 300.000 UI e na base de liberação lenta atingiu a 95,5% com a dose de 100.000 UI.

ADANS et alii (1968), trabalhando com 578 vacas de leite e comparando três preparações intramamárias, uma de 500 mg de cloxacilina benzatínica, outra de 250 mg de novobiocina sódica e 300.000 UI de penicilina, ambas em veículo de liberação lenta, uma de 500 mg de espiramicina em veículo aguoso obtiveram, em ordem de apresentação das soluções, 62,0 , 64,1 e 40,0% de cura para *Staphylococcus aureus* ; 100,0 , 100,0 e 96,0% para *Streptococcus agalactiae* ; 100,0% nas três preparações para *Streptococcus dysgalactiae* e 77,8 , 72,4 e 72,0% para *Streptococcus úberis*, respectivamente.

FAULL & WARDS (1975), avaliaram o tratamento da mamite com duas preparações, via intramamária, contendo a primeira 100 mg de penicilina G procaína e 100 mg de diidroestreptomicina e outra com 200 mg de neomicina ,200 mg de lincomicina e 5 mg de metilpredinosolona, ambas em base de liberação rápida, aplicadas em duas propriedades leiteiras, a primeira com 100 animais em lactação e a segunda com 300, sendo que na primeira foram tratados 25 casos por formulação e na segunda, 75 casos. A primeira formulação foi administrada uma vez ao dia, durante três dias, e a outra durante tres ordenhas consecutivas, alcançando a primeira 51,0% de cura e a segunda 61,0% de todos os casos, sendo que a primeira eliminou 52,0 , 63,0 e 42,0% de coliformes , estreptococos e estafilococos,

respectivamente, e a segunda 61,0, 66,0 e 43,0%.

SILVA (1977), utilizando associação de 0,6 g de trimethoprim e 3,0 g de sulfametoxazole, em veículo aquoso-oleoso, obteve 34,3% de cura para *Staphylococcus aureus*, 33,3% para *Staphylococcus epidermidis* e 76,0 para *Streptococcus uberis*. Considerou, ainda, que a velocidade de difusão do medicamento é importante no tratamento das mamites, em especial para o *Staphylococcus aureus*.

2.5.2.3. Irritabilidade causada pela antibioticoterapia

A glândula mamária reage a qualquer substância estranha que de alguma forma, penetre em seu interior. O grau de reação depende diretamente da natureza da substância em questão. No tratamento das mamites bovinas, via intramamária, tanto o veículo como a base farmacológica, tem importante papel na irritação do úbere.

SPENCER et alii (1947), ao ensaiarem a penicilina, via intramamária, em diferentes veículos, concluíram que a maior irritação aconteceu nas primeiras 24 horas e que dos veículos aquoso e oleoso-aquoso, o óleo de amendoim foi o menos irritante para o úbere.

LEITE et alii (1976), observaram que a penicilina, em veículo aquoso, era mais irritante do que em óleo e que causava reações máximas até cinco dias após a aplicação.

SILVA (1977), obteve maiores graus de irritação entre 48 e 72 horas após aplicação da associação de trimethoprim e sulfametoxazole, em veículo oleoso, sugerindo que tal fato seja devido a retenção do medicamento por mais tempo do que quando em



veículo aquoso e sua menor velocidade de difusão.

2.5.3. Dimetilsulfóxido (DMSO) como adjuvante da antibioticoterapia

ZIV-SILBERMAN (1967), comparou a eficácia de antibióticos, baseado em suas atividades "in vitro", no tratamento de mastites estafilocócicas crônicas, veiculados em soluções oleosa e aquosa e em solução de DMSO na concentração de 90,0%, obtendo melhores índices de cura quando o veículo era DMSO na concentração citada, tanto para vacas secas como para as em lactação, com percentuais de 87,7 e 64,4 respectivamente, contra 54,0 e 16,3% em base oleosa e 50,0 e 44,4% em base aquosa, sem DMSO. Considerou que o melhor desempenho das fórmulas contendo DMSO como devido ao aumento da permeabilização de membranas.

MERCER & TESKE (1977), sugerem que DMSO possa ser efetivo auxiliar no tratamento das mastites estafilocócicas crônicas devido sua propriedade de permeabilização de membranas biológicas, com pequeno ou nenhum efeito residual.

LORDA & GRIMALD (1979), avaliaram o DMSO em uma formulação contendo cloranfenicol, nifuroxacida e prednisolona contra várias outras associações de antibióticos e anti-inflamatórios, sem DMSO obtendo melhores resultados com a formulação contendo DMSO, sendo que os melhores índices de cura foram obtidos contra mastites crônicas, 78,0% e sub-clínicas 74,0% de animais em lactação; as mastites agudas de vacas em lactação e crônicas de vacas "secas" ficaram com 69,0 e 66,0% , respectivamente. Sugeriram serem estas diferenças causadas pelas

propriedades de solvente, permeabilização de membranas, ação anti-inflamatória e anti-microbiana do DMSO.

LANGONI et alii (1984), em experimentos de tratamento de mamites clínicas e sub-clínicas, com 100.000 UI de penicilina e 200 mg de estreptomicina em veículo aquoso com e sem 20,0% de DMSO, via intramamária, em três aplicações consecutivas, alcançaram índice de cura de 80,0% com a fórmula sem DMSO e 91,0% com DMSO, concluindo haver associação entre o percentual de cura e a utilização do DMSO nas fórmulas.

2.5.4. Liberação de resíduos de antibióticos no leite

De acordo com FOLEY et alii (1949), o tempo de permanência do antibiótico na úbere está diretamente relacionado ao veículo. Quando 100.000 UI de penicilina foi veiculada em uma combinação de óleo mineral, derivados de lanolina, propileno glicol, água e agentes hidrofílicos anionicos, foram detectados 0,014 a 4,0 UI/ml/leite, 72,0 horas pós tratamento. A mesma dose veiculada apenas em solução de água, propileno glicol e agente hidrofílico aniônico, não foi detectado resíduos, respectivamente, as 24 e 48 horas após o tratamento.

JACKSON & BRYAN (1950), relataram que a produção individual interfere com a liberação de antibióticos pela glândula mamária. Os maiores níveis de liberação foram obtidos no início e final da lactação. Durante o terço médio de lactação, com a administração de 300.000 UI de penicilina em veículo oleoso, em animais sádios, obtiveram 0,5 UI ou mais as 144 horas e 0,06 UI as 216 horas pós tratamento

PLASTRIDGE (1958), encontrou após 12, 24, 48, e 72

horas de uma infusão intramamária de 100.000 UI de penicilina, em vacas, variação das quantidades de resíduos no leite correspondentes a 3 a 156, 1 a 25, 0 a 3 e 0 a 1 UI por mililitro de leite respectivamente.

O uso incorreto ou indiscriminado de antibióticos no tratamento das infecções bovinas, em especial as mamites, muitas vezes leva a ocorrência de resíduos no leite. O Food and Drug Administration (FDA), considera o leite contendo resíduos de antibióticos como adulterado e, portanto ilegal, por três principais motivos : o leite de vacas tratadas pode conter grande número de patógenos potenciais; metabólicos ativos da droga utilizada podem resultar em casos de anafilaxia e, por fim, resíduos de drogas que, mesmo em quantidades mínimas, intervêm no controle de qualidade e processamento da leite (BISHOP, 1984 ; KIRK & KANNENE , 1984). A partir de 1978 a lei que regula o leite pasteurizado foi modificada permitindo o máximo de 0,1 ppm de resíduos de penicilina no leite ou em derivados líquidos (GILMORE et alii ,1986).

COULSON & ROCHFORD (1985), observaram a liberação de resíduos de antibióticos em sete vacas fríseas sadias, após três aplicações, intervaladas de 24 horas, de 10 ml da preparação intramamária contendo penicilina G procaína, neomicina, diidroestreptomicina, novobiocina e prednisona, utilizando o Intertest e Devoltest F. Concluíram que todas as amostras foram negativas às 72 horas após a última aplicação sendo que o critério para a negatividade foi menos de 0,003 UI de penicilina por ml de leite.

EGAM & MEANEY (1985) avaliaram a persistência de resíduos de antibióticos em leite de animais com mamite por *Staphylococcus aureus*, tratadas via intra-mamária, em três aplicações intervaladas de 12 e 24 horas, respectivamente, de 500.000 UI de penicilina G sódica e 500 mg de cloxacilina sódica. Foi utilizado o método de difusão em discos e o *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 como microorganismo de teste. Concluíram que houve liberação de resíduos de penicilina por até 72 horas de 0,008 UI/ml de leite e cloxacilina por até 64 horas na taxa de 0,025 Mg/ml, após a última aplicação

LAROCQUE & NEVILLE (1985) avaliaram a presença de resíduos de penicilina G potássica e sulfato de estreptomicina, em leite de vacas tratadas, via intramamária, utilizando o método de difusão através de cilindros. Para os ensaios com penicilina foram usados o *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* (ATCC 12980) e *Micrococcus lutea* (ATCC 9341) como microorganismos teste e para a estreptomicina foi utilizado o *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). Foi relatado para a penicilina que o método com o *B. stearothermophilus* é mais sensível que o método com o *M. lutea*, sendo que ambos detectaram apreciáveis quantidades de resíduos por até 180 horas pós aplicação (média de 0,34 UI/ml de leite). Para estreptomicina foi detectado resíduos de cerca de 0,20 microgramas/ml de leite por até 348 horas pós administração. Concluíram, também, que a penicilina não interfere com os ensaios de estreptomicina, usando o *B. subtilis*.

2.6. Dimetilsulfóxido (DMSO) como auxiliar do tratamento das mamites bovinas

2.6.1. Metabolismo do DMSO

É provável que DMSO, normalmente encontrado no leite do gado bovino, não seja produto de microorganismos, mas de processos metabólicos do próprio animal (WILLIAMS et alii, 1966).

É sabido que o DMSO é metabolizado no homem e animais na forma de dimetilsulfito (DMS) e dimetilsulfona (DMSO). A forma de dimetilsulfóxido é predominante. As formas de DMSO^2 e DMSO^2 são encontrados em todos os tecidos, predominando o DMSO^2 . Pequena quantidade é transformada em DMS e exalada. As ligações do DMSO nos tecidos são, em grande maioria, reversíveis, e somente 2,0% são irreversíveis. Provavelmente, a principal rota de excreção do DMSO seja a urina.. (KOLB et alii, 1967 ; GERHADS & GIBIAM, 1967 ; WONG & REINERTSON, 1984 ; JACOB et alii, 1971).

No gado bovino os padrões de metabolismo e excreção do dimetilsulfóxido são diferentes dos animais de laboratório, cão, macaco e do homem. Em bovinos, onde os principais órgãos de excreção do produto são os pulmões e rins, o DMSO é metabolizado em maior quantidade em dimetilsulfito e em menor quantidade em dimetilsulfona. Após 28 horas da aplicação, DMSO e DMS são totalmente excretados restando no organismo apenas DMSO^2 . Na urina, DMSO^2 alcança valores máximos dentro de seis a 12 horas, e, rapidamente, decresce desaparecendo 12 a 18 horas após aplicação. Os valores de DMS seguem idênticos padrões. DMSO^2 , em bezerros, alcança valores máximos dentro de 30 a 40 horas e

retorna ao seu normal aproximadamente em sete dias; para vacas estes valores são de 12 horas para o máximo de concentração e tres a cinco dias para retornar ao normal. Após aplicação intramamária, 36,8 a 44,60% do DMSO e metabólicos são excretados pela urina e 2,0 a 6,8% pelo leite. Mais de 50,0% do percentual excretado no leite ocorre nos primeiros três a cinco dias após aplicação (TIEWS et alii,1975).

Em bovinos sacrificados oito dias após tratamento tópico, parenteral e intramamário com DMSO, não foi detectado o composto no sangue ou nos tecidos (KOLLER,1976).

2.6.2. Atividades biológicas

2.6.2.1. Penetração nas membranas

Muitos trabalhos tem demonstrado que DMSO pode atravessar várias membranas do organismo animal, sendo distribuído largamente pelo corpo. A integridade das membranas parece não ser afetada, com exceção de doses muito concentradas com 90 a 100% do composto e em contato direto com a membrana, o que é muito difícil de acontecer em doses terapêuticas (WOOD & WOOD,1975 ; RICHARDSON,1976 ; WONG & REINERTSON,1984).

2.6.2.2 Permeabilização de membranas

O mecanismo de ação do DMSO não está bem definido mas supõem-se que haja dois métodos: criação de meio hipertônico e a interação do movimento do DMSO e o de outras moléculas através das membranas. Este movimento é feito somente na direção do interior das membranas, sugerindo com isto transporte ativo. Outras substâncias como tiouréia e eritritol também criam meio hipertônico, porém não tem a capacidade de desenvolver

transporte ativo (FRANZ & BRUGGEN,1967).

O DMSO facilita a penetração de substâncias de baixo peso molecular através da pele, porém, substâncias de alto peso molecular não passam em quantidades apreciáveis. Dimetilsulfóxido tem sido indicado como adjuvante da penetração de agentes antibacterianos, antivirais, estrógenos, corticóides, antiparasitários e de anestésicos locais (WOOD & WOOD,1975 ; RICHARDSON,1976).

2.6.2.3. Efeito anti-inflamatório

Dimetilsulfóxido é anti-inflamatório e possui a propriedade de reduzir edema. Vários autores tem demonstrado estas propriedades em trabalhos de laboratório e campo, em animais com edema por agentes químicos ou traumatismos. Em equinos e bovinos têm sido usado como auxiliar no tratamento de laminites agudas e crônicas, artrites, tendosinovites, e inflamação do tecido mole com alto grau de sucesso. Foi também demonstrado que DMSO potencializa os efeitos da cortizona e hidrocortizona. (JACOB et alii,1964b ; KOLLER,1967 ; GOROC & KOVAKS,1969 ; WOOD & WOOD,1975)

2.6.2.4. Atividades antimicrobianas do DMSO

2.6.2.4.1 Atividade bactericida e/ou bacteriostática

A ação bactericida e/ou bacteriostática do DMSO tem sido muito controvertida, tanto em relação aos efeitos propriamente ditos quanto às concentrações empregadas.

JACOB et alii (1964b), trabalhando com amostras de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas*, verificaram que concentrações a 10,0% de DMSO atuavam como

bacteriostático e soluções tão fracas como 1,0% suprimiam o crescimento do *Micobacterium tuberculosis*.

KLIGMAN (1965), determinou como 20,0% a concentração mínima inibitória (MIC) do DMSO para amostras de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* var. *albus*, *Streptococcus* beta hemolítico, *Corynebacterium* spp, *Alcaligenes faecalis*, *Escherichia coli* e *Proteus vulgaris*. Este mesmo autor cita como 50,0% a concentração com efeito bactericida para *Staphylococcus aureus* e 30,0 a 40,0% para os restantes microorganismos trabalhados.

Embora o mecanismo de ação antimicrobiano do DMSO ainda não tenha sido bem elucidado, POTTZ et alii (1967) verificaram que o efeito bactericida pela dissolução da maioria das bactérias, sendo que o *Staphylococcus aureus* necessitava de maiores concentrações, e que este efeito poderia ser consequência da maior permeabilidade da membrana favorecendo a lise da bactéria. Relatam a atividade bactericida do DMSO na concentração de 30,0% para *Escherichia coli*, *Aerobacter cloacae*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus* beta hemolítico, *Salmonella paratyphi* e *Candida albicans*; para *Pseudomonas aeruginosa* a concentração foi de 10,0%; *Diplococcus pneumoniae* 5,0%; enquanto para *Staphylococcus aureus* foi de 40,0% e para *Streptococcus faecalis* foi de 50,0%. O efeito bacteriostático foi alcançado com concentrações menores variando de 5,0 a 20,0%.

BRAYTON (1986), cita margens de 5,0 a 50,0% na concentração de DMSO "in vitro" para exercer efeitos bacteriostáticos e/ou bactericidas contra o *Micobacterium*

tuberculosis, *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Salmonella* spp, *Proteus* spp e *Escherichia coli* spp. Porém considera o DMSO apenas como fraco agente bactericida "in vivo", e supõe que estes efeitos antimicrobianos podem, também estar relacionados com os efeitos do DMSO sobre a resposta imunitária e a redução de endotoxinas que causariam danos aos tecidos.

2.6.2.4.2. DMSO como potenciador de antibióticos

FELDMAN et alii (1965), citam que a amostra de *Escherichia coli* CSH-2STR-R, resistente a 5.000 mg de estreptomicina, teve o seu MIC alterado para 7,5 mg pela adição de DMSO no meio de cultura, na concentração final de 10,0% , não interferindo, porém, no MIC de outra amostra, a K12CSH2, sensível a 7,5 mg. Concluíram que a amostra resistente apresentava impermeabilidade a droga devido a anteriores alterações de membrana.

POTTZ et alii (1967), avaliaram os efeitos do DMSO em concentrações de 0,5, 2,5 e 5,0% em combinação com 1, 10, 20, e 40 UI de penicilina, contra 60 amostras de *Staphylococcus aureus* comprovadamente resistentes à penicilina, não encontrando nenhuma reversão da resistência bacteriana. Citam, ainda, que não houve interferência entre o DMSO e a penicilinase. Na mesma pesquisa foram testadas *Salmonella paratyphi*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus beta hemolítico*, *Diplococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Aerobacter cloacae*, frente a 10 UI de penicilina, 15 mcg de eritromicina, 30 mcg de cloromicetina, 15 mcg de novobiocina, 30 mcg de tetraciclina e 10 mcg de diidroestreptomicina, com e

sem adição de 10,0% de DMSO. Concluíram que não houve evidências de ter havido qualquer interferência do DMSO na susceptibilidade das bactérias trabalhadas.

WOOD & WOOD (1975), citam que bacilos da tuberculose resistentes a 2.000 Mg de estreptomicina isoniazida, tornaram sensíveis a 10 Mg após tratamento com 0,5 a 5,0% de DMSO.

Assim permanece como uma das mais controvertidas propriedades do DMSO sua capacidade de aumentar a sensibilidade ou mesmo quebrar a resistência de vários microorganismos aos antibióticos como citado por JACOB (1982).



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Rebanhos trabalhados

Neste experimento foram utilizados rebanhos bovinos da "bacia" leiteira de Belo Horizonte, Minas Gerais, pertencentes à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), localizado na Faz. Experimental Hélio Barbosa, no município de Igarapé, composto de 60 animais em lactação das raças Holandesa vermelho e branco, preto e branca e mestiça Holandês/Gir; da Universidade Federal de Viçosa (UFV), estacionado no Centro de Ensino e Desenvolvimento Agrário de Florestal (CEDAF), no município de Florestal, formado por 82 animais em lactação, cruzamento das raças Suíça, Gir e Holandesa e os animais do rebanho da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), encontrado na Faz. Experimental Santa Rita, no município de Prudente de Moraes, integrado por 47 animais em lactação, mestiços das raças Holandesa e Gir.

3.2. Manejo dos rebanhos

3.2.1. Alimentação

Os animais eram mantidos em regime de pasto,

recebendo no momento da ordenha suplementação alimentar. Nas duas primeiras propriedades era administrada quantidade única de ração e na última de acordo com a produção individual. Em Florestal a cama de frango fazia parte da suplementação. Durante a seca todos os animais recebiam silagem nos cochos dos currais de espera, contendo como matéria básica, o milho. Os animais dispunham durante todo o ano de sal comum e mineralizado, à vontade, dispostos em cochos cobertos distribuídos nas pastagens.

3.2.2. Ordenha

Nos três rebanhos a ordenha era realizada duas vezes ao dia com intervalo de, aproximadamente, oito a dez horas entre a da manhã e a da tarde. Nas duas primeiras fazendas (UFMG e CEDAF) era praticada a ordenha mecânica e na última (EPAMIG) a manual, sendo que em Igarapé a ordenhadeira era do tipo "espinha de peixe" e em Florestal do tipo "balde de ordenha". Eram trabalhados, em média, quatro animais por retireiro de cada vez. Em nenhuma delas existia ordem de ordenha e os bezerros eram apartados das mães ao nascer, recebendo aleitamento artificial em baldes, após mamarem o colostro.

3.2.3. Sanitário

Na propriedade da UFMG, em Igarapé, não era realizada, normalmente, limpeza das tetas antes da ordenha, a não ser que estas estivessem muito sujas quando se processava lavagem com água de torneira depositada em baldes; no CEDAF, em Florestal, era feita lavagem das tetas antes da ordenha com água contendo desinfetante recomendado pelo fabricante da

ordenhadeira, à base de cloro, na proporção de 10 gramas para 10 litros de água (1 : 1.000). A quantidade do produto não era renovada durante a ordenha e nem a solução era substituída. A mesma toalha de pano usada para secagem, era aplicada a todas as tetas. Na EPAMIG, em Prudente de Moraes, era usado o mesmo sistema do CEDAF, mas a água de limpeza não continha desinfetante. O ordenhador se encarregava da lavagem, após ter colocado a corda (sedenho) para contenção do animal. Após o término da ordenha, os currais de espera e os estábulos eram raspados sendo que os últimos eram também lavados com água corrente. Na propriedade do CEDAF, vacas com sinais clínicos de mamite eram separadas e ordenhadas em sala especial e reintegradas à ordenha normal quando consideradas curadas por não apresentarem mais sinais macroscópicos de alterações do leite. Os mesmos retireiros atuavam simultaneamente nos animais sádios e em tratamento, prática esta não adotada nos outros rebanhos estudados. Nas três propriedades os tratamentos eram realizados a critério do Médico Veterinário responsável pelo plantel, sem auxílio de exames laboratoriais. Nas fazendas da UFMG e CEDAF, serviços ambulatoriais como tratamento de metrites, retenção de placentas, drenagem de abscessos e administração de medicamentos, eram efetuados em troncos de contenção separados da sala de ordenha. Na propriedade da EPAMIG tais serviços eram realizados logo após a ordenha, na própria sala, aproveitando a contenção do animal.

3.3. Instalações

As três propriedades possuíam currais cercados de

tábuas e concretados com boa queda de nível. Mesmo assim eram notadas algumas áreas de acúmulo de água. Dispunham de bebedouros e cochos coletivos para volumosos ou suplementação alimentar. Os currais tinham, aproximadamente, as áreas de: UFMG 80 m^2 (1,33 m^2 /animal), CEDAF 100 m^2 (1,21 m^2 /animal) e EPAMIG 70 m^2 (1,48 m^2 /animal). Todas as fazendas possuíam estábulos em alvenaria cobertos com telhas de cerâmica e pisos cimentados, servindo também de sala de ordenha. Na propriedade da UFMG, com ordenhadeira tipo espinha de peixe, a contenção era feita pelo próprio box, e a drenagem por ralos localizados em cada box. Nas outras duas propriedades a contenção dos animais se processava pelo sistema de canzil, sendo a drenagem realizada através de canaletas. Em Igarapé os bezerros mais novos eram localizados em bezerreiros individuais, dentro do próprio estábulo, de 1,60 m de comprimento por 0,60 m de largura e o mais velhos mantidos em piquetes contíguos ao estábulo, com acesso a cobertura de, aproximadamente, 20 m^2 , de telhas de cerâmica e cercada de tábuas. Nas demais os bezerreiros eram afastados do estábulo e divididos em coletivos e individuais, tendo os primeiros acesso a piquetes. Eram construídos em alvenaria, sendo que no CEDAF os individuais eram divididos por tábuas e na fazenda da EPAMIG por arame liso, ambos tendo, em média, as mesmas dimensões dos de Igarapé.

3.4. Seleção dos animais

Os animais foram selecionados por amostragem aleatória simples, através de sorteio entre aqueles que reagiram ao teste do "California Mastitis Test" (CMT) ou, ao exame

clínico mostraram evidências de alteração do úbere e/ou do leite.

O rebanho da fazenda de Igarapé apresentava produção leiteira individual variando de doze a quinze kg/dia; o do CEDRAF em torno de sete a doze kg/dia e o da EPAMIG de oito a dez kg/dia. Do rebanho de Igarapé foram trabalhadas 10 fêmeas em lactação; nos outros dois foram pesquisadas 12 fêmeas em cada um, perfazendo o total de 34 animais em lactação. Destes, 19 (55,9%) eram de uma a quatro lactações, 11 (32,4%) de cinco a oito lactações e quatro (11,7%) de nove a doze lactações. Quanto ao período de aleitamento, 10 (29,5%) estavam com menos de quatro meses, 14 (41,0%) entre quatro e oito meses e 10 (29,5%) com mais de oito meses. Dos 34 animais sorteados apenas um apresentou sinais clínicos de inflamação do úbere com alterações macroscópicas do leite, e o restante do plantel selecionado mostrou somente reações ao CMT, que variaram de uma a três cruces. Vinte e seis (76,5%) tinham histórico de mamite clínica em alguma época de suas vidas produtivas, sendo que 11 (32,4%) com histórico recente de tratamento findo o qual foram consideradas curadas por não apresentarem mais alterações visíveis do leite. De maneira geral, nas três propriedades, os animais iniciavam o período de redução da lactação, período "seco", quando atingiam o sétimo mês de gestação ou completavam 10 a 12 meses de lactação.

3.5. Colheita do material

O úbere era lavado com água de torneira depositada em balde, substituída quando necessário e seco com papel toalha. A

seguir as tetas eram imersas em solução de álcool iodada, na proporção de uma parte de tintura de iodo para nove partes de álcool etílico a 70^o GL, e ligeiramente agitadas para apressar a secagem. O leite, em volume médio de 10 ml por quarto de úbere, era colhido com cuidados de assepsia, antes da ordenha, imediatamente após as tetas terem secado, sendo desprezados os dois ou três primeiros jatos. Foram usados frascos estéreis, tipo penicilina com rolhas de borracha especiais (longas) e transportados ao laboratório à temperatura ambiente.

3.6. Diagnóstico da mamite

3.6.1. Clínico

O úbere, após estar completamente esgotado, foi submetido a cuidadoso exame clínico, visando inclusive identificar mamites anteriores através de concreções fibróticas no parênquima mamário.

3.6.2. Exames complementares

3.6.2.1. Coadura do leite e "Califórnia Mastitis Test" (CMT)

Após lavagem e desinfecção das tetas, todos os animais foram submetidos a coadura do primeiro ou dos dois primeiros jatos de leite, utilizando caneca com tampa de fundo escuro. O CMT, de acordo com SCHALM & NOORLANDER (1957), foi aplicado em todos os animais após a coadura do leite.

3.6.2.2. Bacteriologia e identificação presuntiva

Para estreptococos a identificação presuntiva foi baseada no comportamento em meios de Edwards¹ e agar sangue, no

1 - Edwards Medium (Modifield). Oxoid Ltd. Southwark Bridge Road, London, Great Britain.

"CAMP-Test", desdobramento do hipurato de sódio e fermentação de esculina, trealose, sorbitol, manitol, e inulina. Ainda foi adotado o critério proposto por BRYAN (1941) que pressupõe como patogênico aqueles com cadeia de mais de seis elementos.

As estafilocáceas foram presumivelmente identificadas tendo como base o tipo de hemólise, produção de coagulase, DNase e fermentação da glicose em condições de anaerobiose.

Para os bacilares além do tipo de colônias em meio de EMB Teague ¹, foi verificada a produção de indol, desdobramento de citrato, motilidade, provas de V-M e V-P e fermentação da lactose.

3.6.2.3. Bacterioscopia e contagem global de células somáticas (C.G.C.S.)

Foi utilizada a técnica de contagem microscópica direta de PRESCOT & BREED (1910), ligeiramente modificada por FIGUEIREDO (1962), quanto a área do esfregaço e método de coloração de Charlett (1954). A leitura foi realizada em microscópio ² com ocular 8X, objetiva 100X, com fator microscópico e de trabalho obtido de acordo com o AMERICAM PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (1953) e variação introduzida por FIGUEIREDO (1962), seguindo os padrões do escore linear (EL), de KIRK (1984) (TAB.IV).

3.7. Fórmulas medicamentosas

3.7.1. Antibióticos

Foram utilizados a penicilina nos seus sais G

1 - EMB - Teague . Laboratório Biobrás, Brasil

2 - Olympus CBA no 383451 objetiva 100x no 208769

potássica e 6 procaína na dose de 25.000 UI do primeiro sal e 75.000 UI DO segundo, totalizando 100.000 UI (despaci¹lina) e estreptomicina na forma de sulfato e na dose de 1.000 mg, completada por veículo aquoso ou oleoso-aquoso, para 20 ml de formulação.

3.7.2. Emulsões oleosas

As fórmulas experimentadas foram inspiradas no adjuvante incompleto de Freund e continham: Dimetilsulfóxido (DMSO), montanide 888, óleos de origem animal (bacalhau), vegetal (milho e soja), mineral e vitaminas A, D e E. Após testes de capacidade de dissociação em água em temperatura ambiente e de estabilidade da solução, mantida em ambiente de laboratório e de geladeira foram eleitas as seguintes fórmulas em volume total de 20 ml.

A primeira fórmula contendo DMSO (20,0%) era composta por:

Penicilina	100.000 UI
Estreptomicina	1.000 mg
DMSO	4,0 ml
Óleo mineral	9,0 ml
Montanide 888	1,5 ml
Vitaminas A,D e E	0,5 ml
Água dest. qsp.....	20,0 ml
pH	6,5 - 7,0

A segunda fórmula da emulsão oleosa possuía os mesmos componentes da primeira com exceção do dimetilsulfóxido (DMSO).

A estabilidade das fórmulas oleosas foi avaliada, por

1 - Despaci¹lina. Lab. Squibb. Santo Amaro, São Paulo, Brasil.

período de 24 meses, tomando por critérios observação periódica da manutenção da suspensão oleosa e a inibição do *Bacillus subtilis* (ATCC-6633)¹ em meio de Muller-Hinton² utilizando discos de antibiograma padrão de diametro de 6,35 mm, em branco.

3.7.3. Fórmulas aquosas

Foram utilizadas duas fórmulas: a primeira contendo água destilada, pH entre 6,5 e 7,0, e DMSO na proporção de 20,0% em volume final de 20 ml. Eram adicionados a este veículo os antibióticos, nas concentrações já citadas, no momento da aplicação. Para a segunda fórmula a metodologia era a mesma, com exceção da adição do DMSO.

3.8. Medicação intramamária

3.8.1. Sensibilidade bacteriana

Os microorganismos isolados foram testados quanto a sensibilidade aos antibióticos anteriormente citados, através do antibiograma padrão, em meio de cultura Muller-Hinton com adição de 10,0 , 15,0 e 20,0% de DMSO. Os resultados eram anotados em fichas apropriadas.

3.8.2. Fórmulas medicamentosas e administração

As fórmulas oleosa-aquosa e aquosa, após avaliação de estabilidade, foram testadas, via intramamária, em animais considerados sádios, ou seja, não reagentes aos testes de CMT e dentro dos padrões de normalidade da C.G.C.S., em duas tetas alternadas, ficando as restantes como testemunhas. O grau de irritabilidade foi medido através de exame clínico e dos testes acima citados, conduzidos até a total regressão da irritação. Das

1 - ATCC-6633. American Type Culture Collection N^o 6633

2 - Muller-Hinton. Difco Lab., Detroit, Michigan, 4822, USA.

fórmulas testadas foram escolhidas as que menos irritabilidade provocavam na glândula. Estas foram administradas, nas doses anteriormente citadas, uma única vez, via intramamária, em quartos de úbere comprovadamente infectados.

3.8.3. Resíduos de antibióticos

3.8.3.1. Liberação de antibiótico no leite

A liberação de resíduos de antibióticos no leite foi detectada pela inibição do crescimento do *Bacillus subtilis* (ATCC-3366) em meio de Muller-Hinton, com adição de leite proveniente de glândula tratada com as diferentes fórmulas medicamentosas, colhido de 12 em 12 horas até o total desaparecimento dos resíduos ou o limite de 120 horas pós aplicação. O leite era absorvido por discos de antibiograma, em branco (virgens), de 6,35 mm de diâmetro, na quantidade aferida de 0,018 ml de leite.

3.8.3.2. Quantificação dos resíduos de antibióticos

Os resíduos foram quantificados pela comparação das amplitudes dos halos de inibição do *Bacillus subtilis* com curvas pré-estabelecidas de diluições das fórmulas até 10^{-15} em meios de cultura de Muller-Hinton. Foram utilizados discos de antibiograma anteriormente descritos

3.8.4. Correção dos halos de inibição em função da produção individual da glândula mamária

Os halos de inibição observados para a quantificação dos resíduos de antibióticos foram corrigidos de acordo com a seguinte fórmula, idealizada por Dr. Ivan Barbosa Sampaio, do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da

Universidade Federal de Minas Gerais, levando em consideração a produção individual e um volume padrão:

$$K = 4 \cdot (\log V1 - \log V0)$$

onde K = constante de correção

log V0 = volume de produção padrão

log V1 = volume de produção da glândula a testar

Se tomarmos como 10,0 litros o volume padrão teremos:

$$K = 4 \cdot (\log V1 - 1)$$

3.8.5. Difusão da medicação através da glândula mamária

Em quatro vacas de matadouro, em fase final de lactação, foram administradas as fórmulas aquosa e oleosa-aquosa, coradas com violeta genciana e vermelho Congo, com e sem DMSO, via intramamária. Os animais foram abatidos seis horas após a aplicação, seus úberes extirpados e examinados quanto ao grau de dispersão dos corantes.

3.8.6. Análise estatística

A análise estatística foi realizada no setor de Bioestatística do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG., pelo professor Henrique Nunes de Oliveira, utilizando o teste "T" de acordo com SNEDECOR & COCHRAN (1971).



4 - RESULTADOS

Na TAB. I é apresentada a distribuição dos microorganismos isolados, e presuntivamente identificados das glândulas mamárias infectadas, seguindo os critérios do item 3.6.2.2. de material e métodos. A maior frequência de 94,6% ocorreu para os cocos Gram positivos. Destes os *Staphylococcus aureus* foram os mais frequentes com 72,7% entre 132 microorganismos isolados. Os denominados coliformes responderam por 5,3% dos isolamentos. As infecções mistas, todas envolvendo o *Staphylococcus aureus*, causaram 8,3% do total das infecções.

Todos os quartos tratados apresentavam infecção por *Staphylococcus aureus*. Apenas um quarto de úbere apresentou alteração macroscópica do leite sem contudo, exibir alterações clínicas detectáveis.

A TAB. II demonstra os resultados do tratamento de dose única das diversas fórmulas, administradas via intramamária. O maior percentual de glândulas bacteriologicamente negativas às 120 horas após aplicação (82,4%), foi obtido com a fórmula em base aquosa com DMSO e o

TABELA I - Número e percentagem de patógenos, identificados presuntivamente, em rebanho da bacia leiteira de Belo Horizonte, Minas Gerais, 1987.

MICROORGANISMOS	P R O P R I E D A D E S							
	UFMG		EPAMIG		CEDAF		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<u>Staphylococcus aureus</u> ⁽¹⁾	30	88,2	29	67,4	37	67,2	96	72,7
<u>Staphylococcus epidermidis</u>	2	5,9	4	9,3	7	12,7	13	9,8
<u>Micrococcus sp.</u>	1	2,9	2	4,7	2	3,6	5	3,8
<u>Streptococcus agalactiae</u>	1	2,9	1	2,3	-	-	2	1,5
<u>Streptococcus uberis</u>	-	-	1	2,3	1	1,8	2	1,5
<u>Streptococcus dysgalactiae</u>	-	-	5	11,6	1	1,8	6	4,5
<u>Streptococcus zooepidemicus</u>	-	-	1	2,3	-	-	1	0,8
<u>Escherichia coli</u>	-	-	-	-	5	9,1	5	3,8
<u>Citrobacter sp.</u>	-	-	-	-	2	3,6	2	1,5
T O T A L	34	100%	43	100%	55	100%	132	100%
Infecções Mistas	2	5,9	2	4,7	7	12,7	11	8,3

(1) Isoladamente ou na totalidade das infecções mistas.

TABELA II - Número e percentagem de quartos tratados e não, negativos à bacteriologia às 120 horas após aplicação das fórmulas, 1987.

FÓR- MU LAS	PRO PRIE DADE	TOTAL INICIAL POSITIVO	QUARTOS MAMÁRIOS					
			TRATADOS			NÃO TRATADOS ⁽¹⁾		
			NÚMERO INICIAL POSITIVO	NEGATIVO ÀS 120 hs		NÚMERO INICIAL POSITIVO	NEGATIVO ÀS 120 hs	
				Nº	%		Nº	%
Oleosa com DMSO	EPAMIG UFMG CEDAF	13 9 8	7 5 5	5 4 4	71,4 80,0 80,0	6 4 ⁽²⁾ 3 ⁽²⁾	2 2 1	33,3 50,0 33,3
Oleosa sem DMSO	EPAMIG UFMG CEDAF	13 10 9	7 5 5	5 2 4	71,4 40,0 80,0	6 5 4	3 2 1	50,0 40,0 25,0
Aquosa c/ DMSO	EPAMIG UFMG CEDAF	9 9 12	5 5 7	3 4 7	60,0 80,0 100,0	4 4 5	1 1 3	25,0 25,0 60,0
Aquosa s/ DMSO	EPAMIG UFMG CEDAF	8 9 12	5 5 7	5 2 6	100,0 40,0 87,7	3 4 5	1 1 1	33,3 25,0 20,0
Total Oleosa com DMSO		30	17	13	76,4	13	5	38,5
Total Oleosa sem DMSO		32	17	11	64,7	15	6	40,0
Total Aquosa com DMSO		30	17	14	82,4	13	5	38,5
Total Aquosa sem DMSO		29	17	13	76,4	12	3	25,0

(1) Afora onze quartos mamários sem infecção inicial

(2) Animais com quarto afuncional.

menor (64,7%) com a base oleosa, sem DMSO, sendo que as fórmulas em base oleosa com DMSO e base aquosa sem DMSO alcançaram o mesmo percentual de glândulas negativas à bacteriologia (76,4%).

De 53 glândulas não tratadas e inicialmente infectadas pelo *Staphylococcus aureus* 19 (35,8%), apresentaram-se negativas a bacteriologia ao final do experimento. Não foi possível determinar se as infecções eram recentes ou não.

A TAB. III demonstra a sensibilidade "in vitro" dos microorganismos isolados frente a penicilina, em meio de cultura isento e contendo concentrações de 10,0, 15,0 e 20,0% de DMSO. Os *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* foram os que apresentaram maior resistência, com percentuais médios de 84,5% para os meios isentos de DMSO.

NA TAB. IV estão compilados os resultados da sensibilidade "in vitro" dos microorganismos isolados frente a estreptomicina, em meios de cultura isento e com concentrações de 10,0, 15,0 e 20,0% de DMSO. No meio isento o *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis* foram os que apresentaram maior resistência com percentuais de 45,8 e 50,0% respectivamente.

As TAB. III e IV indicam ainda, o grau de inibição do crescimento bacteriano provocado pelas diversas concentrações de DMSO adicionadas aos meios de cultura. No meio controle, isento de DMSO, não houve inibição de nenhum dos microorganismos trabalhados. Na concentração de 20,0% no meio de cultura, o DMSO inibiu o crescimento de 100,0% das amostras trabalhadas

As tab. V e VI indicam a liberação de resíduos de

TABELA III - Sensibilidade dos microorganismos frente à penicilina sem e com DMSO no meio de cultura, 1987.

MICROOR	Nº	D I M E T I L S U F Ó X I D O (D M S O)																							
		I S E N T O						10%						15%						20%					
		R	PS	S	In	R	PS	S	In	R	PS	S	In	R	PS	S	In	R	PS	S	In				
Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%				
GA	HE																								
NISMO	RO	81	84,4	-	-	-	-	81	84,4	-	-	-	-	66	68,8	5	5,2	-	-	10	10,4	81	84,4		
Sta. aureus	96	-	-	12	12,5	-	-	-	-	11	11,5	1	1,0	-	-	2	2,1	-	-	10	10,4	12	12,5		
						3	3,1	-	-	-	-	-	-	3	3,1	-	-	1	1,0	2	2,1	3	3,1		
Sta. epidermidis	13	-	-	1	1,7	-	-	-	-	1	7,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	7,7	11	84,6	
						1	7,7	-	-	-	-	-	-	1	7,7	-	-	-	-	-	1	7,7	1	7,7	
Micrococcus sp.	5	3	60,0	-	-	-	-	3	60,0	-	-	-	-	3	60,0	-	-	-	-	-	1	20,0	2	40,0	
				2	4,0	-	-	1	20,0	-	-	-	-	1	20,0	-	-	-	-	-	1	20,0	2	40,0	
Str. dysgalactiae	6	-	-	3	50,0	-	-	3	50,0	-	-	-	-	3	50,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
						3	50,0	-	-	-	-	-	-	3	50,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Str. agalactiae	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
						2	100,0	-	-	-	-	-	-	1	50,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Str. uberis	2	1	50,0	-	-	-	-	1	50,0	-	-	-	-	1	50,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Str. zooepidemicus	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
						1	100,0	-	-	-	-	-	-	1	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
E. coli	5	3	60,0	-	-	-	-	3	60,0	-	-	-	-	3	60,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
						1	20,0	-	-	1	20,0	-	-	1	20,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
						-	-	1	20,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Citrobacter sp.	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
						2	100,0	-	-	-	-	-	-	2	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
TOTAL	132	99	75,0	-	-	-	-	99	75,0	-	-	-	-	82	62,1	7	5,3	-	-	10	7,6	99	100,0		
						20	15,6	-	-	5	3,8	14	10,6	3	2,3	2	1,5	-	-	15	11,7	20	100,0		
						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
						-	-	-	-	-	-	-	-	8	6,1	5	3,8	1	0,8	11	8,3	13	100,0		

Código: R = Resistente; PS = Pouco Sensível; S = Sensível; In = Inibido

TABELA V - Liberação de resíduos de antibióticos em glândulas mamárias, testadas com fórmulas em base oleosa, 1987.

PRO- PRIE- DADES	Nº DE QUARTOS TOTAL	PRODUÇÃO MÉDIA LITROS / DIA	COM 20% DE D M S O																											
			Nº DE QUARTOS	24h		48h		72h		96h		120h		Nº DE QUARTOS	24h		48h		72h		96h		120h							
				Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%				
UFNG	10	14,0	5	5 100,0	5	100,0	5	100,0	5	100,0	3	60,0	0	0	0	0	5	5 100,0	5	100,0	5	100,0	5	100,0	3	60,0	1	20,0	0	0
CEDEFAP	10	10,5	5	5 100,0	5	100,0	2	40,0	2	40,0	0	0	0	0	0	0	5	5 100,0	5	100,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EPAMIG	14	9,0	7	7 100,0	7	100,0	6	85,7	4	57,1	2*	2*	0	0	0	0	7	7 100,0	7	100,0	7	100,0	5	71,4	3	32,9	1*	14,2	0	0
TOTAL	34	11,0	17	17 100,0	17	100,0	13	76,5	9	52,9	2* 11,8	2* 11,8	0	0	0	0	17	17 100,0	17	100,0	17	100,0	8	47,1	4	23,5	1*	5,9	0	0

* Menos de 0,003 UI/ml/leite (COULSON & ROCKHEFORD, 1985).

TABELA VI - Liberação de resíduos de antibióticos em glândulas mamárias testadas com fórmulas em base aquosas, 1987.

PRO- PRIE- DADES	Nº DE QUARTOS TOTAL	PRODUÇÃO MÉDIA LITROS / DIA	COM 20% DE D M S O																											
			Nº DE QUARTOS	24h		48h		72h		96h		120h		Nº DE QUARTOS	24h		48h		72h		96h		120h							
				Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%				
UFNG	10	12,0	5	5 100,0	5	100,0	4	80,1	1	20,0	0	0	0	0	0	0	5	5 100,0	5	100,0	3	60,0	0	0	0	0	0	0	0	0
CEDEFAP	14	6,5	7	7 100,0	3	42,9	1	14,3	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7 100,0	2	28,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EPAMIG	10	9,5	5	5 100,0	4	80,0	3	60,0	3	60,0	1*	20,0	0	0	0	0	5	5 100,0	4	80,0	4	80,0	4	80,0	3	60,0	1*	20,0	0	0
TOTAL	34	9,2	17	17 100,0	12	70,6	8	47,1	4	23,5	1* 5,9	1* 5,9	0	0	0	0	17	17 100,0	17	100,0	7	41,2	3	17,6	1*	5,9	0	0	0	0

* Menos de 0,003 UI/ml/leite (COULSON & ROCKHEFORD, 1985).

antibióticos no leite das fórmulas utilizadas no experimento. As glândulas mamárias tratadas com fórmulas em base oleosa apresentaram liberação de resíduos antibióticos por mais tempo do que as de base aquosa. Nota-se ainda, que dentro da mesma base de liberação, as fórmulas que continham DMSO apresentaram percentuais maiores de quartos liberando resíduos de antibióticos do que suas similares isentas de DMSO.

Na fórmula oleosa sem DMSO e nas de base aquosa, com e sem DMSO, apenas uma glândula (5,9%) ainda liberava antibiótico no leite às 120 horas pós tratamento. Liberação em idênticas condições ocorria em duas glândulas (11,8%) que receberam a fórmula oleosa com DMSO. Porém, de acordo com o GRAF. I, as quantidades liberadas podem ser consideradas negativas (menos de 0,003 UI/ml/leite).

A TAB. VII demonstra o grau de irritação causada pelas diversas fórmulas administradas. Indica ainda, que, de acordo com o "Escore Linear" de KIRK (1984a), todos os quartos tratados podiam ser considerados inicialmente infectados. A medicação à base de penicilina e estreptomicina, via intramamária, provoca irritação da glândula e tem seu ápice 24 horas após a administração, mantendo-se quase estável até 48 horas, quando inicia pequeno declínio, regredindo notadamente a partir das 72 horas pós aplicação. As glândulas negativas a bacteriologia, às 120 horas pós aplicação, retornaram aos EL. considerados normais, ao passo que os que se apresentaram positivos mantiveram ou mesmo aumentaram o grau de irritação em relação aos iniciais.

GRÁFICO I = Médias das diluições dos antibióticos usados,
sem e com DMSO em " Skim Milk".

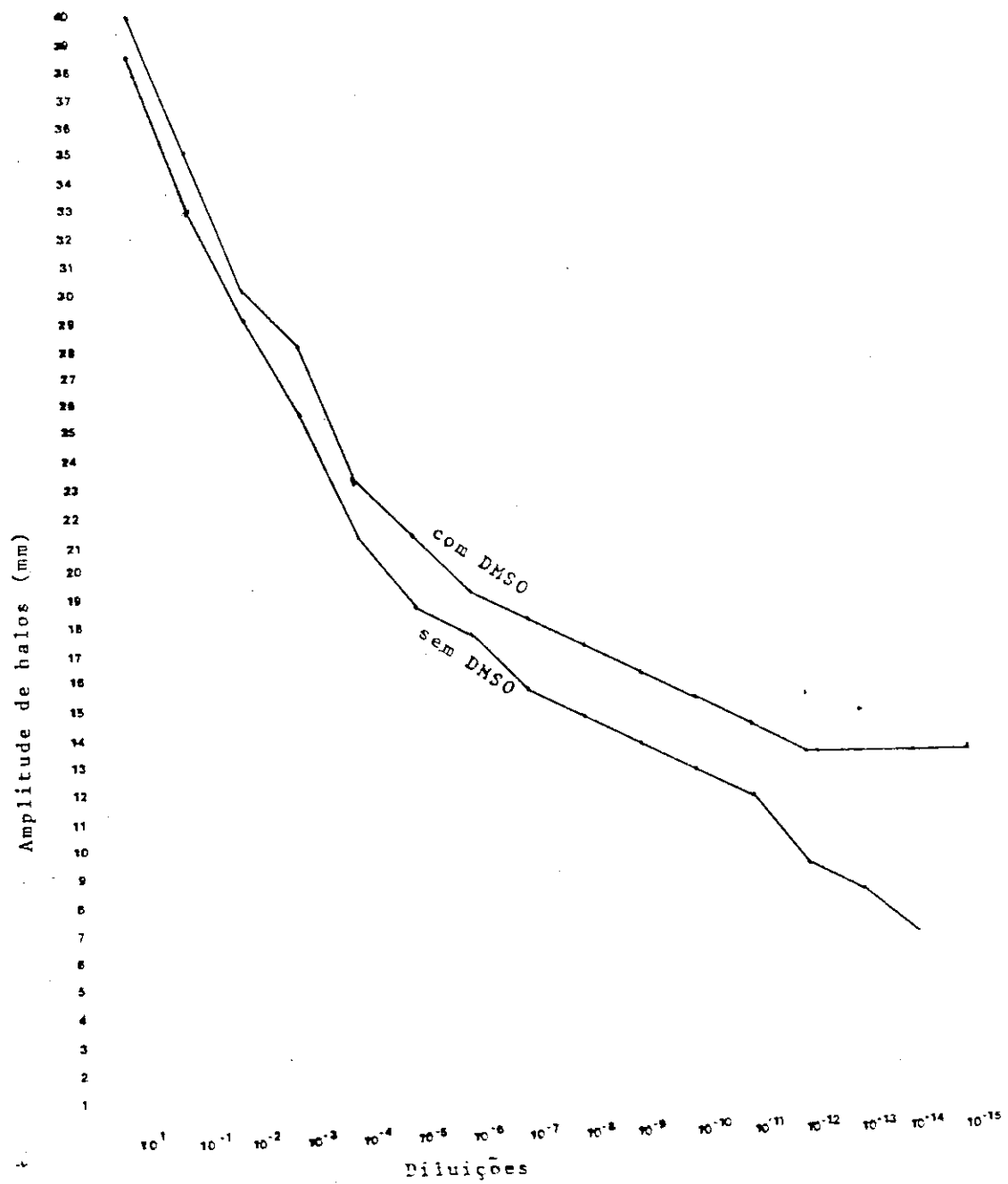


TABELA VII - Contagem de células somáticas do leite e escore linear ⁽¹⁾ das glândulas correlacionadas com as fórmulas medicamentosas empregadas e os achados bacteriológicos finais.

VEÍCULO DAS FÓRMU- LAS ⁽²⁾	BACTE- RIOLO- GIA FINAL	LEITURA E MÉDIAS DAS CONTAGENS (10 ³ /ml) GLOBAIS DE CÉLULAS SOMÁTICAS E ESCORES LINEARES											
		INICIAL		24h		48h		72h		96h		120h	
		Nº	EL	Nº	EL	Nº	EL	Nº	EL	Nº	EL	Nº	EL
Oleosa com DMSO	Negativo	1226	7	3225	8	3472	8	1558	7	765	6	338	5
	Positivo	1951	7	4608	8	4920	8	1686	7	1596	7	2051	7
Oleosa sem DMSO	Negativo	1434	7	5166	9	2462	8	1174	7	573	6	489	5
	Positivo	1921	7	5264	9	3400	8	1550	7	1043	7	4170	8
Aquosa com DMSO	Negativo	2856	8	10689	9	6544	9	1868	7	859	6	359	5
	Positivo	2167	7	8010	9	10081	9	1587	7	1160	6	2116	7
Aquosa sem DMSO	Negativo	2144	7	15585	9	9177	9	2355	8	957	6	176	4
	Positivo	2338	8	13612	9	8689	8	2007	7	2163	7	2000	7

(1) KIRK (1984a)

(2) - 100.000 UI de penicilina + 1.000 mg de estreptomicina.



A TAB. VIII indica os resultados acumulados do CMT, da bacteriologia e da bacterioscopia dos quartos mamários examinados e os seus respectivos percentuais.

A TAB. IX demonstra a correlação dos graus de reação do CMT com a bacteriologia e bacterioscopia, com percentuais de concordância.

A TAB. X relaciona os percentuais de concordância entre a bacteriologia e bacterioscopia.

A TAB. XI correlaciona os achados bacteriológicos e bacterioscópicos com os tipos de germes identificados.

A estabilidade das soluções oleosas, como citado no item 3.7.3., de material e métodos, permaneceu sem alteração por 24 meses e, paralelamente, manteve ação inibidora frente ao *Bacillus subtilis*, apresentando halo de inibição médio de 4,0 cm.

O experimento de difusão do medicamento no interior do úbere demonstrou que as fórmulas contendo DMSO atingiram partes da glândula que as outras isentas de DMSO não atingiram, com diferença mais acentuada para as de veículo oleoso, em que a fórmula contendo DMSO coloriu as partes altas do úbere, sendo que a sua similar isenta permaneceu, praticamente, na cisterna da glândula.

TABELA VIII- Comparação entre CMT, bacteriologia e bacterioscopia, em casos de mamite na bacia leiteira de Belo Horizonte, 1987.

C M T		BACTERIOLOGIA				BACTERIOSCOPIA			
REAÇÕES	Nº	POSITIVO		NEGATIVO		POSITIVO		NEGATIVO	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
POSITIVO	121	116	95,8	5	4,1	98	81,0	23	19,0
NEGATIVO	11	5	45,5	6	54,5	3	27,2	8	72,7

TABELA IX - Comparação entre graus de positividade do CMT, bacteriologia e bacterioscopia, com percentual de concordância, em casos de mamite da "bacia" leiteira de Belo Horizonte, 1987.

C M T		BACTERIOLOGIA			BACTERIOSCOPIA		
REAÇÕES	Nº	POSITIVA	NEGATIVA	CONCOR. %	POSITIVA	NEGATIVA	CONCOR. %
+	11	9	1	81,2	6	5	54,5
++	18	17	1	94,4	14	4	77,8
+++	92	90	2	97,8	78	14	84,8
TOTAL DOS GRAUS	121	116	5	95,8	98	23	81,0

TABELA X - Percentuais de concordância entre os resultados da bacterioscopia e bacteriologia dos casos de mamite da bacia leiteira de Belo Horizonte, 1987.

BACTERIOSCOPIA		BACTERIOLOGIA ⁽¹⁾		CONCORDÂNCIA %
LEITURA	NÚMERO	POSITIVO	NEGATIVO	
POSITIVA	101*	116	5	87,1
NEGATIVA	31	5	6	19,4
TOTAL	132	121	11	-

(1) Teste de referência.

TABELA XI - Correlação entre os achados bacteriológicos e bacterioscópicos, em casos de mamite na bacia leiteira de Belo Horizonte, 1987.

PRO- PRIE- DADE	TOTAL DE QUARTOS	TOTAL DOS TESTES POSITIVOS				COCOS GRAM + CATALASE + (ESTAFILOCOCCUS) (1)				COCOS GRAM + CATALASE - (ESTREPTOCOCCOS) (1)				BASTONESTES GRAM - (1)			
		BACTERIO- LOGIA		BACTERIOS- COPIA		BACTERIO- LOGIA		BACTERIOS- COPIA		BACTERIO- LOGIA		BACTERIOS- COPIA		BACTERIO- LOGIA		BACTERIOS- COPIA	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
UFMG	38	34	89,4	30	78,9	33	86,8	26	68,4	1	2,6	1	2,6	0	-	3	7,9
EPAMIG	47	43	91,4	34	7,23	35	74,5	28	59,6	8	17,6	3	6,4	0	-	3	6,4
CEDAF	47	44	93,6	37	78,7	35	74,5	33	70,2	2	4,3	1	2,1	7	14,9	3	6,4
TOTAL	132	121	91,7	101	76,5	103	78,0	87	65,9	11	8,3	5	3,8	7	5,3	9	6,8

(1) Identificação presuntiva.

5 DISCUSSÃO

A presente pesquisa foi realizada em três propriedades, da bacia leiteira de Belo Horizonte, representativas de tipos variados de manejo. O gado trabalhado, todo ele especializado em produção leiteira e como tal, mais sujeito a infecção da glândula mamária, estava submetido a técnicas de ordenha e controle sanitário como relatado nos itens 3.2.2. e 3.2.3. de material e métodos. As instalações eram razoáveis e nos currais de espera os animais dispunham de 1,12 a 1,48 m² "per capita", adequado a exploração leiteira e às técnicas empregadas.

5.1 Prevalência dos agentes etiológicos

Nesta pesquisa o critério bacteriológico foi considerado definitivo, sendo as provas de CMT utilizadas somente para a classificação inicial dos quartos.

A maior frequência de isolamentos de cocos Gram positivos (94,6%), indicada na TAB. I, está de acordo com as citadas por ROBERTS et alii (1969) FIGUEIREDO (1973), LANGENEGGER et alii (1977), FERREIRO et alii (1979) e

LANGENEGGER et alii (1981). Estes mesmos autores relatam a frequência de 1,0% para os bacilares, dados inferiores aos 5,3% encontrados nesta pesquisa. Tal discrepância deve estar ligada aos sistemas de manejo, com destaque para o uso de cama de galinha na alimentação do rebanho do CEDAF, onde ocorreu o isolamento dos coliformes.

5.1.1. Estafilococcias.

A frequência de 72,7% encontrada para *Staphylococcus aureus* (TAB. I) está abaixo dos 83,5% citados por SILVA (1977) e próxima dos 76,5% de LANGENEGGER (1986), acima dos achados de FIGUEIREDO (1962) de 55,4% e muito acima dos dados de 20 anos de pesquisas compilados por ROBERTS et alii (1969) e dos de NEAVE et alii (1968) e LANGONI (1984) que relatam a taxa de infecção por estafilococos em 13,0, 47,0 e 36,8%, respectivamente, e dos dados obtidos em matadouros por Mc DONALD (1977) que indicam a taxa de 22,4% de infecção pelo *Staphylococcus aureus*. Esta alta frequência pode ser atribuída às características epidemiológicas da bactéria, considerada como patógeno contagioso por NEWBOUD (1965) e SMITH et alii (1985a) e capaz de formar colônias, por longo espaço de tempo, na pele lesada, acabando por, em algum momento, infectar a glândula mamária como citado por NEAVE et alii (1968) e Mc DONALD (1977). As fontes extra-mamárias, apesar de pouco expressivas, podem colaborar para manter uma baixa taxa de infecção no rebanho, como sugerido por WHITE (1965); DALELL & FROST (1967); KINGWILL et alii (1970) e BRAMLEY & DODD (1984). Também, o deficiente manejo higiênico, e de ordenhadeiras mecânicas

predispõe a instalação da infecção por **Staphylococcus aureus**, de acordo com OLIVER et alii (1956) ; ROBERTS et alii (1969) ; SILVA (1979) e SILVA et alii (1983). Estas condições foram encontradas nos três rebanhos estudados. Além disso, o método e o critério de avaliação do tratamento, sem auxílio de testes laboratoriais mais apurados que comprovem a real cura do quarto infectado, aliado às dificuldades naturais do acesso das drogas à bactéria, contribui para que este tipo de mamite se torne crônica, permitindo a manutenção da infecção no rebanho contaminado. Devem ser considerados fatores outros como, a ausência do bezerro ao pé da vaca e a habitual formação de micro-abcessos na sub-mucosa da glândula mamária. No primeiro caso, a constante drenagem do leite contaminado reduz a possibilidade de maior dispersão da infecção intramamária nas já estabelecidas e impede o acesso de recentes deposições de microorganismos ao interior da glândula, por ação da própria boca do bezerro. No segundo, periódicas fistulações trazem o patógeno ao contacto com a mucosa e o leite intramamário.

O **Staphylococcus epidermidis**, apesar de não promover a coagulação do plasma sanguíneo, fator este que era acreditado ser o único indicador de patogenicidade para o gênero **Staphylococcus**, pode ser considerado como patogênico para a glândula mamária quando relacionado às reações positivas do CMT, e as altas C.G.C.S. indicativas de processo inflamatório ativo, como demonstrado por FORBES & HEBERT (1968), HOLMBERG (1973) e PEARSON & GREER (1974). A frequência deste microorganismo (9,8%), foi próxima da indicada por LANGENEGGER et alii (1986)

de 10,9%, bem acima da encontrada por SILVA (1977) de 0,7% e muito abaixo do achado de 19,6% de Mc DONALD (1977) . Estas disparidades podem ser explicadas, em parte, pela característica extra-mamária destes cocos considerados ambientais por pesquisadores como EBERHART (1977) ; SMITH et alii (1985b) e OZ et alii (1985). O manejo, com ênfase em métodos de higiene e alimentação, faz variar, em muito, a frequência de propriedade para propriedade. A presença de germes em cama de galinha, utilizada na alimentação do gado, deve ser creditado a maior taxa encontrada no rebanho do CEDAF (12,7%), conforme a TAB. I.

O índice de prevalência para o *Micrococcus* spp. de 3,8% foi maior que os 2,0% encontrados por LANGONI et alii (1984) e menor que os 9,9% citados por estes mesmos autores em outra propriedade, e dos 6,2% encontrados por LANGENEGGER et alii (1986). A diferença dos índices pode ser devida às mesmas circunstâncias relatadas para o *Staphylococcus epidermidis*, tendo em vista que as características epidemiológicas destes microorganismos são semelhantes.

5.1.2. Estreptococcias.

A frequência de *Streptococcus dysgalactiae* de 4,5% foi muito acima dos 0,7% encontrados por SILVA (1977). No entanto, ficou muito abaixo dos resultados de NEAVE et alii (1968) que relataram a frequência em 28,0%. A prática usual de controlar a mamite pela utilização do CMT e antibioticoterapia, segundo JACKSON (1970) e BRAMLEY (1982), obtém algum sucesso contra as infecções devidas ao *Streptococcus dysgalactiae*. A permanência deste patógeno nos rebanhos pode estar relacionada

ao manejo higiênico deficiente e a fontes extramamárias, de acordo com BRAMLEY & DODD (1984) . Ao compilar dados de vários autores, KING (1981) relatou que 90,0% das infecções por *Streptococcus dysgalactiae* produzem mamite clínica, o que não foi constatado neste trabalho.

O achado de 1,5% de prevalência para o *Streptococcus agalactiae*, está muito abaixo dos 27,0, 7,7, 4,0 e 35,4% citados respectivamente por ROBERTS et alii (1969) ; Mc DONALD (1977) ; LANGONI et alii (1984) e LANGENEGGER et alii (1986). Porém está próximo aos dados de NEAVE et alii (1968) que relataram a incidência de 2,0%, sendo que LINS (1988) e MASCARENHAS JUNIOR (1988) não encontraram o *Streptococcus agalactiae* em pesquisas desenvolvidas na "bacia" leiteira de Belo Horizonte, MG.

Esta variação de frequência pode ser considerada como resultante das diferenças de manejo higiênico e sanitário entre as propriedades, uma vez que o *Streptococcus agalactiae* é considerado por NEAVE et alii (1968) e Mc DONALD (1977) como patógeno quase que obrigatório da glândula mamária, não colonizando realmente na pele íntegra ou, mesmo, lesada. Deste modo, o manejo, desinfecção e antibióticoterapia adequadas obtêm bons resultados contra este microorganismo, de acordo com OLIVER et alii (1956) ; SANDERSON (1966) ; ADANS et alii (1968) ; SILVA (1979) e BODIE & NICKERSON (1986).

A ocorrência de 1,5% de infecção causada por *Streptococcus uberis* foi bem abaixo dos 13,3 e 15,0% encontrados por NEAVE et alii (1968) e SILVA (1977), respectivamente, e



muito próxima aos 1,3% relatados por KING (1981). Esta frequência pode estar relacionada a características de manejo e higiene que influenciam diretamente as fontes extra-mamárias onde, segundo JACKSON (1970) e BRAMLEY (1982), esta bactéria pode multiplicar e se abrigar por longo tempo. Não foi observado casos clínicos, embora, FRANCIS et alii (1986) tenham relatado a frequência média de 16,0 a 18,0% de mamites clínicas pelo *Streptococcus uberis*

O *Streptococcus zooepidemicus* foi o microorganismo menos frequente nesta pesquisa com índice de 0,8%, o que está bem abaixo dos citados por LANGONI et alii (1984), em média 1,4%. Este germe, normalmente englobado na expressão "outros estreptococos", parece ser o estreptococos menos frequente nos casos de mamites.

5.1.3. Enterobacterioses.

Os bacilares foram responsáveis por 5,3% das infecções do úbere, resultado que se aproxima dos achados de 4,2%, indicado por FIGUEIREDO (1962), ficando além dos dados compilados por ROBERTS et alii (1969) que asinalam 1,0% e muito aquém dos dados encontrados por LANGONI et alii (1984) nos quais os coliformes foi o segundo grupo de microorganismos isolados, com 18,3% de frequência, ficando acima dos estreptococos, enquanto LANGENEGGER (1986) não encontrou este tipo de bactéria. A maior frequência de *Escherichia coli* concorda com JASPER (1975) e LANGONI et alii (1984) onde esta bactéria foi a predominante no grupo. Não houve ocorrência de mamite clínica por coliformes o que, conforme FIGUEIREDO (1962), justificaria a

baixa incidência deste tipo de bactéria. Tal fato é considerado incomum por EBERHART et alii (1979) e BRAMLEY & DODD (1984). As pesquisas de EBERHART (1977) e EBERHART & BUCKALEW (1977), respectivamente, citam 24,0 a 35,5% a incidência de casos clínicos provocados por coliformes. BUSHNEL (1974) e LOTAN (1970) classificaram de super agudas ou severas 10,0 a 15,0% das infecções por este tipo de microorganismo. A razoável condição das instalações, manejo e lavagem dos estábulos com água corrente pode ter sido a causa desta baixa incidência, conforme sugerido por RADOSTITIS (1961), HOWEL (1972); BRAMLEY & NEAVE (1975); CARROL (1977); e HILL et alii (1979). A ausência de fatores adicionais necessários ao desencadeamento do processo patogênico, como o estresse e o grau de contaminação destacados por De HART et alii (1979) e SMITH et alii (1985a), podem também explicar a inexistência de casos clínicos.

5.1.4. Infecções mistas

As infecções mistas apresentaram o percentual de 5,3%, bem acima do total de 1,0% encontrado por SILVA (1977). O *Staphylococcus aureus* esteve presente em todas elas, e, talvez, em sendo o microorganismo mais prevalente neste trabalho, possa ser responsável pelas condições favoráveis ao desenvolvimento deste tipo de infecção, através do satelitismo bacteriano.

5.2 Tratamento da mamite via intra-mamária.

5.2.1. Fórmula medicamentosa.

A ausência de efetiva antibioticoterapia das infecções do úbere é, na maioria das vezes, a principal causa de insucesso dos programas de controle das mamites bovinas

(DODD,1983). Neste trabalho foi procurada uma associação de antibióticos que, além da viabilidade econômica, abrangesse maior espectro de ação sobre os principais microorganismos causadores de mastite em nosso meio, princípios de real significância e já citados por HUBBER (1977). Dessa forma, a associação da estreptomomicina com a penicilina, nos seus sais G procaína e G potássica foi a escolha definida por atingir amplo espectro de ação bem próximos aos antibióticos modernos e muito mais caros.

A quantificação dos antibióticos foi baseada nos dados compilados por MARTH & ELLICKSON (1959) e STANG (1977), que demonstram considerável variação nas dosagens da penicilina para o tratamento da mastite via intra-mamária, desde 10.000 a 1.000.000 UI. Porém, a partir de 1957, o Food Drug Administration vem recomendando a dose máxima de 100.000 UI, tendo como base experimentos que demonstraram maior rapidez da eliminação dos resíduos no leite, com os mesmos efeitos terapêuticos de concentrações maiores.

Os mesmos autores registram dosagens de estreptomomicina oscilando entre 25 a 1.000 mg, sendo mais utilizada a concentração de 100 mg.

A fórmula oleosa foi elaborada com óleo mineral, por ter sido o que menor irritação provocou na glândula mamária dos bovinos. A adição de vitaminas ADE foi realizada pelas suas propriedades antioxidantes, de acordo com recomendação do Professor Luiz Bernardes do Departamento de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da UFMG. O Montanide 888, utilizado como

emulsificante das fases aquosa e oleosa, substituiu o Arlacel A do adjuvante de Freund. O DMSO foi utilizado como coadjuvante dos antibióticos principalmente pelas suas propriedades de solvente e atividades biológicas como, permeabilização e penetração de membranas, além dos efeitos anti-inflamatórios, características bem definidas por JACOB et alii (1964); FRANS & BRUGGEN (1967); GOROC & KOVAC (1969) ; WOOD & WOOD (1975) ; KOLLER (1976) ; RICHARDSON (1976) e WONG & REINERTSON (1984). O DMSO é um produto rapidamente metabolizado e excretado no homem e animais (GERHADS & GIBIAN,1967 ; KOLB et alii, 1967 ; JACOB et alii, 1971 e WONG & REINERTSON,1984). Em bovinos os valores, após aplicação, retornam ao normal em cerca de sete dias em bezerros e de três a cinco dias em vacas, após administração intra-mamária. Depois de oito dias da aplicação, por qualquer via, não foi encontrado o composto no sangue ou tecidos dos animais (TIEWS et alii,1975 e KOLLER, 1976). Estas propriedades do DMSO sugerem que sua adição a fórmulas para o tratamento das mamites não interfere com a utilização do leite "in natura" ou para industrialização.

A fórmula oleosa considerada definitiva nesta pesquisa, foi selecionada entre 195 preparações, estudadas quanto ao grau de dispersão, estabilidade, eficiência medicamentosa "in vitro" e menor irritação produzida na glândula quando das inoculações intramamárias experimentais.

A estabilidade de 24 meses indicada em material e métodos item 3.7.3., obviamente, não é o limite e sim, para efeitos práticos, a validade para a fórmula mantida em

temperatura de geladeira e em ambiente no Laboratório de Controle de Mamite. Não houve diferença entre as duas situações, ambas mantiveram paralelamente a ação antimicrobiana "in vitro".

5.2.2. Tratamento

O *Staphylococcus aureus* está indiciado entre os principais agentes etiológicos das mamites bovinas. Apesar de não ser encontrado normalmente no meio ambiente pode, através da degradação enzimática de carboidratos, lípides e proteínas, sobreviver em uma variedade de situações. É importante sua permanência na pele lesada onde é encontrado por longo espaço de tempo. Assim são necessárias consistentes medidas de higiene, terapia intensiva e até sacrifício de animais rebeldes ao tratamento para obtenção de bom sucesso em seu controle (NEAVE et alii, 1968 e Mc Donald, 1977). Deve ser considerado, também, as dificuldades naturais de dispersão dos medicamentos dentro do úbere, desde as membranas orgânicas que funcionam como barreiras naturais até a ação da gravidade que tende a forçar a permanência do medicamento nas cisternas da glândula e teta como sugerido por LORDA & GRIMALD (1979). É importante destacar a característica do microorganismo de abrigar, principalmente, no interior dos neutrófilos ou, em microabcessos na sub-mucosa da glândula onde permanece relativamente a salvo da ação da droga antimicrobiana (SILVA, 1977. ; BRAMLEY & DODD, 1984). Dessa maneira também é importante a escolha certa da base farmacológica e do seu veículo. Assume capital destaque, a escolha do veículo, pois, além da preservação e/ou exaltação terapêutica dos componentes

farmacológicos, deve ser evitada a irritação da glândula mamária (ZIV-SILBERMAN,1976. ; LORDA & GRIMALDI ,1979).

A TAB. II demonstra que os resultados obtidos com as fórmulas, apesar do pouco tempo de acompanhamento das glândulas tratadas, foram bons, alcançando taxas negativas a bacteriologia acima das conseguidas por BLACKBURN (1956) ; ADANS (1968) e FAULL & WARDS (1975), muito embora a bactéria tenha apresentado pouca sensibilidade à penicilina, e moderada para a estreptomicina "in vitro" (TAB. III e IV) . Estes resultados talvez se devam a ação combinada dos antibióticos como observado por BLACKBURN (1956) e atividade bactericida e/ou bacteriostática do DMSO citados por JACOB et alii (1964b), KLIGMAN (1965), POTTZ et alii (1967) e BRAYTON (1986). As curvas de inibição realizadas quando da execução da presente pesquisa (GRAF. 1 e TAB. III e IV) demonstram o afirmado. HUBER (1977) CONCLUIU que a taxa de recuperação clínica está associada ao grau de severidade da infecção, o que parece lógico. Como nesta pesquisa apenas um animal apresentou mamite clínica, é presumível a influência exercida sobre o somatório dos resultados.

5.2.3. Comparação das fórmulas

A fórmula que alcançou índice maior de glândulas negativas à bacteriologia (TAB. II), ao final do experimento, foi a veiculada em base aquosa com DMSO. A mesma base medicamentosa, sem a adição do DMSO, demonstrou eficiência 6,0% menor, o que não é estatisticamente significativo ao teste "T" segundo SNEDECOR & COCHRAN (1971) igual a 1,30 a nível de 5,0%.



A fórmula em base oleosa com DMSO obteve melhores resultados do que a similar sem DMSO, cerca de 11,7% que ao teste "T" de acordo com SNEDECOR & COCHRAN (1971) não é significativa (1,33) a nível de 5,0% (TAB. II).

No tratamento das mamites estafilocócicas os melhores resultados foram obtidos com as fórmulas em base aquosa, com ou sem DMSO, comparadas com as similares em base oleosa. A menor diferença do percentual de quartos mamários bacteriologicamente negativos, 120 horas, pós aplicação entre as fórmulas em base aquosa, com e sem DMSO, é, provavelmente, devido ao estado fisiopatológico da glândula. Ao exame clínico não houve alteração visível de danos aos parênquimas glandulares tratados, o que facilitou a difusão das fórmulas em base aquosa através da rede de capilares lactíferos, proporcionando maior velocidade de ação dos medicamentos, fator este de capital importância no tratamento das mamites estafilocócicas segundo SILVA (1977). Os efeitos dispersivos do DMSO, neste caso, não foram realçados.

As fórmulas em base oleosa, mesmo em quartos sadios, são difíceis de difundir. O DMSO favorece maior dispersão pelo parênquima glandular.

A TAB. II mostra que, nas três propriedades trabalhadas, a maior diferença entre os percentuais de glândulas bacteriologicamente negativas das fórmulas aplicadas, com e sem DMSO, ocorreram no rebanho da UFMG. Este rebanho administrado pela EV/ UFMG, apresentou evolução tipicamente sub-clínica exceto uma vaca que mostrou manifestações clínicas da mamite. A análise estatística deste rebanho mostra o grau de significância

de 0,2 para as fórmulas em base aquosa e de 0,5 para as de base oleosa a nível de 0,05 no teste "T" conforme SNEDECOR & COCHRAN (1971). Deste modo, torna-se evidente que a ação do DMSO é exaltada ou não em conformidade com a evolução da infecção, o que está de acordo com MERCER & TESKE (1977) e LORDA & GRIMALD (1979) que obtiveram melhores resultados com a utilização do DMSO em mamites crônicas.

A análise das formulações, dentro do mesmo veículo de liberação, demonstra que DMSO, através de suas propriedades químicas, farmacológicas e/ou biológicas, está auxiliando no desempenho dos agentes antimicrobianos. Estes resultados estão de acordo com as observações de vários pesquisadores que sugerem ser o DMSO um efetivo carreador de medicamentos através de membranas biológicas do úbere, facilitando assim o acesso de fármacos a lugares que normalmente não atingiriam (JACOB et alii, 1964 ; FRANZ & BRUGGEN, 1967 ; RICHARDSON, 1976 ; WONG & REINERTSON, 1984). Os dados obtidos "in vivo" em animais de matadouro comprovam as afirmações. Na atual pesquisa a não obtenção de taxas de significância, em ambos veículos, pode estar relacionado a diferenças de metodologia.

Os resultados obtidos com as diversas fórmulas em relação ao DMSO (TAB. II) são inferiores aos encontrados por ZIV-SILBERMAN (1967) e LANGONI et alii (1984) que obtiveram diferenças significativas entre os antibióticos veiculados em DMSO, base oleosa e base aquosa, no tratamento de mamites estafilocócicas, o primeiro trabalhando com casos crônicos em animais em lactação, através de duas aplicações, os segundos com

casos clínicos e sub-clínicos, com três aplicações consecutivas. Estes resultados superiores talvez se devam ao número de aplicações, à apresentação sub-clínica das mamites incluídas nesta pesquisa, que totalizaram 98,5%, e a concentração de DMSO utilizada, 20,0% versus 90,0%. Todos estes fatores interferem com a avaliação das características do DMSO como solvente e permeabilizante de membranas biológicas. LORDA & GRIMALDI (1979), obtiveram resultados que se aproximam dos encontrados nesta pesquisa, quanto a mamite estafilocócica sub-clínica (74,0%) e superiores quanto a mamite crônica (78,0%) de animais em lactação, confirmando o melhor desempenho do DMSO em casos crônicos de mamite.

A TAB. II, indica ainda que o percentual médio de quartos mamários, não tratados, inicialmente positivos e, às 120 horas, negativos à bacteriologia, foi de 35,8%, com maior percentual (40,0%) para os quartos opostos aos tratados com a fórmula oleosa sem DMSO e menor (25,0%) para a aquosa sem DMSO, sendo que ambas fórmulas com DMSO apresentaram 38,5% de negativos.

Como não foi possível determinar o tempo em que as glândulas estavam infectadas, deve ser admitido que estes percentuais estejam dentro da amplitude média da duração das infecções intramamárias como caracterizado por MURPH & HANSON (1943) ; LOTAN (1970) ; BRAMLEY & DODD (1984) ; GROMMER et alii (1985) e SMITH et alii (1985a).

5.3. Resistência bacteriana

As TAB. III e IV indicam as taxas de resistência,

para as amostras isoladas, frente a penicilina e a estreptomomicina.

Os resultados obtidos estão abaixo dos percentuais de resistência encontrados por COSTA et alii (1985) que foram de 92,0 e 65,0% para os estafilococos ou 60,0 e 91,0% para os estreptococos frente a penicilina e a estreptomomicina, respectivamente. HINCKLEY et alii (1985) e LANGENEGGER et alii (1986) relatam percentuais menores de resistência para a penicilina, que correspondem, na ordem, a 42,8 e 49,0% para os estafilococos, quanto aos estreptococos, os autores não encontraram resistência.

Exceto para os *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus zooepidemicus* foram encontradas resistências à penicilina e/ou à estreptomomicina (TAB. VII e VIII). Esta informação recomenda o uso destes antibióticos, mais baratos e explica a queda da frequência das mamites devidas ao *Streptococcus agalactiae*, citada por ROBERTS et alii (1969) com frequência bem maior do que as de outros agentes.

O encontro de amostras bacterianas resistentes, provavelmente, seja devido a antibioticoterapia inadequada ou a técnicas de avaliação diferenciadas como sugerido por FIGUEIREDO (1962), ROBERTS et alii (1969), LEITE et alii (1976) e LANGONI et alii (1984) e confirmado por COSTA et alii (1985) na observação da correlação entre a evolução da resistência e o uso indiscriminado da antibioticoterapia.

O elevado índice de resistência pode ser devido a resistência bacteriana transferível, que segundo TRABULSI (1967)

e MORENO (1973) é de fácil propagação, por se constituir de um cromossoma adicional onde, entre outros, estariam contidos genes responsáveis pela resistência aos agentes antimicrobianos de acordo com DATTA (1973) e OLARTE & GALINDO (1973). Este fator poderia ser transferido de um microorganismo a outro, inclusive a espécies diferentes, não importando a patogenicidade, e também, podendo criar resistência cruzada a outras drogas sem necessidade de contato direto, conforme WATANABE (1963), TRABULSI (1967) e EVANS et alii (1968). Isto talvez possa ser uma das explicações para as diferentes taxas de resistência encontradas nas propriedades trabalhadas, em especial para os estreptococos.

O alto índice de amostras bacterianas resistentes, interfere com os resultados dos tratamentos efetuados, considerando que, HINCKLEY (1985) obteve correlação positiva de 84,0% entre o resultado dos tratamentos e os padrões de sensibilidade "in vitro".

5.4. DMSO como potenciador de antibióticos

Os resultados apresentados nas TAB. III e IV, indicam que o DMSO tem pouca influência na ação da penicilina e estreptomicina sobre as amostras isoladas inicialmente resistentes (R), de acordo com os protocolos dos experimentos, as amostras que passaram a categoria de moderadamente resistentes (MS), nas concentrações de 10,0 e 15,0% ou foram inibidas na concentração de 15,0% de DMSO, não eram na realidade totalmente resistentes, apresentando pequeno halo de inibição, esta tendência do DMSO pode ser verificada nas categorias de

moderadamente resistentes e sensíveis, onde são maiores os percentuais de amostras que mudaram de classificação ou foram inibidas.

Estas observações estão de acordo com POTTZ et alii (1967) os quais sugerem que, a mudança de categoria das amostras resistentes, provavelmente, foi devida a mutações e não a ação exclusiva do DMSO. FELDMAN et alii (1975) observaram resultados semelhantes aos encontrados nesta pesquisa, concluindo que a ação do DMSO de aumentar a sensibilidade das bactérias, era exercida sobre a membrana celular.

Os maiores percentuais de mudança de categoria, encontrado frente a estreptomicina, nos meios contendo 10,0 e 15,0% de DMSO, pode ser devido ao mecanismo de ação deste antibiótico que além de atuar na parede celular, inibe a síntese de proteínas. Estas ações poderiam ser potencializadas com o aumento da concentração intracelular do antibiótico, decorrente da permeabilização da membrana.

Pode-se notar, também, que os efeitos antimicrobianos do DMSO (TAB. III e IV) são muito variados, o que está de acordo com BRAYTON (1986). A concentração inibitória do crescimento para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, foi maior que os 10,0% encontrado por JACOB et alii (1964) e POTTZ (1967) e semelhante a relatada por KLIGMAN (1965) de 20,0% para *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus beta hemolitico* e *Escherichia coli*.

Também FELDMAN et alii (1975) sugere que as diferentes médias percentuais de inibição do crescimento de 3,8;

27,6 e 100,0% verificadas nos meios contendo, respectivamente, 10,0 ; 15,0 e 20,0% de DMSO, podem ser devidos a alterações de membrana celular. Ocorreria, então, aumento da permeabilidade da membrana celular com conseqüente desequilíbrio e lise da bactéria POTTZ (1967).

5.5. Liberação de resíduos de antibióticos

Uma das conseqüências da administração indiscriminada ou incorreta da antibioticoterapia, principalmente em programas de controle e profilaxia das mamites, é a liberação de resíduos de antibióticos no leite; em decorrência há prejuízos tanto para a saúde pública como para a indústria de laticínios (BISHOP, 1984 ; KIRK & KANNENE, 1984).

Os dados das TAB. V e VI demonstram que 120 horas, após o tratamento intramamário, 100,0% dos quartos eram negativos a liberação de resíduos de antibióticos considerando o critério adotado por COULSON & ROCHFORD (1985). Os achados estão dentro das médias de liberações citadas por vários autores (FOLEY et alii, 1949 ; JACKSON & BRYAN, 1950 ; PLASTRIDGE, 1958 ; EGAM & MEARNEY, 1985) e abaixo dos tempos de liberação citados por LAROCQUE & NEVILLE (1985).

Comparando as TAB. V e VI nota-se que, no mesmo espaço de tempo, as fórmulas oleosas mantiveram percentuais maiores de glândulas liberando resíduos de antibióticos do que as de base aquosa, as médias globais foram de 68,2% para as oleosas versus 59,4% para as aquosas. Tais achados estão de acordo com as afirmativas de FOLEY et alii (1949).

A ação do DMSO é mais pronunciada nas bases oleosas

tornando a liberação mais lenta que nas fórmulas aquosas. Tal fato pode ser consequência da capacidade de permeabilização de membranas pelo DMSO facilitando a difusão do medicamento, não só através dos canalículos galactóforos como também do parênquima glandular, como sugerido por ZIV-SILBERMAN (1967), FRANZ & BRUGGEN (1967), RICHARDSON (1976) e LORDA & GRIMALD (1979).

A comparação entre as taxas de excreção de resíduos de antibióticos no leite de úberes infectados é mais difícil devido a ampla variação de fatores que influenciam o mecanismo como a severidade da infecção, níveis e tipos de antibióticos empregados, tempo de tratamento, estado fisiológico da glândula e veículo utilizado entre outros (ALBRIGHT et alii (1961) ; EGAM & MEANEY (1985).

5.6. Irritabilidade provocada pelas fórmulas.

A TAB. VII demonstra que o maior grau de irritação da glândula mamária, com medicamento à base de penicilina e estreptomicina, em geral, ocorreu nas primeiras 24 horas após a aplicação. Tal verificação concorda com os achados de LEITE et alii (1976) e SILVA (1977). Em ambas pesquisas os medicamentos em base oleosa foram menos irritantes que os de base aquosa.

Os resultados da TAB. VII são aproximados dos obtidos por SPENCER et alii (1947), que trabalharam com penicilina.

O grau maior de irritação causado pelo veículo aquoso, em comparação ao oleoso, provavelmente seja devido a maior velocidade de amplitude de difusão dentro do úbere, como o sugerido por SILVA (1977).

As fórmulas que continham DMSO provocaram menor

irritação às 24 horas após a administração. Estas diferenças provavelmente sejam decorrentes do efeito anti-inflamatório do DMSO como citado por JACOB et alii (1964) ; GOROK & KOVAC (1968) ; WOOD & WOOD (1975) ; KOLLER (1976) e BRAYTON (1986), o que diminuiria a resposta glandular no período crítico de ação irritante da droga ou seja às 24 horas após a aplicação.

No caso das fórmulas em base aquosa, este efeito irritante se mantém, em média, até o final da observação. Já nas de base oleosa, a que continha DMSO mantém grau de irritação, ligeiramente maior do que a sua similar, sem DMSO, após as 24 horas. Provavelmente, isto ocorra devido a facilidade de difusão promovida pelo DMSO que permite ao medicamento alcançar, com maior rapidez, partes da glândula de difícil acesso. Isto está de acordo com LORDA & GRIMALDI (1979) tendo sido confirmado pelo experimento "in vivo" com animais de matadouro

A TAB. VII indica, ainda, que com a eliminação do agente etiológico pelo tratamento com penicilina e estreptomicina, o grau de irritação da glândula tende a reduzir gradativamente, chegando a C.G.C.S. à normalidade, em torno de 120 horas após a aplicação de dose única via intramamária. Idênticos resultados são obtidos pelo "Escore Linear" de KIRK (1984b) que considera como limite da normalidade, para animais no terço médio de lactação, a faixa entre $283 \text{ a } 565 \times 10^3$ células/ml de leite correspondente ao escore cinco. Quando o agente da mamite permanece ou há nova infecção, as médias do grau de irritação tendem a permanecer após as 72 horas, podendo

mesmo aumentar em relação as iniciais.

5.7. "California" Mastit Test (CMT), bacterioscopia, bacteriologia.

De acordo com TAB. VIII quando a reação ao CMT é negativa, o percentual de 72,7% determinado para bacterioscopia negativa foi inferior ao relatado por SILVA (1977) de, em média, 94,7%. De acordo com este mesmo autor as glândulas negativas a ambos testes, CMT e bacterioscopia, estão realmente livres de processo infeccioso. No entanto, o percentual de bacteriologia (método padrão) negativa, nos casos de CMT negativo foi de 54,5%, apresentando 18,3% menos de quartos negativos do que a bacterioscopia. Tal fato deve ser interpretado tendo em vista as bases dos respectivos testes. O CMT é método indireto de diagnóstico e os demais estão diretamente relacionados a presença de bactérias no leite. Evidentemente, na casuística estudada está ocorrendo tolerância da glândula mamária a ponto de não mais reagir à presença de patógenos, caracterizando infecção sub-clínica ou crônica no total de 98,5%, como referido no item 3.4 de Material e Métodos.

Deve ser observado, ainda, a maior acuidade e precisão da bacteriologia, capaz de revelar 14,8% mais casos de infecção intramamária dos que detectados pela bacterioscopia, o que, conforme FIGUEIREDO (1962) pode ser devido a escassez de bactérias nos esfregaços, problemas de coloração ou falhas na técnica de microscopia. Há que considerar, na combinação dos três métodos, o número expressivo de falsos negativos obtidos pelo CMT, cinco em onze (45,5%). De acordo com SILVA (1977),



poderia ter havido a contaminação do material durante a colheita ou apenas, infecções do canal da teta. Também nestas circunstâncias o elemento decisório foi a prova de bacteriologia.

O percentual para as reações CMT positivas e bacterioscopia negativa de 19,0% (TAB. VIII) foi abaixo do encontrado por SILVA (1977) de, em média, 53,0%. Esta diferença provavelmente seja devido a que o citado autor trabalhou apenas com rebanho em sistema de ordenha mecânica e considerou que os resultados CMT positivo e bacterioscopia negativa, eram devido mais a injúrias mecânicas, sem caracterizar realmente mamite típica. Nesta pesquisa foi trabalhada também uma propriedade com ordenha manual, tal diferença de manejo pode ter influenciado significativamente no resultado final.

O percentual encontrado para os testes de CMT e bacterioscopia positivos foi de 81,0%, dado muito superior ao relatado por SILVA (1977) de, em média, 47,0%. Conforme este autor, resultados positivos para ambos testes indicam que realmente as glândulas estão sofrendo processo infeccioso. Porém, o percentual entre os casos positivos do CMT e bacteriologia foi de 95,8%, demonstrando que o último teste foi capaz de revelar 14,8% a mais de glândulas infectadas do que a bacterioscopia. Esta diferença, ligeiramente inferior, pode também ser devido aos mesmos fatores anteriormente descritos para os casos CMT e bacterioscopia negativos (18,2%).

De acordo com a TAB. IX, as concordâncias entre os percentuais da bacteriologia e bacterioscopia aumentam a medida

que aumenta o grau de reação ao CMT. Assim, para CMT + , ++ e +++ as diferenças entre as concordâncias da bacteriologia e bacterioscopia foram de 26,7%, 16,6% e 13,4% respectivamente. Entretanto, apesar das falhas a que está sujeito o teste do CMT, por ser, como já citado, método indireto, as reações francamente positivas (+++), concordaram em 97,8% e 84,8 respectivamente com a bacteriologia e bacterioscopia. Poderia ser deduzido, com relativa segurança, que as reações negativas ao CMT são menos confiáveis do que as positivas em maiores graus.

A TAB. X indica a correlação entre a bacterioscopia e a bacteriologia que foi de 87,1% de concordância para os positivos e 19,4% para os negativos. Estes resultados estão acima da concordância relatada por FIGUEIREDO (1962), que foi de 85,2% nos casos positivos e bem abaixo dos 83,3% para os negativos. SILVA (1977) relatou amplitude menor entre as faixas de concordância, sendo 85,4% e 85,2%, respectivamente, para os casos positivos e negativos. Há, ainda, 16,1% de reações falsas negativas o que concorda com o percentual de 16,6% encontrado por FIGUEIREDO (1962) e que são, por ele, atribuídas a escassez de germes. Pode ser acrescentado falhas na manipulação e, provavelmente, as características do *Staphylococcus aureus* que representou a grande maioria dos germes isolados (72,3%). Este mesmo autor impõe como maior restrição a bacterioscopia a dificuldade de distinção entre germes patogênicos e não patogênicos.

A TAB. X demonstra para a bacteriologia percentuais de positividade maiores do que a bacterioscopia, exceto para os

coliformes. Isto entre outras causas pode ser devido à grande abundância de germes em leite enriquecido.

Sem dúvida, pode-se dizer que a associação de testes como CMT, contagem global de células somáticas (C.G.C.S.) e bacterioscopia, principalmente quando este último é realizado em amostras de leite enriquecidas (37 C por 18 a 24 horas), e obtidas por métodos de coloração especiais como o de Charlett, possibilitam, a maioria dos laboratórios regionais, melhor avaliação dos casos de mamite, podendo tornar mais eficientes os programas de controle e profilaxia da infecção. Porém, não substituem a bacteriologia como critério diagnóstico definitivo da mamite.

A deficiência de amostragem e limitação ligadas às condições oferecidas na execução da pesquisa, devem ser atribuídas aos achados não estatisticamente significantes.

6. CONCLUSÕES

A família *Micrococcaceae* foi a mais prevalente nas infecções da glândula mamária, vindo a seguir a *Streptococcaceae* e finalmente as *Enterobacteriáceas*. O *Staphylococcus aureus* com 72,7% do total de isolamentos, foi o microorganismo mais frequente.

A elevada prevalência de patógenos contagiosos da glândula mamária, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae*, pode ser indicativo de técnicas de manejo higiênico sanitário deficientes e/ou antibioticoterapia inadequada.

O CMT, a bacterioscopia obtida pela coloração de Charlett e a contagem global de células somáticas, são testes que, adequadamente empregados, poderiam melhorar os programas de controle e profilaxia das mamites bovinas. Porém, estes testes não substituem a bacteriologia como diagnóstico definitivo da mamite.

Apesar das altas taxas de resistência apresentadas pelo *Staphylococcus aureus* aos antibióticos isoladamente, a

associação da penicilina e estreptomicina demonstrou ser eficiente no tratamento das mamites estafilocócicas sub-clínicas.

A maior eficiência das fórmulas contendo DMSO a 20,0% evidenciou a ação adjuvante do produto principalmente nos casos crônicos.

As fórmulas com DMSO, de acordo com a C.G.C.S., apresentaram menor irritação às 24 horas após inoculação do que as similares, provavelmente devido ao efeito anti-inflamatório do DMSO.

O DMSO promoveu maior difusão dos medicamentos na glândula mamária.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, A.D. ; BARNETT, D.N. ; BARR, T.F.F. Drying-off therapy for bovine mastitis: A comparative field trial. *Vet. Rec.*, London, 83 (13) : 358-60, 1968.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard methods for examination of dairy products. New York, 1953. V.2.
- BISHOP, J.R. ; BODINE, A.B. ; ODELL, G.D. ; JANZEN, J.J. Retention data for antibiotics commonly used for bovine infections. *J. Dairy Sci.*, Schaumburg, 67(2) : 537-40, 1984
- BLACK, W.D. Usefulness of ancillary drugs in mastitis therapy. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, Schaumburg, 120 (10): 1187-89, 1977.
- BLACKBURN, P.S. Antibiotic treatment of mastitis and its effect on cell content of the milk. *J. Dairy Res.*, Cambridge, 23 (2): 225 - 8, 1956.
- BODDIE, R.L. & NICKERSON, S.C. Efficacy of Dodecylaminoalkyl glycine teat dip against *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalaciae* mastitis. *J. Dairy Sci.*, Champaign, 69 (1): 259-63, 1986.
- BRAMLEY, A.J. Sources of *Streptococcus uberis* in the dairy

- herd. I- isolation from faeces and from straw bedding of cattle. *J. Dairy Res.*, Cambridge, 49 (2) : 369-73, 1982
- BRAMLEY,A.J. & DODD,F.H. Reviews of the progress of dairy science: Mastitis control- progress and prospects. *J. Dairy Res.*, Cambridge, 51 (3): 481-512, 1984.
- BRAMLEY,A.J. & NEAVE,F.K. Studies on the control of coliform mastitis in dairy herds. *Br. Vet. J.*, London, 131 (2):160-9, 1975.
- BRAYTON,C.F. Dimethyl sulfoxide (DMSO) : A review. *Cornell Vet.*, Ithaca, 76 (1) : 61-90, 1986.
- BRYAN,C.S. The microscopic detection on bacterial defects of milk. *Vet. Med.* Bonner Springs, 36 (8): 415-9, 1941.
- BUSHNELL,R.B. Where are we on coliform mastitis : In Proceedings. 13th Ann. Meeting, National Mastitis Council, St Louis, Mo pg 62-9, 1974
- CHARLETT,S.M. An improved staining method for the direct microscopical counting of bacteria in milk. *Dairy Industr.*, London, 19 (8): 652-3, 1954.
- CARROL,E.J. Environmental factors in bovine mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, 170 (10) : 1143-9, 1977.
- CARROL,E.J. ; LAS MANIS,J ; JAIN,N.C. ; SCHALM,O.W. Use of dimethyl sulfoxide-flumethasone combination for treatment of endotoxin-induced bovine mastitis. *Br. Vet. Res.*, London, 35(6): 781 - 5, 1974.
- COSTA,E.O. ; COUTINHO,S.D. ; CASTILHO,W. & TEIXEIRA,C.M. Sensibilidade a antibióticos e quimioterápicos de bactérias isoladas de mastite bovina. *Res. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro,



5 (2): 65-9, 1985.

COUSON, A. & ROCHFORD, J.R. Testing for antibiotic residues in milk following treatment with a multiingredient intramammary preparation. *Irish Vet. J.*, Dublin, 39 (7): 111 - 2, 1985.

DALEEL, E.E. & FROST, A.J. Some observations on the bacterial flora of the bovine tonsil *Brit. Vet. Journal.*, London, 123: 232 - 6, 1967.

DATTA, N. Antecedentes microbiológicos da resistência bacteriana transferível. *Rev. Assoc. Méd. Bras.*, São Paulo, 19 (Supl.3): 4 - 6, 1973.

DeHart, D.A. ; NATZKE, R.P. ; OLTENACU, P.A. Effect of coliform challenge at milking time on new udder infections. *J. Dairy Sci.*, Champaign, 59 (6): 1124-30, 1979.

DOBBINS Jr. , C.N. Mastitis losses. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, Champaign, 120 (2): 1129 - 32, 1977.

DODD, F.H. Symposium: Advances in understanding mastitis. Mastitis - Progress on control. *J. Dairy Sci.*, Champaign, 66 (8): 1773 - 80, 1983.

DODD, F.H. ; NEAVE, F.K. ; KINGWILL, R.G. Control of udder infection by management. *J. Dairy Sci.*, Champaign, 47 (10): 1109 - 14, 1964.

Du PREEZ, J.H. The prevalence of teat canal infections in lactating cows as determined from foremilk and teat canal swab samples. *J. South. Afr. Vet. Ass.*, Pretória, 57 (4): 193 - 8, 1986.

EBERHART, R.J. Coliform mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, 120 (10): 1160 - 3, 1977.

- EBERHART, R.J. & BUCKALEW, J.M. Intramammary infections in a dairy herd with a low incidence of *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* infections. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, 121 (7) : 630-4, 1977.
- EBERHART, R.J. ; NATZKE, R.P. ; NEWBOUD, F.H.S. ; NONNECKE, B. ; THOMPSON, P.D. Coliform mastitis - a review. *J. Dairy Sci.*, Champaign, 62 (1) : 1-22, 1979.
- EGAN, J. & MEARNEY, W.J. Persistence of detectable residues of penicillin and cloxacillin in normal and mastitic quarters following intramammary infusion. *Vet. Rec.*, London., 116 (16): 436 - 8 , 1985.
- FAULL, W.B. & WARD, W.R. Treatment of clinical mastitis : Two intramammary formulations compared. *Vet. Rec.*, London, 96 (16): 127 - 9, 1975.
- EVANS, J. ; GALINDO, E. ; OLARTE, J. ; FALKOW, S. Betalactamase of *R. factores*. *J. Bacteriol.*, Washington, 96 (1): 1441 - 5, 1968.
- FELDMAN, W.E. ; FUNCH, J.D. ; HOLDEM, P.C. In vivo e in vitro effects of dimethyl sulfoxide on streptomycin-sensitive and resistant *Escherichia coli*. *Ann. New York Acad. Sci.*, New York, 243: 269-77, 1975.
- FERREIRO, L. ; SOUZA, E.P.L. ; NOVY, E.F. Influência da mastite bovina sub-clínica na produção de leite de gado mestiço. *Arq. Fac. Vet. UERGS.*, Porto Alegre , 2 : 135-43, 1979.
- FIGUEIREDO, J.B. Estudos sobre a mamite bovina no município de Betim, Minas Gerais, (comparação dos métodos de diagnósticos, frequência e sensibilidade dos germes

- isolados). *Arq. Esc. Vet. UEMG.*, Belo Horizonte , 14 : 257-9, 1962.
- FIGUEIREDO, J.B. Mamites bovinas. Importância e controle. *Rev. Inst. Lat. Cândido Iostes.*, Juiz de Fora , 28 (166) : 1-6, 1973.
- POLEY, E.J. ; STULTS, A.W. ; LEE, W.S. ; BRYNE, J.L. Studies on vehicles for sustaining penicillin levels in the bovine mamary gland. *B. J. Vet. Res.*, Schaumburg , 10 (34) : 66-70, 1949.
- FORBES, D. & HEBERT, C.N. Studies in the pathogenesis of staphylococcal mastitis. *Vet. Rec.*, London, 82 (3): 69-73, 1968.
- FRANCIS, P.G. ; WILESMITH, J.W. ; WILSON, C.D. Observations on the incidence of clinical bovine mastitis in non-lactating cows in England and Wales. *Vet. Rec.*, London, 118 (20) : 549 - 52, 1986.
- FRANZ, T.J. & BRUGGEN, J.T.A. A possible mechanism of action of DMSO. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York , 141 : 302-9, 1967.
- GERHARDS, H. & GIBIAN, H. The metabolism of dimethyl sulfoxide and its metabolic effects in man and animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York , 141 : 65-76, 1967.
- GIESECKE, W.H. The diagnosis and control of bovine mastitis as a means of improving the quality of milk. *J. Dairy Technol.*, Ames, 12 (1): 3-21, 1985.
- GOROG, P. & KOVACS, I.B. Effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on various experimental inflammations. *Current Therap. Clin. Exp.*, New York, 10 : 486 - 9 , 1968.

- GROMMERS, F.J. ; VAN DE GEER, D. ; in't VEEN, C.A.A. Duration of bovine intramammary infections in commercial dairy herds. *Vet. Rec.*, London, 116 (2): 581 - 4, 1985.
- HILL, A.W. ; SHEARS, A.L. ; HIBBITT, K.G. The pathogenesis of experimental *Escherichia coli* mastitis in new calved dairy cows. *Res. Vet. Sci.*, London, 26 (1) : 97 - 101, 1979.
- HINCKLEY, L.S. ; BENSON, R.H. ; POST, J.E. ; DeCLOUX, J.C. Antibiotic susceptibility profiles for mastitis treatment. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, Schaumburg, 182 (1): 709 - 11, 1985.
- HOWELL, D. Survey on mastitis caused by environmental bacteria. *Vet. Rec.*, London, 90 (23) : 654 - 7, 1972.
- HOLMBERG, C. *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. *Acta. Vet. Scand.*, Copenhagen., 45 (Suppl.): 1-144, 1973.
- HUBER, W.G. Antibacterial drug effectiveness against mastitis pathogens. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, Schaumburg, 170 (10): 1182 - 4, 1977
- JACOB, S.W. Proceedings of the symposium on dimethyl sulfoxide. Mode of action and biologic effects. *Vet. Med. & Sm. An. Clin.*, Edwardsville, 77 (3) : 365 - 76, 1982.
- JACOB, S.W.; BISCHEL, M.B. ; HERSCHLER, R.J. Dimethyl sulfoxide : effects on the permeability of biologic membranes (preliminary report). *Current. Therap. Res. Clin. Exp.*, New York, 6 (2): 193 - 8, 1964a.
- JACOB, S.W.; BISCHEL, M.B. ; HERSCHLER, R.J. Dimethyl sulfoxide (DMSO): A new concept in pharmacotherapy. *Curr. Ther. Res.*, New York, 6 (2): 134 - 5, 1964b.

- JACOB,S.W. ; ROSEMBAUN.E.E. ; WOOD,D.C. Basic concepts of DMSO. Marcel Dekker Inc., New York ,1971. pp.131 - 145, Vol.1 chap.4
- JACKSON,W.S. & BRYAN,C.S. Penicillin milk levels in cows folloing intramamary administration. *Vet. Med.*,Bonner Springs , 45 (10): 395 - 9, 1950.
- JACKSON,E.R. An autbreak of teat sores in a commercial dairy herd possibly associated with milking machine faults. *Vet. Rec.*, London, 82(1) : 2 - 6 , 1970.
- JASPER,D.E. ; DELLINGER,J.P. ; BUSHNELL,R.B. Herd studies on coliform mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, 166 (8): 778 - 80, 1975.
- KING,J.S. *Streptococcus uberis* : A review of its role as a causative organism of bovine mastitis. I. Characteristics of the organism. *Br. Vet. J.*, London , 132 (1): 36 - 52, 1981.
- KIRK,J.H. Programmable cauculator program for linear somatic cell scores to estimate mastitis yield losses. *J. Dairy. Sci.*, Champaign, 62 (2): 441 - 3, 1984a.
- KIRK,J.H. Somatic cells in milk : current concepts. *Separata de Comp. Cont. Pract. Vet.*, Princeton Junction, 6 (4) : 237-42, 1894b.
- KIRK,J.H. & KANEENE,J.B. Comparison of on-farm methods for detecting antibiotic residue in bovine milk and urine. *Pract. Vet.*, Michigan, 6 (9): 449 - 502, 1984.
- KLIGMAN,A.M. Topical pharmacology and toxicology of dimethyl sulfoxide - Part 1. *J. Am. Med. Bd.*, Schaumburg, 193 (10): 796 - 8, 1965.

- KOLB, K.H. ; JAENICKE, G. ; KRAMER, M. ; SCHULTZE, P.E.
Absorption, distribution and elimination of labeled dimethyl sulfoxide in man and animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, 141 : 85-95, 1967.
- KOLLER, L.D. Clinical application of DMSO by veterinarians in Oregon & Washington. *Vet. Med / Sm. An. Clin.*, Edwarsville , 71 (5) : 591 - 7, 1976.
- LANGENEGGER, J. ; VIANI, M.C.R. ; BAHIA, M.G. Efeito do agente etiológico da mastite subclínica sobre a produção do leite. *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro , 1 (2) : 47-52, 1981.
- LANGENEGGER, J. ; FIGUEIREDO, M.P. ; FERREIRA, E.R. Eficácia da combinação de sulfato de gentamicina + penicilina G procaína no tratamento da mastite bovina. *Horiz. Vet. Porto Alegre*, 5 (30) : 44 - 7, 1986.
- LANGONI, H. ; CORREA, C.N.M. ; CORREA, W.M. ; CARRERA, E.L.C. Etiologia e tratamento das mastites bovinas com auxílio do dimetilsulfóxido (DMSO). *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro , 4 (1) : 1-4, 1984.
- LAROCQUE, L. & NEVILLE, G.A. Quantitative evaluation of a bovine antibiotic infusion product by milk residues depletion studies. *J. Food. Prod.*, Ames , 48 (7) : 611 - 5, 1985.
- LEITE, R.C. ; BRITO, J.R.F. ; FIGUEIREDO, J.B. Alterações de glândulas mamárias de vacas tratadas intensamente, via mamária, com penicilina em veículos aquoso e oleoso. I. Variações de contagem de leucócitos e leitura do "California Mastitis Test" II. Presença de estafilococos, bacilares e

- candida sp. *Arq. Esc. Vet. UFMG.*, Belo Horizonte , 22 (1) : 27 - 31, 1976.
- LINS, J.L.F.H.A. *Mamite bovina: Pressão intramamária em sistema de retiro modificado, no Estado de Minas Gerais. I= Características do manejo. II= Contribuição ao estudo epidemiológico.* Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG., 1988, 68p. Tese, Mestre em Medicina Veterinária.
- LORDA, J.A.J. & GRIMALDI, J.A. *Utilidad del DMSO em la medicacion intramamaria. Nuestra experiencia.* *Gac. Vet.*, Buenos Aires, 41 (342): 430 - 4, 1979.
- LOTAN, E. *Observation on the etiology, course and management of acute bovine mastitis in the Jourdan Valley.* *Refuah. Vet.*, Bet Dagan , 22 (3) : 101-11, 1970.
- MARTH, E.H. & ELLICKSON, B.E. *Antibiotic residues in milk products - A review.* *J. Milk. Food. Technol.*, Ames , 22 (7): 241 - 9, 1959.
- MASCARENHAS JUNIOR, J. *Mamite bovina em sistemas criatórios de Minas Gerais. Interferência das características físico = químicas do leite no diagnóstico por métodos indiretos.* Belo Horizonte. Escola de Veterinária da UFMG., 1988, 58 p. Mestre em Medicina Veterinária.
- MERCER, D.H. & TESKE, R.H. *Special considerations for the developmente of drugs for acute clinical mastitis.* *J. Am. Vet. Assoc.*, Schaumburg, 120(10): 1190 - 3, 1977.
- Mc DONALD, J.S. *Streptococcal and staphylococcal mastitis.* *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg , 12 (10): 1157 - 9, 1977.
- MERCHANT, I.A. & PACKER, R.A. *Etiology diagnosis and control of*



- infections bovine mastitis. Minneapolis, Burgess, 1949, 66 p.
- MORENO, G. Fator R em medicina veterinária. Cienc. Cult., São Paulo, 25 (4) : 323 - 6, 1973.
- MURPHY, J.M. Mastitis - The struggle for understanding. J. Dairy Sci., Champaign, 39(2): 1768 - 73, 1956.
- MURPHY, J.M. & HANSON, J.J. Infection of bovine udder with coliform bacteria. Cornell Vet., Ithaca, 33 (1): 61 - 77, 1943.
- NEAVE, F.K. ; DODD, F.H. ; KINGWILL, R.G. ; WESTGARTH, D.R. Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. J. Dairy Sci., Champaign, 52 (5): 696 - 707, 1969.
- NEAVE, F.K. ; OLIVER, S. ; DODD, F.H. ; HIGGS, T. Rate of infection of milked and un milked udders. J. Dairy Res., Champaign, 35 (3): 127 - 31, 1968
- NEWBOULD, F.H.S. & NEAVE, F.K. The response of the bovine mammary gland to an infusion of stafilococci. J. Dairy Res., London, 32 (2): 163 - 70, 1965.
- OLARTE, T. & GALINDO, E. Fatores de resistência (R) encontrados em cepas endêmicas de Shigella e Salmonella typhi no México. Rev. Assoc. Méd. Bras., São Paulo, 19 (Supl.3) : 7-12, 1973
- OLIVER, J. ; DODD, F.H. ; NEAVE, F.K. Infection and mastitis in a dairy herd. J. Dairy Res., Cambridge, 13 (2) : 169 - 80, 1956.
- OZ, H.H. ; FARNSWORTH, R.J. & LARSON, V.L. Environmental mastitis. Vet. Bull., Farnham Royal, 55 (11): 829 - 40, 1985.

- PEARSON, J.K.L. & GREER, D.O. Relationship between somatic cell counts and bacterial infections of the udder. *Vet. Rec.*, London, 96 (19): 423 - 7, 1975.
- PLASTRIDGE, W.N. Bovine mastitis : A review. *J. Dairy Sci.*, Champaign, 41 (9): 1141 - 81, 1958.
- PRESCOT, S.C. & BREED, R.S. The determination of the number of body cells in milk by a direct method. *J. Infect. Dis.*, Chicago, 2 (5): 632 - 40, 1910.
- POTTZ, G.E. ; RAMPEY, J.H. ; FURMANDEAN, B. The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on antibiotic sensitivity of a group of medically important microorganisms : Preliminary report. *Annals. New York Acad. Sci.*, New York, 141 : 261-72, 1967.
- RADOSTITIS, O.M. Coliforme mastitis. *Can. Vet.*, Ottawa, 2 (11): 401 - 5, 1961.
- RICHARDSON, J. Topical use of dimethyl sulfoxide (DMSO). , *Southwestern Veterinarian*, College Station, 26 (3): 591 - 7, 1976
- ROBERTS, S.J. ; GUTHRIE, R.S. ; SCHMIDT, G.H. Concepts and recent developments in mastitis control. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, 155 (1): 156 - 7, 1969.
- SANDERSON, C.J. The effect of slow and quick-release preparations of penicillin against *Streptococcus agalactiae* infection. *Vet. Rec.*, London, 22 (12): 328 - 30, 1966.
- SCHALM, O.W. & NOORLANDER, D.O. Experiments and observation leading to development of the California Mastitis Test. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, Schaumburg, 130 (5): 199-209, 1957.

- SCHALM, C.W. & WOODS, G.M. Characteristics of coliform mastitis and treatment with dihydrostreptomycin. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, 120 (903): 385 - 8, 1952.
- SCHULTZ, L.H. Somatic cell counting of milk in production testing programs as a mastitis control technique. *J. Am. Vet. Assoc.*, Schaumburg, 120 (10): 1224 - 6, 1977.
- SEYKORA, A.J. & McDANIEL. Udder and teat morphology related to mastitis resistance: A review. *J. Dairy Sci.*, Champaign, 68 (8): 2087 - 93, 1985.
- SILVA, N. Uso do chlorhexidine no controle da mamite bovina. *Científica*, Jaboticabal, n.º especial: 34 - 41, 1979.
- SILVA, N. Mamite no rebanho bovino da Escola Média de Agricultura de Florestal - UFMG: I - Controle através da desinfecção pós - ordenha e do uso do trimetoprim - sulfametoxazole. II - Frequência e etiologia. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1977, 68p. Tese, Mestre em Medicina Veterinária.
- SILVA, N. ; FIGUEIREDO, J.B. ; OLIVEIRA, M. Mamite no rebanho bovino da Escola Média de Agricultura de FLORESTAL - UFV. (controle através da desinfecção). *Bras. Bras. Med. Vet. Zoot.*, Belo Horizonte, 31 (1): 73 - 84, 1983.
- SMITH, L.K. Mastitis control - A discussion. *J. Dairy Sci.*, Champaign, 66(8): 1790 - 4, 1983.
- SMITH, L.K. ; TODHUNTER, D.A. ; SCHOENBERGER, P.S. Symposium : Environmental mastitis : cause, prevalence, prevention. *J. Dairy Sci.*, Champaign, 68 (6): 1531 - 5, 1985a.
- SMITH, L.K. ; TODHUNTER, D.A. ; SCHOENBERGER, P.S. Environmental

- pathogens and intramammary infection during dry period. *J. Dairy Sci.*, Champaign, 68 (2): 402 - 17, 1985b.
- SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. *Métodos estadísticos*. México, D.F., Continental, 1971. 703p.
- SPENCER, G.R. ; KRAFT, M.E. & UNDERBJERG, G.K.L. Efficacy of intramammary infusion with penicillin and diluents on streptococci mastitis. *Am. J. Vet. Res.*, Chicago, 8 (29) : 325 - 9 , 1947.
- STANG, A.M. Pharmacologic principles of systemic and intramammary mastitis therapy. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, 170 (10): 1180 - 1, 1977.
- TIEWS, J. ; SCHARRER, E. ; HARRE, N. ; FLOGEL, L. ; JOCHLE, W. Metabolism and excretion of dimethyl sulfoxide in cows and calves after topical and parenteral application. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York , 243: 139 - 50, 1975.
- TRABULSI, L.R. A importância da resistência bacteriana transferível no Brasil. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, São Paulo , 12 (Supl. 3): 13 - 5, 1967.
- WATANABE, T. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol. Rev.*, Ann Arbor, 27 (1): 87 - 115, 1963.
- WILLIAMS, K.I. ; BURSTEIN, S.H. ; LAYNE, D.S. Dimethyl sulfone: Isolation from cow's milk. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, New York, 122 (3): 865 - 6, 1966.
- WONG, L.K. & REINERSTSON, E.L. Clinical considerations of dimethyl sulfoxide. *Iowa State Uni. Vet.*, Ames , 46 (2) : 89 - 95 , 1984.
- WOOD, D.C. & WOOD, J. Pharmacologic and biochemical

considerations of dimethyl sulfoxide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*,
New York , 243 : 7 - 9 , 1975.

ZIV-SILBERMAN,G. DMSO in the treatment of chronic mastitis.
Vet. Rec., London ,81 (20) : 527 - 8, 1967.