

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DA MASTITE BOVINA

Maria Aparecida Vasconcelos Paiva e Brito
Embrapa Gado de Leite - Pesquisadora
Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco
36038-330 Juiz de Fora, MG
E-mail: mavpaiva@cnpgl.embrapa.br

O principal objetivo do diagnóstico microbiológico da mastite é oferecer resultados rápidos e seguros ao veterinário, para que ele possa identificar problemas do rebanho e tomar decisões a respeito de casos individuais.

Diversos aspectos são fundamentais para que o resultado do exame microbiológico seja reprodutível e confiável. Procedimentos padronizados foram publicados por International Dairy Federation (IDF, 1981) e National Mastitis Council (Oliver et al. 2004, Hogan et al. 2005). As padronizações detalham os procedimentos que devem ser seguidos, indicando, entre outros, o meio de cultivo a ser usado, volume de leite a ser inoculado para o isolamento, temperatura e tempo de incubação e testes para identificação de patógenos. Outro aspecto extremamente importante para a garantia da confiabilidade do exame é a coleta e conservação das amostras de leite. É também indispensável que o microbiologista responsável pelo diagnóstico laboratorial tenha conhecimento sobre os agentes causadores da mastite, a fonte de infecção e a transmissão destes agentes no rebanho leiteiro. Esse conhecimento é necessário para a correta interpretação dos microrganismos isolados de modo a gerar informações úteis para o controle da doença.

Agentes da mastite bovina

A mastite bovina pode ser causada por uma grande variedade de agentes, incluindo bactérias, micoplasma, leveduras, fungos e algas. Embora mais de 137 espécies, subespécies e sorotipos de microrganismos já tenham sido isolados de infecções da glândula mamária bovina (Watts, 1988), a maioria das infecções é causada por bactérias. Dentre as bactérias, um número limitado, dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* e do grupo dos coliformes causa a maior parte das infecções.

Considerando a fonte de infecção, os agentes da mastite são classificados em ambientais [ex.: *Escherichia coli*, coliformes, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus* spp, *Streptococcus equinus* (anteriormente *S. bovis*) e outros *Streptococcus* do ambiente] e contagiosos (ex.: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma*,

Corynebacterium bovis, *Staphylococcus* coagulase-negativos). Outra classificação divide os agentes da mastite em patógenos primários e secundários. Os patógenos primários incluem *S. agalactiae* e outras espécies de *Streptococcus*, *S. aureus* e *Mycoplasma* spp. Os secundários incluem *C. bovis* e *Staphylococcus* coagulase-negativos.

A aplicação deste conhecimento relacionado à origem do microrganismo e a importância de cada microrganismo na patogênese da doença é de relevância para a realização da cultura e identificação dos agentes da mastite. Enquanto para alguns organismos (ex.: *S. agalactiae*) é fundamental a identificação da espécie, para outros, é suficiente caracterizar o gênero ou o grupo a que eles pertencem (ex.: coliformes). De modo semelhante, é necessária a aplicação de testes para a correta identificação de *S. aureus* (coagulase-positivo) para diferenciar esse agente do grande número dos *Staphylococcus* coagulase-negativos. Um diagnóstico correto é imprescindível para se aplicar medidas diferenciadas de controle e sugerir alterações a respeito do manejo do rebanho.

Coleta de amostras para o exame microbiológico

Devido à grande variedade de patógenos que podem causar mastite, é essencial, para o diagnóstico seguro e correto, que todas as amostras submetidas para exame laboratorial sejam coletadas assepticamente, e em frascos estéreis. A contaminação das amostras de leite, por microrganismos localizados no canal ou orifício dos tetos, ou por microrganismos do ambiente, é um problema para o diagnóstico.

Antes de coletar a amostra, deve-se descartar os primeiros jatos de leite e fazer a antissepsia dos tetos com algodão embebido com álcool a 70%, iniciando-se pelos mais distantes. Quando os tetos estiverem secos, inicia-se a coleta de leite pelos mais próximos. Imediatamente após a coleta, as amostras devem ser colocadas em recipientes com gelo (temperatura 4-5°C) e mantidas nestas condições por até 24 horas até serem entregues no laboratório. Amostras que permanecem mais de 24 horas à temperatura ambiente ou na geladeira não devem ser utilizadas para diagnóstico bacteriológico. A refrigeração é importante para impedir o crescimento de contaminantes, pois as diferenças existentes, no tempo de crescimento entre gêneros e espécies de microrganismos, podem permitir que a população de um contaminante sobreponha a do patógeno de interesse. Caso não se possa enviá-las para o laboratório neste período, pode-se mantê-las congeladas por períodos curtos de até quatro semanas antes do exame. O congelamento pode afetar o isolamento de *Escherichia coli*, *Arcanobacterium pyogenes* e de espécies de *Nocardia*, mas não interfere com o isolamento de *S. aureus* e estreptococos, incluindo *Streptococcus agalactiae*,

Streptococcus dysgalactiae e *Streptococcus uberis* após quatro, oito e 16 semanas (Schukken et al. 1989; Oliver et al. 2004). No laboratório, deve-se examinar primeiro o aspecto de cada amostra e, em seguida, proceder à cultura.

Amostras contaminadas

A contaminação das amostras de leite é um dos principais problemas na identificação dos patógenos da mastite no exame microbiológico. Os microrganismos contaminantes podem estar presentes na pele dos animais ou do úbere, ou mesmo na pele do indivíduo que coleta as amostras. Muitos desses microrganismos podem ser agentes da mastite e o isolamento deles pode dificultar a interpretação da cultura. Quando se isola um microrganismo do ambiente juntamente com outros, nunca se pode dizer com segurança se ele é realmente o agente da mastite. Um microrganismo do ambiente pode ser considerado como causa de uma infecção intramamária quando ele é isolado: (1) em cultura pura de uma única amostra, (2) de amostras duplas obtidas na mesma coleta, ou, (3) de duas ou três amostras consecutivas coletadas em intervalos não superiores a 30 dias.

Quando se usam os cuidados de assepsia para coleta de amostras é possível reduzir a contaminação com as bactérias presentes na superfície ou orifício dos tetos, ou bactérias do ambiente. Vangroenweghe et al. (2001) comparou a contaminação de amostras de leite coletadas manualmente, com cuidados de assepsia e amostras coletadas através de cânula intramamária, que permitiu a coleta estéril do leite. Não houve diferença significativa entre a coleta manual e a coleta estéril com respeito à contaminação bacteriana das amostras.

Microbiologia dos casos clínicos de mastite

O exame microbiológico de amostras de leite de todos os casos clínicos de mastite fornece informações importantes para a determinação de estratégias de manejo e prevenção de novos casos. O exame de amostras de mastite clínica pode ser necessário também para o caso de infecções severas, que não respondem à terapia, para a decisão sobre o descarte de um determinado animal por problemas de mastite e para o monitoramento dos casos clínicos do rebanho. O ideal é examinar o leite dos quartos mamários com mastite clínica antes do início de qualquer tratamento

Entre 15% a 40% das amostras de leite de casos de mastite clínica podem dar resultados negativos após cultivo microbiológico, mesmo quando a coleta e os métodos de isolamento são aplicados de maneira correta (Bartlett et al. 1992; Olde Reikerink et al. 2008). O não isolamento do agente da mastite nestes casos pode ser por diversos motivos.

Entre estes, citam-se a eliminação espontânea da infecção, a baixa concentração dos patógenos no leite, o padrão de eliminação dos microrganismos, que pode alternar entre números elevados e mais baixos, a localização intracelular de determinados patógenos e a presença de substâncias inibitórias no leite. Os resultados negativos são reduzidos, mas não são eliminados quando se empregam técnicas que procuram aumentar as chances de isolamento.

Com alguns microrganismos, por exemplo, os coliformes, o número de bactérias na amostra pode ser muito baixo para ser detectado pelos métodos de rotina. Em outros casos, a infecção pode já ter sido eliminada, mas persiste uma elevada contagem de células, porque a cura das lesões não se completou e os leucócitos continuam se movimentando em direção à glândula mamária. Contudo, quando amostras de leite de um rebanho são sempre negativas na cultura, deve-se pensar, também, na possibilidade de um microrganismo não comum, que não cresce normalmente nos meios de cultivo usados na rotina laboratorial como, por exemplo, espécies de *Mycoplasma*.

Cultura do leite para avaliação do rebanho

O melhor modo de se conhecer o estado microbiológico do rebanho é realizando a cultura de todos os quartos mamários das vacas em lactação (Brito et al. 1999). Isto permite a identificação dos agentes e do nível de infecção do rebanho. Apresenta a desvantagem do custo elevado dos exames, dificultando sua adoção na rotina do acompanhamento de rebanhos. Uma alternativa para a redução dos custos é a cultura de amostras compostas de todos os quartos do mesmo animal. Nesse caso, deve-se ter o cuidado de obter quantidades aproximadamente iguais de leite de cada glândula, porque o número de glândulas infectadas por vaca influencia a sensibilidade da cultura. Amostras compostas tiveram alta sensibilidade para o isolamento de *S. agalactiae* (Dinsmore et al. 1991), mas menor sensibilidade para detecção de *S. aureus* (Lam et al. 1996). A sensibilidade relativa para o isolamento de *S. aureus* de amostras compostas de vacas com somente uma glândula infectada foi de 58%. Quando as quatro glândulas estavam infectadas foi de 89% (Lam et al. 1996).

O número de animais e/ou amostras a serem analisadas depende das questões a serem respondidas em cada rebanho. Em rebanhos com contagens de células somáticas elevadas [ou com grande número de quartos mamários com reações positivas no “California Mastitis Test” (CMT)], o problema, geralmente, é a alta prevalência de infecções subclínicas. Nestes rebanhos, a avaliação das infecções presentes pode ser feita pela cultura de uma amostragem de quartos mamários com base nos escores do CMT. O gasto com exames microbiológicos é

reduzido, mas pode não identificar animais infectados com patógenos primários que apresentam baixa contagem de células somáticas ou resultados negativos no CMT (Brito et al. 1999). Na Tabela 1 são apresentados resultados da cultura do leite dos quartos mamários das vacas em lactação de quatro rebanhos, de acordo com os escores do CMT. O número de vacas dos quatro rebanhos foi 115, correspondendo a 452 quartos mamários. Como pode ser observado, quartos mamários com escore negativo no CMT podem estar infectados com *S. aureus* e *S. agalactiae*, patógenos primários da mastite. Portanto, a seleção de somente animais com escore positivo no CMT para cultura do leite não identificaria esses casos.

Tabela 1. Microrganismos isolados em amostras de leite obtidas de todos os quartos mamários em quatro rebanhos em relação aos escores do “California Mastitis Test” (CMT)¹.

Resultados das culturas	Escore do CMT					Total
	Neg	Traço	+	++	+++	
<i>Staphylococcus aureus</i>	23	4	11	9	42	89
<i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos	20	4	9	2	12	47
<i>Streptococcus agalactiae</i>	10	1	8	4	18	41
<i>Streptococcus</i> spp do ambiente	0	1	1	0	2	4
<i>Corynebacterium</i> sp ²	57	10	14	7	7	95
Materiais contaminados ³	9	0	0	0	1	10
Sem crescimento	166	4	9	0	4	183
TOTAL	285	24	52	22	86	469

¹ Dados do autor.

² *Corynebacterium* sp.: bastonetes gram-positivos, com características morfológicas e coloniais de *Corynebacterium bovis*.

³ Materiais contaminados: houve crescimento de mais de três tipos diferentes de colônias.

A análise de somente uma amostra de leite reduz as chances de isolamento do microrganismo presente. Sears et al. (1990) mostraram que glândulas mamárias infectadas com *S. aureus* apresentam um padrão cíclico de eliminação da bactéria no leite, em que altos e baixos números se alternam. A probabilidade de uma única amostra permitir o isolamento de *S. aureus* foi de 74,5%. O exame de duas e três amostras consecutivas aumenta essa probabilidade para 94% e 98%, respectivamente. A partir desse resultado, há uma recomendação geral de se examinar duas ou três amostras de leite consecutivas para aumentar a sensibilidade da cultura de vacas infectadas por *S. aureus*, principalmente aquelas com baixas contagens de células somáticas.

No diagnóstico de infecções intramamárias, o critério mais amplamente aceito, é o isolamento do mesmo microrganismo de duas amostras coletadas em duplicata, ou de duas, em três amostras consecutivas, obtidas pelo menos com um dia de intervalo entre elas. O menor intervalo entre coletas feitas no mesmo dia que causou menor impacto na sensibilidade de isolamento de *S. aureus* foi de aproximadamente 12 horas, e o intervalo de três dias foi o que mostrou maior sensibilidade (Buelow et al. 1996). Na rotina do diagnóstico, culturas múltiplas não são possíveis para a maioria dos rebanhos, porque aumentam muito o custo dos exames. Entretanto, nos trabalhos de pesquisa, esse procedimento deve ser seguido, de modo a se obter maior confiabilidade dos resultados.

Outro critério que tem sido adotado em trabalhos de pesquisa da mastite bovina é a coleta de duas amostras em duplicata, isto é, coletadas imediatamente uma após a outra. Foi encontrada concordância geral de 98,1% entre os pares dessas amostras, sendo maior entre os patógenos contagiosos. Esta foi de 96,4% para *S. agalactiae* e de 94,2% para *S. aureus*. Para outros estreptococos foi de 81,6% e para coliformes, de 55,6% (Erskine & Eberhart 1988).

Exame microbiológico na fazenda

O exame microbiológico do leite de casos clínicos de mastite na própria fazenda (*on-farm*) tem sido adotado em alguns países, em rebanhos com grande número de vacas em lactação e pessoal capacitado. Pequenos laboratórios são estabelecidos, e a cultura emprega métodos simplificados e meios de cultura pré-fabricados, de modo a se obter uma indicação do agente da mastite 18 a 24 horas após a detecção do quadro clínico. O principal objetivo do uso deste sistema é estabelecer protocolos para tratamento dos casos clínicos e monitoramento de programas de controle de mastite.

Os protocolos de tratamento adotados consideram o patógeno envolvido e a severidade dos sintomas clínicos. Os casos clínicos com sintomatologia severa e comprometimento sistêmico são tratados imediatamente. Aqueles que apresentarem sintomatologia moderada e leve são separados e tratados ou não, de acordo com o resultado da cultura (Nesser et al. 2006; Godden et al. 2007). São tratados os casos em que houver crescimento de bactérias Gram-positivas, e não se recomenda tratamento quando não houver crescimento bacteriano, ou quando se detectam bactérias Gram-negativas. Os rebanhos que adotaram a cultura dos casos clínicos na fazenda argumentam que esse procedimento contribuiu para a redução do uso de antimicrobianos, sem reduzir a efetividade do tratamento e, conseqüentemente, reduziu os dias de descarte de leite devido ao tratamento (Nesser et al., 2006; Ruegg et al. 2009).

O diagnóstico microbiológico da mastite na fazenda emprega uma metodologia simplificada, que dá uma indicação do agente presente. Há diversos trabalhos de pesquisa que avaliam sistemas comerciais compostos de placas divididas em duas ou em três partes contendo o meio de cultura pronto para uso ou Petrifilms (Godden et al., 2007; McCarron et al. 2009a,b). Os meios de cultura empregados nas placas são seletivos para os principais grupos de patógenos envolvidos na mastite. Para bactérias Gram-negativas, geralmente usa-se o agar MacConkey, para bactérias do grupo dos estreptococos, agar TKT e para *Staphylococcus*, agar Baird-Parker ou Vogel-Johnson (Godden et al. 2007). Outros meios podem ser adicionados, para se ter um diagnóstico mais acurado. A interpretação dos resultados dependerá do crescimento obtido em cada tipo de meio de cultura. Para a identificação de Gram-negativos é necessário que o crescimento ocorra somente no agar MacConkey. Quando há o crescimento nos outros meios e também no MacConkey há indicação de contaminação da amostra (Godden et al. 2007; McCarron et al. 2009a, Ruegg et al. 2009). Quando comparado à metodologia tradicional (Oliver et al. 2004, Hogan et al. 2005), este sistema apresentou boa sensibilidade e especificidade para identificar ausência de crescimento e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, mas sensibilidade baixa para identificar patógenos individuais, por exemplo, *S. aureus*, *S. uberis*, *S. agalactiae* (Godden et al. 2007; McCarron et al. 2009a). A cultura na fazenda não detectará também microrganismos que requerem condições de cultivos especiais, como por ex. *Mycoplasma*.

Um aspecto importante na cultura do leite na fazenda é a obtenção da amostra. Se há crescimento de diversos tipos de microrganismo, a amostra é considerada contaminada e não se pode decidir sobre o tratamento considerando o crescimento obtido. De modo semelhante ao exame tradicional, a cultura do leite na fazenda depende do treinamento de pessoal para a coleta de amostras de leite para evitar a contaminação com microrganismos do ambiente. Os procedimentos adotados na fazenda necessitam de supervisão de pessoal capacitado para monitorar a qualidade dos dados e o uso apropriado das informações obtidas (Sears et al. 2003).

Cultura do leite do tanque de refrigeração

O exame microbiológico do leite total da fazenda (leite do tanque) tem sido muito difundido com o objetivo de avaliação da qualidade do leite e monitoramento do *status* da saúde do úbere do rebanho. Além da contagem total de bactérias aeróbicas do leite, grupos específicos de microrganismos são examinados, incluindo os patógenos contagiosos da mastite, *S. aureus* e *S. agalactiae* (Brito et al. 1998; Brito et al. 2002a). A detecção de

patógenos contagiosos da mastite é feita empregando-se meios seletivos e indicadores para *S. agalactiae* (TKT ou Edwards modificado) e para *S. aureus* (ágar sal manitol ou Vogel-Johnson). Outros meios também incluídos são ágar MacConkey para detecção de coliformes e bactérias Gram-negativas e Hayflick modificado para detecção de *Mycoplasma*.

Os procedimentos para o exame, coleta de amostras, volume a ser inoculado e número de amostras que devem ser examinadas são descritos em Oliver et al. (2004) e Hogan et al. (2005). Devido às variações na eliminação dos patógenos contagiosos, há necessidade de se coletar várias amostras do leite do tanque (três ou quatro), em dias diferentes (Tabela 2). Quando presente, *S. agalactiae* e *Mycoplasma* são isolados com mais facilidade do que *S. aureus*.

Tabela 2. Resultados de isolamento de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* em três amostras consecutivas do leite do tanque e de amostras obtidas de todos os quartos mamários de quatro rebanhos¹

Rebanhos (total de animais)	Bactérias	No. de animais infectados no rebanho (%)	No. quartos infectados no rebanho (%)	Amostras do tanque ²		
				1a. coleta	2a. coleta	3a. coleta
A (55)	<i>S. aureus</i>	01 (1,8%)	02 (0,9%)	+	+	+
	<i>S. agalactiae</i>	01 (1,8%)	01 (0,46%)	-	+	-
B (52)	<i>S. aureus</i>	10 (19,2%)	12 (5,9%)	+	+	+
	<i>S. agalactiae</i>	0	0	-	-	-
C (47)	<i>S. aureus</i>	08 (17,0%)	10 (5,4%)	-	-	+
	<i>S. agalactiae</i>	05 (10,6%)	07 (3,8%)	+	-	+
D (119)	<i>S. aureus</i>	10 (8,4%)	10 (2,2%)	+	+	+
	<i>S. agalactiae</i>	10 (8,4%)	17 (3,7%)	+	+	+

¹ Compilado de Brito, et al., 1998.

² Os sinais positivo e negativo indicam, respectivamente, isolamento e não-isolamento de *S. aureus* ou *S. agalactiae*.

A presença de microrganismos do ambiente deve ser cuidadosamente interpretada neste teste, porque nunca será possível afirmar com certeza que esses microrganismos originaram de infecção intramamária. O número de coliformes mais provavelmente, se relaciona com contaminação da pele dos tetos no momento da ordenha. O mesmo pode acontecer com estreptococos do ambiente. Quando números elevados de microrganismos do ambiente são isolados indica que devem ser revistos os procedimentos de higienização dos tetos antes da ordenha. Problemas relacionados à higiene da ordenha, refrigeração do leite e

de limpeza e higienização dos equipamentos de ordenha, podem ser detectados quando se examinam outros grupos de microrganismos, como psicrotróficos e termodúricos. O número dos microrganismos psicrotróficos pode ser estimado pela contagem total de bactérias após a incubação do leite a 12,8°C, durante 18 horas e comparação do resultado com a contagem total de microrganismos aeróbicos feita antes da incubação. Microrganismos termodúricos podem ser avaliados pela contagem total de bactérias depois aquecer a 62,8°C durante 30 minutos no laboratório. Essas duas análises são chamadas em inglês de *Preliminary incubation count* (PIC) e *Lab pasteurized count* (LPC), respectivamente.

Antibiograma

O antibiograma é um teste que oferece como resultado padrões de resistência ou sensibilidade de uma amostra bacteriana específica a vários antimicrobianos (antibióticos ou quimioterápicos). Os resultados do antibiograma são interpretados e usados para tomar decisões sobre tratamento.

Os métodos usados para realização do antibiograma baseiam-se na difusão do antimicrobiano a partir de discos colocados sobre a camada de agar ou no contato direto da suspensão padronizada da bactéria com diferentes concentrações do antimicrobiano, incorporadas em meios de cultivo sólido ou líquido. Este último permite determinar a menor concentração do antimicrobiano que inibe completamente o crescimento da bactéria (CIM: Concentração Inibitória Mínima). Como são mais elaborados, são menos empregados na rotina. Contudo, sistemas comerciais que permitem determinar a CIM são disponíveis no mercado, e têm sido usados para os agentes da mastite, em alguns laboratórios especializados.

O teste mais usado na rotina laboratorial dos trabalhos de mastite é o da difusão do antimicrobiano. Nesta técnica, a suspensão padronizada do organismo em teste é espalhada na superfície do meio de cultura. O antimicrobiano, impregnado em um disco de papel de filtro, quando colocado sobre o meio de cultura inoculado com a suspensão bacteriana, difunde-se, formando um gradiente de concentração. A velocidade de difusão é produto da interação entre as moléculas do agente antimicrobiano e o meio. Portanto, o teste pode ser influenciado pela quantidade do antimicrobiano nos discos, densidade do gel de agar, difusibilidade do agente em solução aquosa, força iônica da composição do meio de cultura e profundidade do agar.

Este é um processo dinâmico, à medida que a incubação prossegue, o gradiente de concentração se altera e ao mesmo tempo acontece a multiplicação bacteriana. A zona de inibição do crescimento bacteriano que resulta é diretamente proporcional à susceptibilidade do microrganismo, desde que todas as variáveis que afetam a difusão da droga sejam

mantidas constantes. A concentração do inóculo também é uma variável que afeta a zona de inibição. Com inóculos mais concentrados, há maior chance de haver crescimento visível antes que o antimicrobiano possa se difundir ao redor do disco. Se o inóculo é pouco concentrado, ocorre o contrário.

Desse modo, para se obter resultados confiáveis no teste de difusão em agar, é muito importante que os detalhes técnicos deste procedimento sejam cuidadosamente padronizados e controlados. É recomendado seguir a metodologia padronizada pelo CLSI (Clinical and Laboratory Institute, anteriormente chamado NCCLS) que é a Instituição que padroniza o método empregado em medicina humana. O Documento M31-A3 (terceira edição) é uma padronização feita especialmente para testes de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias de origem animal (CLSI, 2008). Além de seguir rigorosamente o detalhamento técnico descrito é necessário avaliar periodicamente os procedimentos técnicos do laboratório, empregando as bactérias recomendadas para controle, que possuem halos de inibição conhecidos para diferentes antibióticos.

O método de antibiograma pela difusão do antibiótico na superfície de placas de ágar é recomendado principalmente para bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, do grupo coliforme e espécies relacionadas. Não pode ser usado para organismos que crescem lentamente, como *A. pyogenes*.

O antibiograma é um teste muito solicitado no diagnóstico da mastite para auxiliar na escolha do antimicrobiano para tratamento, e aumentar as possibilidades de cura. É também essencial para os casos que não apresentam melhora e sugerem problemas de resistência ao antimicrobiano administrado. Mas, em geral, na rotina do manejo dos casos clínicos na fazenda, o tratamento da mastite é iniciado logo que se detecta o caso clínico, isto é, antes se fazer a cultura, identificação do agente e o antibiograma. Isto se deve ao tempo requerido para a cultura, que necessita de incubação de pelo menos 24 horas para o crescimento da bactéria e da necessidade do isolamento da bactéria antes de se fazer o antibiograma.

A escolha do antimicrobiano para o tratamento é feita considerando-se a severidade da manifestação clínica, o histórico das culturas anteriores e sensibilidade aos antimicrobianos e experiência do médico-veterinário. Ainda, devido à diversidade de agentes da mastite, na maioria dos tratamentos a opção é feita para antimicrobianos de amplo-espectro. Por outro lado, nem sempre um resultado indicando susceptibilidade *in vitro* é garantia de efetividade *in vivo*. A efetividade do agente antimicrobiano dependerá de diversos fatores, como o tipo microrganismo envolvido, a resposta imune do animal, a distribuição do antimicrobiano e

concentração atingida no tecido mamário inflamado e a capacidade da resposta imune do animal.

Referências

1. BARTLETT, P.C.; MILLER, G.Y.; LANCE, S.E.; HEIDER, L.E. Clinical mastitis and intramammary infections on Ohio dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 12, p.59-71, 1992
2. BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PORTUGAL, J.A.B. Identificação de contaminantes bacterianos no leite cru de tanques de refrigeração. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*. v. 57, n. 327, p. 83-88, 2002.
3. BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; RIBEIRO, M.T.; VEIGA, V.M. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, n. 2, p. 129-135, 1999.
4. BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; SOUZA, H.M.; VARGAS, O.L. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 18, n. 1, p. 39-44, 1998.
5. BUELOW, K.L.; THOMAS, C.B.; GOODGER, W.J.; NORDLUND, K.V.; COLLINS, M.T. Effect of milk sample collection strategy on the sensitivity and specificity of bacteriologic culture and somatic cell count for detection of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in dairy cattle. *Prev. Vet. Med.*, v. 26, p. 1-8, 1996.
6. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria inaccessible from Animals; Approved Standard - 3 ed. CLSI document M31-A3. v. 28, n. 8, 2008. 116p.

7. DINSMORE, R.P.; ENGLISH, P.B.; GONZALEZ, R.N.; SEARS, P.M.; SCHULTE, H.F. Evaluation of methods for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae* intramammary infections in dairy cattle. J. Dairy Sci., v. 74, p. 1521-1526, 1991.
8. ERSKINE, R.J.; EBERHART, R.J. Comparison of duplicate and single quarter milk samples for the identification of intramammary infections. J. Dairy Sci., v. 71, p. 854-856, 1988.
9. GODDEN, S.; LAGIO, A.; BEY, R.; LESLIE, K.; RUEGG, P.; DINGWELL, R. Use of on-farm culture systems in mastitis control programs. NATIONAL MASTITIS COUNCIL REGIONAL MEETING, 2007, Visalia, California. Proceedings... Verona: National Mastitis Council, 2007.p.1-9.
10. HOGAN, J.S.; GONZÁLEZ, R.N.; HARMON, R.J.; NICKERSON, S.C.; OLIVER, S.P.; PANKEY, J.W.; SMITH, K.L. Laboratory handbook on bovine mastitis. Verona: National Mastitis Council. 2005, 222p.
11. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Laboratory methods for use in mastitis work. Brussels, 1981. 27p. (Bulletin 132).
12. LAM, T.J.G.M.; van WUIJCKHUISE, L.A.; FRANKEN, P.; MORSELT, M.L.; HARTMAN, E.G.; SCHUKKEN, Y.H. Use of composite milk samples for diagnosis of *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cattle. Journal of American Veterinary Medical Association, v. 208, p. 1705-1708, 1996.
13. McCARRON, J.L.; KEEFE, G.P.; McKENNA, S.L.B.; DOHOO, I.R.; POOLE, D.E. Laboratory evaluation of 3M petrifilms and University of Minnesota bi-plates as potential on-farm tests for clinical mastitis. Journal of Dairy science, v. 92, p.2297-2305, 2009.
14. McCARRON, J.L.; KEEFE, G.P.; POOLE, D.E. Preliminary laboratory evaluation of the Minnesota easy culture system II tri-plate and the 3M petrifilm staph express plate using clinical mastitis samples. NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING. 48. 2009, Charlotte, North Caroline. Proceedings... Verona: National Mastitis Council, 2009. p.144-145.

15. NESSER, N.L.; HUESTON, W.D.; GODDEN, S.M.; BEY, R.F. Evaluation of the use of an on-farm system for bacteriologic culture of milk from cows with low-grade mastitis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.228, n.2, p.254-260, 2006.
16. OLDE REIKERINK, R.G.; BARKEMA, H.; KELTON, D.; SCHOLL, D. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *Journal of Dairy Science*, v.91, p.1366-1377, 2008.
17. OLIVER, S.P.; GONZÁLEZ, R.N.; HOGAN, J.S.; JAYARAO, B.M.; OWENS, W.E. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. 4 ed. Verona, WI: National Mastitis Council. 2004. 47p.
18. RUEGG, P.; GODDEN, S.; LAGO, A.; BEY, R.; LESLIE, K. On-farm culturing for better milk quality. Western Dairy Management Conference, Reno, NV. Proceedings... p.149-159, 2009 (<http://www.wdmc.org/proceed.htm>).
19. SEARS, P.M.; McCARTHY, K.K. Diagnosis of mastitis for therapy decisions. *Veterinary Clinics of North American Food Animal Practice*. V.19, p.93-108, 2003.
20. SEARS, P.M.; SMIT, B.S.; ENGLISH, P.B.; HERER, P.S.; GONZALEZ, R.N. Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections. *Journal of Dairy*, v. 73, p. 2785-2789, 1990
21. SCHUKKEN, Y.H.; SMIT, J.A.H.; GROMMERS, F.J.; VANDEGEER, D.; BRAND, A. Effect of freezing on bacteriologic culturing of mastitis milk samples. *Journal of Dairy Science*, v. 72, p. 1900-1906, 1989.
22. VANGROENWEGHE, F.; DOSOGNE, H.; MEHRZAD, J.; BURVENICH, C. Effect of sampling techniques on milk composition, bacterial contamination, viability and functions of resident cells in milk. *Veterinary Research*, v. 32, p. 565-579, 2001.
23. WATTS, J.L. Etiological agents of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, v.16, p.41-68, 1988.