



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PARANÁ**

**CAMPUS LUIZ MENEGHEL**

**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**GABRIEL LOURENZO REZENDE SOARES**

**AVALIAÇÃO DE RESÍDUO DE SULFATO DE GENTAMICINA NO LEITE DE  
VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA TRATADAS POR VIA INTRAMAMÁRIA**

**BANDEIRANTES, PR, BRASIL  
2018**

GABRIEL LORENZO REZEDE SOARES

**AVALIAÇÃO DE RESÍDUO DE SULFATO DE GENTAMICINA NO LEITE DE  
VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA TRATADAS POR VIA INTRAMAMÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado  
em Agronomia, da Universidade Estadual do  
Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel.

Orientador(a): Prof. Dr.  
Marcelo Alves da Silva  
Coorientador(a): Prof. Dr.  
Eder Paulo Fagan

BANDEIRANTES, PR, BRASIL  
2018

**Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central do Campus Luiz Meneghel  
da Universidade Estadual do Norte do Paraná.**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S237i Santos, Esmael Lopes dos.  
Influência do Genótipo sobre as concentrações de proteína em  
sementes de soja[ (Glycine mas (L.)) / Esmael Lopes dos  
Santos – Bandeirantes, 2013.  
53f.

Orientador: Cristina Batista Lima  
Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual  
do Norte do Paraná, 2013.  
Bibliografia: f. 15-24; 47-53

1. Soja- Sementes – Teses. 2. Plantas oleaginosas – Teses.  
I. Lima, Cristina Lima. II. Universidade Estadual do Norte  
do Paraná. III. Título.

CDU 633.34

GABRIEL LOURENZO REZENDE SOARES

**AVALIAÇÃO DE RESÍDUO DE SULFATO DE  
GENTAMICINA NO LEITE DE VACAS COM MASTITE  
SUBCLÍNICA TRATADAS POR VIA INTRAMAMÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em  
Agronomia, da Universidade Estadual do Norte do  
Paraná, *Campus Luiz Meneghel*.

Aprovada em: 20/03/2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Alves da Silva

UENP

Prof. Dr. Petrônio Pinheiro Porto

UENP

Dra. Anna Carolina Leonoelli Pires de Campos

---

Prof. Dr. Marcelo Alves da Silva  
Orientador  
Universidade Estadual do Norte do Paraná,  
*Campus Luiz Meneghel*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todas as pessoas que colaboraram para a realização desse projeto. Ao professor doutor Marcelo Alves da Silva e ao professor doutor Eder Paulo Fagan. Agradeço aos professores participantes da banca examinadora, doutor Petrônio Pinheiro Porto e doutora Anna Carolina Leonoelli Pires de Campos. Em especial ao Thiago Magon, da Universidade Estadual de Maringá, pelo apoio sem medir esforços. Agradeço ao proprietário Arnaldo Teixeira e todos os seus funcionários (Marcinho, João e dona Geni) pelo apoio à pesquisa realizada. Sem eles, não haveria local para desenvolvê-la. À secretaria do programa de mestrado e em especial a Sônia Fronteli, pelo carinho e dedicação dispostos aos alunos. Agradeço, também, a empresa DSM por possibilitar a realização das análises promovidas neste estudo. Por fim, a Deus, esposa, filho e família.

SOARES, Gabriel Lourenzo Rezende. **Avaliação de resíduo de sulfato de gentamicina no leite de vacas com mastite subclínica tratadas por via intramamária**. 2018. Dissertação de Mestrado em Agronomia - Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus Luiz Meneghel*, Bandeirantes, 2018.

## RESUMO

Objetivou-se com esse trabalho investigar a presença de resíduo de gentamicina no leite dos quartos mamários tratados e adjacentes não tratados com gentamicina; verificar a influência do tratamento da mastite subclínica, durante a lactação, sobre a contagem de células somáticas, teor de gordura, proteína total e lactose. Trataram-se cinco vacas com contagem de células somáticas inferior a 200.000 e negativas no CMT (grupo 01, n = 5) e dez vacas com contagem de células somáticas acima de 200.000 e positivas no CMT (grupo 02: um quarto mamário com score 1 no CMT, n = 5 e grupo 03: pelo menos um quarto mamário score 2 ou 3 no CMT, n = 5) com duas infusões intramamárias de 150 mg de sulfato de gentamicina com intervalo de 24 horas entre as aplicações. O tratamento foi feito no quarto anterior direito dos animais do grupo 01 (sem mastite) e no quarto positivo no CMT dos animais dos grupos 02 e 03. A pesquisa por antimicrobiano foi feita nos tempos 0, 12, 36, 120 e 144 (horas após a primeira infusão) no leite dos quartos mamários tratados e 0, 12, 36, 72 e 120 (horas após a primeira infusão) dos quartos não tratados. Colheram-se amostras de leite dos animais dos grupos 01, 02 e 03 do quarto mamário tratado e do pool dos quartos não tratados e realizou-se análise de CCS e sólidos do leite no tempo 0 e 15 dias após o tratamento. Foi feito teste de inibição microbiológica para detecção de resíduo de gentamicina com sensibilidade mínima de 50 µg/ L de leite, abaixo do Limite Máximo de Resíduo permitido de 200 µg/ L (Delvotest® SP NT). Não houve diferença significativa para a média da CCS e sólidos do leite entre as amostras do tempo 0 e 15 dias após o tratamento nos grupos 01, 02 e 03 ( $P \leq 0,05$ , em teste T para amostras pareadas). O resíduo de gentamicina apresentou frequência decrescente de amostras positivas no grupo 01 e no tempo 144 (24 horas após o término do período de carência do antimicrobiano) após a primeira infusão apresentou 40% de amostras positivas no leite dos quartos mamários tratados. No grupo 02, para o leite dos quartos mamários tratados, houve frequência de 80% de amostras positivas no tempo 144. No grupo 03, 80% das amostras de leite dos quartos mamários tratados foram positivas no tempo 144 e no pool do leite dos quartos mamários não tratados todas as amostras foram negativas em todos os tempos, contudo, 60% das amostras no tempo 36 apresentaram resultado de resíduo próximo ao limite de detecção do Delvotest® SP NT. O leite de quartos mamários não tratados adjacentes a um quarto com mastite subclínica tratado com sulfato de gentamicina não apresenta resíduo acima do limite máximo de resíduo permitido pela legislação e é considerado seguro para consumo humano. O leite de quartos mamários tratados com gentamicina permaneceram positivos ao Delvotest® SP NT em 40%, 80% e 80% das amostras no grupos 01, 02 e 03 após o término do período de carência estabelecido pelo fabricante.

**Palavras-chave:** Antibiótico. Infecção. Intramamária. Descarte. Carência

SOARES, Gabriel Lourenzo Rezende. **Valuation of gentamicin sulphate residue in milk of cows with subclinical mastitis treated by intramammary infusion.** 2018. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Estadual do Norte do Paraná, Bandeirantes, 2018.

## ABSTRACT

The objectives of this study were to investigate the presence of gentamicin residue in milk of treated and adjacent mammary quarters not treated with gentamicin; verify the influence of subclinical mastitis treatment, during the lactation, on somatic cell count, fat, total protein and lactose. Five cows with somatic cell count less than 200,000 and negative in CMT (group 01, n = 5) and ten cows with somatic cell count above 200,000 and positive in CMT (group 02: one mammary quarter score 1 on CMT, n = 5 and group 03: leastwise on mammary quarter score 2 or 3 on CMT, n = 5) were treated with two intramammary infusions of 150 mg of gentamicin sulphate with a 24hour interval between applications. The treatment was made in the anterior right mammary quarter of the animals of group 01 and in the positive mammary quarter in CMT of the animals of groups 02 and 03. Milk samples were analyzed from the animals at 0, 36, 72, 120 and 144 of milk of treated quarters and 0, 12, 26, 72 and 120 hours in not treated quarters after the first infusion. Milk samples were analyzed from the animals of groups 01, 02 and 03 of the milk of treated mammary quarters and the pool of untreated quarters and performed analysis of CCS and milk solids at time 0 and 15 days after treatment. A microbiological inhibition test was performed to detect gentamicin residue with a minimum sensitivity of 50 µg/L, below the maximum allowable residue limit of 200 µg/L, (Delvotest® SP NT). There was no significant difference for CCS and milk solids means between samples of time 0 and 15 days after treatment in groups 01, 02 and 03 ( $P \leq 0.05$ , in T-test for paired samples). The gentamicin residue had a decreasing frequency of positive samples in group 01 and at the end of the analyzes, at time 144 (24 hours after the end of withdrawal period) after the first infusion, presented 40% of positive samples in milk of treated mammary quarters. In milk of untreated mammary quarters all samples were negative at all times. In group 02, for milk of treated mammary quarters, there was 80% of positive samples at time 144. In milk of untreated mammary quarters all samples were negative at all times collected. In group 03, 80% of milk of treated mammary quarters samples were positive at time 144 and in milk of untreated mammary quarters, all samples were negative, however, 60% of the samples had residue close to the detection limit in time 36. Milk from untreated mammary quarters adjacent to subclinical mammary quarter treated with gentamicin sulfate does not present residue above the maximum residue limit allowed by legislation and is considered safe for human consumption. Milk from gentamicin treated mammary quarters remained positive to Delvotest® at 40%, 80% and 80% in groups 01, 02 and 03 after the end of the withdrawal period established by the manufacturer.

**Key-words:** Antibiotic. Infection. Discard. Withdrawal period.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>11</b>
2.1 Normatização da qualidade do leite no Brasil	11
2.2 Mastite	13
2.2.1 Mastite Subclínica	16
2.3 Antimicrobianos	18
2.4 Resíduo de antimicrobianos no leite	21
2.4.1 Pesquisa por Resíduos de Gentamicina no Leite	24
2.5 Antimicrobianos e a relação com a saúde pública	25
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
<b>4 QUANTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE SULFATO DE GENTAMICINA NO LEITE DE VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA TRATADAS POR VIA INTRAMAMÁRIA</b>	<b>29</b>
4.1 Material e Métodos	29
4.1.1 Aprovação pela Comissão de Ética no uso de animais da Universidade Estadual do Norte do Paraná – CUA/UENP	29
4.1.2 Características da Propriedade	29
4.1.3 Animais selecionados	30
4.1.4 Tratamento	31
4.1.5 Colheita das amostras de leite	31
4.1.6 Análise de resíduo de gentamicina	32
4.1.7 Análises estatísticas	33
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>34</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>44</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b>	<b>45</b>
<b>8 ANEXO</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A pecuária leiteira no Brasil evoluiu desde a década de 1990 em sua produção e qualidade da matéria-prima. Quanto à produção, além do aumento do número de vacas ordenhadas, os fatores que impulsionaram essa melhora foram o acréscimo do mérito genético do rebanho por meio da utilização de biotecnologias da reprodução (por exemplo, a inseminação artificial), avanços no conhecimento e emprego da nutrição animal, manejo do rebanho e, não menos importante, estudos no aprimoramento da gestão econômica qualificada (JUNG e JÚNIOR, 2017).

Por outro lado, a qualidade do leite obteve melhora principalmente pela ação vigente de instruções normativas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que visam a regulamentação básica, o controle e a vigilância dos resíduos nos produtos de origem animal, incluindo o leite. Dentre essas regulamentações está o controle de resíduos em produtos de origem animal, entre eles os antimicrobianos.

Resíduos de droga veterinária são a fração, seus metabólitos, produtos de conversão ou reações e impurezas que permanecem no leite de vacas em lactação após o tratamento (CASELANI, 2014). O controle baseia-se em dois pilares principais: melhorar a produtividade e qualidade dessa matéria-prima pensando no consumidor final e proporcionar condições para que o Brasil, no ponto de vista sanitário, se adeque as regras do comércio internacional de alimentos, preconizadas pela Organização Mundial do Comércio (OMC) e órgãos auxiliares (BRASIL, 1999).

Em 2011, o MAPA expediu a Instrução Normativa número 62 (substituiu a Instrução Normativa nº 51 do MAPA de 2002) que estabelece requisitos físicos, químicos, microbiológicos, de contagem de células somáticas e de resíduos químicos para o leite tipo A e cru refrigerado (BRASIL, 2011).

Não apenas para regulamentar a qualidade do leite em seus aspectos intrínsecos está a Instrução Normativa número 62, ela também regulamenta o controle da sanidade do rebanho em propriedades leiteiras que produzem tanto o leite do tipo A quanto o leite cru refrigerado. Estabelece que toda propriedade produtora de leite deve possuir controle sistemático de parasitoses e mastite sob responsabilidade de médico veterinário e controlar o uso e resíduos de drogas veterinárias em animais em tratamento para evitar a presença de resíduo de droga veterinária acima do Limite Máximo de

Resíduo previsto (BRASIL, 1999; BRASIL, 2011).

Dentre as doenças que levam ao tratamento com medicamentos veterinários de uso geral, está a mastite: inflamação da glândula mamária que tem como principais agentes etiológicos as bactérias (RUEGG, 2017). A base fundamental do tratamento é a terapia com antimicrobianos, por via parenteral de forma sistêmica, ou por infusão intramamária através da cisterna do teto até a cisterna da glândula mamária (KAYITSINGA et al., 2017).

Coelho, 2003, observou presença de resíduos de antimicrobiano em quartos mamários adjacentes a quartos tratados por via intramamária por método qualitativo de pesquisa. Não há relatos de estudos que realizaram a pesquisa por antimicrobianos em quartos não tratados adjacentes a quartos tratados por via intramamária por método quantitativo confirmatório (BRASIL, 1999; FERREIRA et al., 2012).

Quando o tratamento é feito por via parenteral (intravenosa ou intramuscular) é sabido que leite de todos os quartos apresentará resíduo (RAIA, 2001; SPINOSA, 2017). Porém, quando o tratamento é por via intramamária surge a dúvida se há absorção sistêmica e biodisponibilidade para que atinja os demais quartos não tratados e, ainda, havendo essa possibilidade, se a excreção de resíduo será acima ou abaixo dos LMR durante o tratamento e influenciado pelo grau de inflamação da glândula em tratamento. Sendo abaixo do LMR, vacas em lactação sob tratamento contra mastite com antimicrobiano intramamário não necessariamente devem ser afastadas da produção e o leite dos quartos não tratados pode ser aproveitado como cru refrigerado ou tipo A para comercialização.

Portanto, os objetivos desse trabalho foram: investigar a presença de resíduo de gentamicina nos quartos mamários tratados e adjacentes não tratados até o término do período de carência; verificar a influência do tratamento da mastite subclínica bovina, efetuado durante a lactação, sobre a contagem de células somáticas e sólidos do leite.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 NORMATIZAÇÃO DA QUALIDADE DO LEITE NO BRASIL**

Normatizar a qualidade do leite significa estabelecer requisitos para a produção no que concerne aos fatores físicos, químicos e microbiológicos, dentre eles CCS e resíduos. Entende-se que isso é necessário não somente para criar padrão de qualidade e conhecer o valor nutricional para agregar valor ao produto final, como também para evitar fraudes nesse produto durante, principalmente, o seu processamento (CANUTO et al., 2010; BRASIL, 2011; SILVA et al., 2013).

Entende-se por leite, de maneira geral, o produto originado da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. Atualmente existem três tipos de leite reconhecidos pela Instrução Normativa número 62 do MAPA, que é vigente. O leite tipo A é necessariamente produzido, beneficiado e envasado em granja leiteira. Leite cru refrigerado é produzido e não processado em propriedade leiteira e mantido refrigerado no máximo a 7 graus Celsius. Leite pasteurizado é o leite fluido elaborado a partir do leite cru refrigerado sob especificações que respeitem as normas técnicas fixadas (BRASIL, 2011).

Os requisitos físicos referem-se aos componentes do leite, exceto a água, e os químicos aos resultados do leite frente a testes químicos, que revelam características únicas do leite. Quanto aos microbiológicos, referem-se à presença e quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC/ mL), constituídas por bactérias mesófilas, capazes de crescer entre 10<sup>0</sup>C e 45<sup>0</sup>C, dos grupos lactobacilos, estreptococos, lactococos e coliformes (SILVA, 2012). A contagem de células somáticas determina a quantidade de leucócitos e células epiteliais presentes no leite – resultado diretamente ligado à inflamação da glândula mamária (BRASIL 2011, MARQUES et al., 2016). O requisito estabelecido para a presença de resíduos químicos são os Limites Máximos de Resíduo (LMR), previstos no PNCRC do MAPA e na Instrução Normativa número 42 (BRASIL, 2011). Os requisitos citados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Requisitos físicos, químicos, microbiológicos, de contagem de células somáticas e presença de resíduos químicos segundo Instrução Normativa número 62 do MAPA para o leite cru refrigerado.

Requisitos	Limites
<sup>1</sup> Matéria gorda, g /100 g	Teor original, com o mínimo de 3,0
<sup>2</sup> Densidade relativa a 15/ <sup>15</sup> °C g/ml ( <sup>2</sup> )	1,028 a 1,034
<sup>2</sup> Acidez titulável, g ácido láctico/100ml	0,14 a 0,18
<sup>1</sup> Extrato seco desengordurado, g/100g	Mínimo 8,4
<sup>2</sup> Índice crioscópico (°H)	- 0,530 a -0,550
<sup>1</sup> Proteínas, g/100g	Mínimo 2,9
<sup>3</sup> Contagem Padrão em Placas (UFC/ mL)	100.000
Contagem de células somáticas (células/ml/leite)	400.000
Pesquisa de Resíduo de Antibióticos / Outros Inibidores do crescimento microbiano/ Reconstituintes de densidade/ Neutralizantes do crescimento microbiano	

<sup>1</sup>Físico <sup>2</sup>Químico <sup>3</sup>Microbiológico

Fonte: Brasil, (2011).

Ainda, a Instrução Normativa número 62, exige que as indústrias beneficiadoras de leite cru refrigerado realizem o controle diário antes do processamento, dos seguintes fatores: temperatura, teste do Alizarol, Acidez Titulável, Índice Crioscópico, Densidade Relativa, Teor de Gordura, Pesquisa de Peroxidase, Pesquisa de Neutralizantes da Acidez e Reconstituintes da Densidade e Pesquisa de agentes inibidores do crescimento microbiano (BRASIL, 2011).

Também, o item 4, dos anexos I e II da Instrução Normativa número 62 refere-se a sanidade dos animais em lactação e produção. Isso, porque alterações na saúde dos animais pode alterar a qualidade sanitária e física do leite, principalmente em casos de mastite, além de aumentar o risco de resíduo de medicamentos veterinários no leite oriundo de animais em tratamento contra doenças (BRASIL 2011; PAIXÃO et al., 2017; TIMONEN et al., 2017).

O item 4.2 da Instrução Normativa número 62 (anexos I e II) diz que não é permitido o envio do leite a posto de Refrigeração ou indústria beneficiadora quando oriundo de animais que: *“estejam sendo submetidos a tratamento com drogas e medicamentos de uso veterinário em geral, passíveis de eliminação pelo leite, motivo pelo qual devem ser afastados da produção pelo período recomendado pelo fabricante, de forma a assegurar que os resíduos da droga não sejam superiores aos níveis fixados em normas específicas”*.

Assim, existe um sistema que exige a adequada criação dos animais para que haja a produção com qualidade, respeitando o leite como matéria-prima e a vaca

como principal personagem no sistema de produção. O intuito final é preservar a saúde humana e tornar o Brasil país em acordo com as normas internacionais de qualidade sanitária e segurança alimentar, tendo como padrão a inocuidade do leite (BRASIL, 2011; ESTEVÃO NETO, 2015; PEREIRA e SCUSSEL, 2017).

## 2.2 MASTITE

Mastite bovina é a resposta inflamatória da glândula mamária a uma infecção. A instalação dessa doença se dá em três fases: (1) invasão de um organismo na glândula mamária (contaminação, com ou sem o estabelecimento de uma infecção), (2) infecção (ocorre o estabelecimento e crescimento bacteriano na glândula) e (3) instauração do processo inflamatório (PAIXÃO et al., 2017).

É o problema de saúde mais comum em vacas leiteiras e causa frequente de descarte involuntário de animais. Tem efeito econômico significativo pois é responsável pela diminuição da produção, perda de premiação pela qualidade do leite, aumento do custo de produção, redução do desempenho reprodutivo, custo com tratamento, leite descartado e transmissão de infecções para outros animais (OLIVEIRA et al., 2013; OLIVEIRA e RUEGG, 2014; BOBBO et al., 2017).

Pode ser classificada como clínica e subclínica. A primeira, além da presença de infecção intramamária, apresenta sinais clínicos como: alteração do aspecto normal do leite e sinais de inflamação da glândula mamária (aumento da temperatura, eritema e sensibilidade a dor). Já a mastite subclínica não apresenta sinal clínico associado à infecção intramamária, apenas existe a infecção e inflamação que é capaz de diminuir a produção leiteira em níveis, muitas vezes, imperceptíveis e alterar a composição do leite (HARMON, 1994; REBHUN, 2000; RADOTISTIS et al., 2007).

Os sinais clássicos da inflamação da glândula mamária incluem o aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, edema, aumento do fluxo sanguíneo, marginalização e migração de neutrófilos, diminuição da atividade secretora da glândula, dor e febre (GALLIN et al. 1992; HARMON, 1994).

Em vacas leiteiras, bactérias são os maiores agentes causadores da mastite. A defesa inicial contra a contaminação bacteriana encontra-se na barreira física pelo esfíncter do teto e na barreira química formada pela queratina. Uma vez que as

bactérias penetram o canal do teto, elas geralmente encontram fatores da defesa imune inata, como as citocinas e elementos celulares como macrófagos e neutrófilos (ACOSTA et al, 2016).

A migração de neutrófilos da corrente sanguínea para o tecido glandular mamário ocorre como resposta a citocinas pró-inflamatórias: Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e Interleucina 1 beta (IL-1  $\beta$ ) e mediadores inflamatórios como componentes do sistema complemento, prostaglandinas, leucotrienos, histamina, serotonina, interferons e outras citocinas (HARMON, 1994; OVIEDO-BOYSO et al., 2007).

Durante a resposta inflamatória ocorre o aumento da perfusão tecidual e da permeabilidade vascular, intercedidas por amins vasoativas, como por exemplo a histamina e serotonina. A concentração de histamina, por sua vez, é 135% maior em quartos com mastite quando comparados com quartos adjacentes sem processo inflamatório (CECIL et al., 1965; CRUVINEL et al., 2010).

Tanto em mastite clínica quanto em mastite subclínica ocorre aumento da contagem de células somáticas. A defesa primária da glândula mamária no processo inflamatório é a colonização com leucócitos. Normalmente, a contagem de células somáticas (CCS) é inferior a 200.000 células/ mL/ leite. Então, quando a mastite está presente, a CCS aumenta principalmente como consequência da infiltração de leucócitos (NIEMIALTOWSKI et al., 1988; PAAPE et al., 2003; BOCHNIARZ et al., 2017).

O aumento da contagem de células somáticas é responsável por alterações na composição do leite e possui correlação negativa significativa com o conteúdo de matéria seca. A mastite subclínica altera significativamente a composição do leite e determina mudanças nas concentrações dos principais componentes, gordura, proteína e lactose (Tabela 2 e Tabela 3 (SHARMA et al., 2011).

Tabela 2. Alterações na composição do leite (g/100g) associadas à mastite subclínica

Componentes	Leite Normal	Leite com Mastite Subclínica
ESD	8,90	8,80
Gordura	3,50	3,20
Proteína	3,61	3,56
Lactose	4,90	4,40

Adaptado de Gonçalves (2012).

Tabela 3. Mudanças nos constituintes do leite com alta CCS causadas por *Corynebacterium bovis* (g/100g)

	CCS ( $\times 10^3$ células/ml)			
	<100	<250	500-1000	>1000
Caseína	2,81	2,79	2,65	2,25
Lactose	4,90	4,74	4,60	4,21
Gordura	3,74	3,69	3,51	3,13

Adaptado de Gonçalves (2012).

O processo inflamatório da glândula mamária causa alterações não apenas no leite do quarto acometido como também no leite dos quartos mamários adjacentes. Estudo recente sugere que um único quarto acometido com mastite afeta o estado imune geral do úbere e, assim, altera a composição do leite e o estado de saúde dos quartos adjacentes. Nesse caso, o leite apresenta aumento da CCS, número de leucócitos e teor de gordura e queda nos teores de lactose e proteína (PAIXÃO et al., 2017).

No que concerne aos principais agentes etiológicos, as bactérias são os mais prevalentes. São divididas em contagiosas, quanto transmitidas de uma vaca para a outra, durante a ordenha, por meio do leite contaminado e ambiental, quando a contaminação acontece no ambiente – geralmente fora da sala de ordenha (PAIXÃO et al., 2017).

Os principais agentes descritos como causadores da mastite contagiosa são: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma spp.*, *Corynebacterium bovis* e *Bacillus spp.*. Já os principais da mastite ambiental são: *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus bovis*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*, além disso, também incluem bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes* (REYHER e DOHOO, 2011; ACOSTA, 2016; SOUZA et al., 2016). No Brasil, o gênero *Staphylococcus* é relatado como o principal agente etiológico da doença, tanto para a espécie bovina, quanto caprina, ovina e bubalina (ACOSTA et al., 2016).

O diagnóstico da mastite clínica é feito pelo exame clínico do animal e por meio da colheita do leite para realização de isolamento bacteriano e antibiograma. O diagnóstico da mastite subclínica é feito com a associação da Contagem de Células Somáticas (células/ mL/ leite) acima de 200.000 e o isolamento bacteriano para evidenciar a infecção intramamária (OLIVEIRA e RUEGG, 2014; RUEGG, 2017).

O tratamento das mastites pode ser dividido de acordo com o seu tipo – clínica ou subclínica. Comumente, a mastite subclínica é tratada com antimicrobianos e outros fármacos no momento da secagem do animal, visando recuperar a glândula mamária para uma lactação posterior e obter novamente o leite com seus parâmetros normais, assim como, evitar a transmissão para outros animais (ESTEVÃO-NETO et al., 2015).

Em contrapartida, quando a vaca apresenta mastite clínica o tratamento é realizado imediatamente e, em geral, com antimicrobianos intramamários. Os tratamentos mais utilizados incluem antimicrobianos e anti-inflamatórios, além de terapia suporte em casos de infecções mais graves com sinais e acometimentos sistêmicos (OLIVEIRA e RUEGG, 2014).

Os tratamentos podem ser realizados pelas vias intramamária ou sistêmica. Para o primeiro tipo, é preferível que o antimicrobiano utilizado tenha as seguintes características: pouco irritante, baixa concentração inibitória mínima, baixo grau de ligação a proteínas, baixo grau de ionização no úbere, liberação rápida e baixa persistência (SPINOSA, 2017).

### **2.2.1 MASTITE SUBCLÍNICA**

Mastite subclínica é a inflamação da glândula mamária sem apresentação de sinais clínicos. Dessa maneira, o processo infeccioso bacteriano (em geral) está presente na glândula associado a inflamação, porém, sem a possibilidade de diagnóstico por meio de exame físico do animal acometido (RUEGG, 2017).

A transmissão ocorre pela contaminação de uma vaca sadia com o leite de uma vaca com mastite subclínica durante a ordenha pelo canal do teto (contato direto com o leite contaminado presente, principalmente, nas teteiras). Sendo assim, algumas medidas podem ser tomadas durante a ordenha para minimizar o risco de disseminação da mastite subclínica. Por exemplo: implantação de linha de ordenha, desinfecção das teteiras entre animais ou lotes e diagnóstico dos animais com a doença (THORBERG et al., 2009).

O diagnóstico da mastite subclínica é feito pela contagem de células somáticas (CCS) do leite dos animais associada ao isolamento bacteriano. Vacas com

CCS acima de 200.000 células/ mL/ leite e presença de bactéria no isolamento de amostra de leite são consideradas portadoras de mastite subclínica (lembrando que com ausência de qualquer sinal da mastite clínica). Outro método para identificação é o California Mastitis Test (CMT). A inflamação da glândula mamária provoca aumento da concentração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos para combater o processo infeccioso, além do aumento de células de descamação epitelial. Todos esses tipos celulares são denominados células somáticas do leite (NIELEN et al., 1995).

Destarte, animais com mastite (clínica e subclínica) apresentam maior contagem de células somáticas que animais sadios. O reagente presente no teste CMT é adicionado a uma amostra de leite que irá romper a membrana das células somáticas e liberar o material nucléico (DNA), que é altamente viscoso. Então, quanto maior a concentração de células somáticas maior vai ser a viscosidade do leite, que irá promover estimativa da CCS por meio de uma escala de escores visuais de viscosidade (negativo, escore 1, escore 2 e escore 3) (SARGEANT et al., 2001).

Os principais agentes causadores da mastite subclínica são as bactérias contagiosas: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis* e *Actinomyces pyogenes*. Essas bactérias estão presentes no leite de vacas contaminadas e são disseminadas durante a ordenha (LANGONI et al., 1998).

O tratamento da mastite subclínica pode ser feito durante a lactação ou no momento da secagem (método mais escolhido). Deve ser realizado o isolamento bacteriano das vacas com suspeita e teste de sensibilidade aos antibióticos disponíveis para efetuar maior eficiência e utiliza-se tanto o tratamento sistêmico quanto o intramamário (REBHUN, 2000).

A espécie bacteriana isolada nos casos de mastite subclínica interfere no sucesso do tratamento intramamário (tanto durante a lactação quanto na secagem) devido ao local de infecção. Bactérias que se situam nas células dos ductos alveolares são mais facilmente tratáveis que bactérias em que o sítio de infecção ocorre nas células epiteliais dos alvéolos, devido ao alcance do antimicrobiano (RUEGG, 2017).

No que diz respeito a parte econômica, a mastite subclínica tem alto impacto na pecuária leiteira. Dentre os dois tipos de mastite ela é a de maior frequência e leva a alterações nos componentes físicos e diminuição da produção. O primeiro fato mencionado acarreta em perda da premiação no pagamento do leite aos produtores por,

principalmente, diminuição nos teores de gordura e proteína total. O impacto se dá pela forma de manifestação da doença: ausência de sinais clínicos e na maioria das vezes não diagnosticada, ou seja, de forma “silenciosa” (SHEPARD et al., 2000; ZAFALON et al., 2007).

O prejuízo econômico não é apenas ao produtor, como mencionado, mas também às indústrias de laticínios, pois o leite mastítico provoca problemas no processamento do leite e redução no rendimento, em razão dos teores inferiores de caseína, gordura e lactose, que resultam em produtos de baixa qualidade e estabilidade.

A mastite subclínica é importante na pecuária leiteira por causar danos econômicos tanto aos produtores quanto às indústrias de laticínios e por se manifestar com ausência de sinais clínicos e ter diagnóstico mais dificultoso que a mastite clínica, além de apresentar rápida disseminação em rebanhos que não utilizam métodos de controle da doença.

### **2.3 ANTIMICROBIANOS**

Os antimicrobianos são substâncias capazes de controlar o crescimento bacteriano pela ação bactericida ou bacteriostática. São vitais para manter a produtividade animal, melhorar o bem-estar – limitando o impacto de doenças bacterianas – e melhorar a segurança alimentar (NOBREGA et al., 2017). Dividem-se em antibióticos, que são substâncias produzidas pelo metabolismo de determinadas espécies de bactérias, fungos e actinomicetos e em quimioterápicos, que são substâncias sintetizadas em laboratório e atuam seletivamente sobre o patógeno causador de infecção no organismo, dessa maneira, não sendo nocivos ao hospedeiro na dosagem recomendada (SPINOSA, 2017).

São administrados em animais de produção por uma variedade de causas, incluindo: tratamento, prevenção e controle de doenças e como promotor de aumento da eficiência alimentar e crescimento (MARSHALL e LEVY, 2011).

Nos rebanhos leiteiros especializados são utilizados, principalmente, no tratamento de doenças bacterianas em vacas em lactação e nas demais categorias e surgem como: doenças infecciosas das vias aéreas superiores e inferiores, doenças do trato gastrointestinal, cutaneopatias infecciosas, doenças reprodutivas, infecciosas relacionadas ao casco e a glândula mamária, causando a mastite. Para esses casos,

demanda-se o uso de antimicrobianos no tratamento. (REBHUN, 2000).

No Brasil, as classes de antimicrobianos utilizadas na medicina veterinária são: beta-lactâmicos, que possuem em comum no seu núcleo estrutural o anel beta-lactâmico, que confere ação bactericida. Pertencem a esse grupo as penicilinas e cefalosporinas. Macrolídeos, grupo constituído quimicamente por um anel macrocíclico de lactona com ação bactericida. Pertencem a esse grupo a azitromicina, claritromicina e eritromicina. Sulfonamidas, são bacteriostáticos derivados da sulfanilamida e compreendem seis drogas principais: sulfanilamida, sulfisoxazol sulfacetamida, ácido para-amidobenzóico, sulfadiazina e sulfametoxazol. As tetraciclina, primariamente bacteriostáticas, quando em concentrações terapêuticas e apresentam amplo espectro de ação (atuam contra bactérias gram-positivas, gram-negativas aeróbias e anaeróbias, espiroquetas, riquetsias, micoplasma, clamídias e alguns protozoários). E por fim, os aminoglicosídeos, que são bactericidas e atuam ligando-se aos ribossomos no citoplasma das bactérias patogênicas e atuam inibindo a síntese proteica ou produzindo proteínas defeituosas (SPINOSA, 2017).

Pesquisa realizada no estado do Paraná evidenciou que os antimicrobianos são agentes principais em 48% dos tratamentos que ocorrem em propriedades leiteiras, ou seja, é a classe terapêutica mais utilizada. Desse total, as penicilinas e os aminoglicosídeos são os mais utilizados, representando respectivamente 19,59% e 12,91% dos tratamentos (NETTO et al., 2005). Em trabalho feito na Holanda durante os anos de 2005 e 2012, verificou-se que, em média, as vacas desse país passam 5.86 dias em tratamento com antibióticos e que 68% desses tratamentos são voltados a saúde do úbere – 24% para tratamento de mastite clínica e 44% para terapia de secagem (KUIPERS et al., 2016).

O tratamento contra a mastite representa a maioria dos antimicrobianos que são administrados em vacas leiteiras, 42,2% do total (SAINI et al., 2012; OLIVEIRA e RUEGG, 2014; NOBREGA et al., 2017).

A gentamicina é um aminoglicosídeo largamente utilizado na medicina veterinária, principalmente no tratamento contra a mastite. Tem meia-vida relativamente curta, de 2 a 3 horas, baixa ligação a proteínas séricas e baixo volume de distribuição. A via intramamária é a mais comumente utilizada e é sabido que dessa maneira é absorvida pelo organismos por meio da circulação sanguínea, resultando em resíduos por tempo prolongado (SPINOSA, 2017).

Kaczorek et al. (2017), relataram baixa efetividade da gentamicina contra *Streptococcus sp.* isoladas de casos de mastite clínica, dentre 8 princípios ativos testados em estudo conduzido em propriedades leiteiras da Polônia. Em estudo realizado na China com 195 amostras de leite cru de 195 propriedades leiteiras, 11% das amostras isoladas com *Staphylococcus aureus* mostraram-se resistentes a gentamicina. Nesse estudo, a *Staphylococcus aureus* mostrou maior resistência à penicilina G (85,5% das amostras) e ampicilina (79,6%) e a gentamicina se revelou mais eficiente contra a *Staphylococcus aureus* (LIU et al., 2017). Jamali et al. (2014) relataram que a *Staphylococcus aureus* mostrou resistência a gentamicina em 7% de 43 amostras de vacas com mastite clínica em estudo realizado no Irã.

Outro estudo realizado na China, com amostras de leite de vacas com sinais clínicos e contagem de células somáticas acima de 250.000 células/ mL, mostrou que a gentamicina foi eficaz contra 93% das amostras isoladas com *Escherichia coli* (ZHANG et al., 2018). Suojala et al (2011) relatou não haver resistência da *Escherichia coli* contra a gentamicina.

No Brasil, estado da Bahia, em 110 amostras de vacas com mastite clínica foram isoladas *Staphylococcus aureus* (45 amostras), *Corynebacterium sp.* (45 amostras), *S. coagulase negativo* (37 amostras), *Bacillus sp.* (16 amostras), *Escherichia Coli* (16 amostras) e *Klebsiella sp.* (2 amostras). Para a gentamicina, foram sensíveis 100% das amostras de *Staphylococcus aureus*, 88,88% das amostras de *Streptococcus coagulase negativo*, 95,55% das amostras de *Corynebacterium sp.*, 93,75% das amostras de *Bacillus sp.*, 93,75% das amostras de *Escherichia coli* e 100% das amostras de *Klebsiella sp.*. Dentre os antibióticos testados – oito no total, a gentamicina foi a que apresentou menor percentual de resistência frente às bactérias isoladas (OLIVEIRA et al., 2012).

Os antimicrobianos devem ser utilizados com a devida cautela e sempre se respeitar a dosagem e período de carência recomendados na prática veterinária. A resistência aos antimicrobianos e a ingestão de resíduos em alimentos de origem animal em todo o mundo já foram reconhecidos como um dos principais desafios de saúde pública no século XXI (HAIMERL e HEUWIESER, 2014).

## 2.4 RESÍDUO DE ANTIMICROBIANOS NO LEITE

A preocupação com resíduo de antimicrobianos remete a década de 1960, quando utilizava-se a penicilina no tratamento de vacas em lactação contra mastite. O período de carência após o término do tratamento, o limite da dose para infusão intramamária e a conscientização dos produtores foram assuntos colocados em pauta pelo departamento de Administração Federal de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América na época (STEPHENS, 1960).

Mas, pensar em controle de resíduo de antimicrobianos no leite é pensar no consumidor final e nos malefícios gerados na interação humana com as bactérias e seu tratamento (saúde pública), bem como nos prejuízos causados na indústria de beneficiamento. Quanto à saúde pública, a presença de resíduo de antimicrobianos acima do LMR exigido pelas normas fixadas pode gerar reações de hipersensibilidade, alergia, resistência bacteriana, ação carcinogênica ou mutagênica. Na indústria, interfere na fabricação de produtos lácteos fermentados, o que leva a perdas econômicas (FERREIRA et al., 2012; ATTAIE et al., 2015).

Limite máximo de resíduo é a concentração máxima de um resíduo legalmente tolerado em um produto alimentício obtido de um animal que recebeu uma droga veterinária (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2017).

Resíduos de antimicrobianos no leite cru refrigerado acima do LMR são oriundos do tratamento, principalmente, contra a mastite, visto que a refrigeração e os processos realizados na indústria não os eliminam (SILVA et al., 2013). Quando o tratamento é realizado dentro da dosagem e período recomendados e respeita-se o período de carência, as chances desse gerar resíduo é reduzida. Segundo Jones e Seymour (1988), algumas causas para presença de resíduo são: (I) tratamentos aleatórios, (II) problemas ou falhas na identificação de animais tratados, (III) ausência de separação de vacas em tratamento no momento da ordenha, (IV) uso de dosagens múltiplas, (V) superdosagem, (VI) falhas na observação ou não cumprimento do período de carência, (VII) uso por período prolongado e excessivo, (VIII) mistura acidental de leite não contaminado com leite contaminado e (IX) uso de equipamentos de ordenha contaminados.

É sabido que o tratamento por via parenteral (intramuscular e

intravenoso), ou seja, que alcançará a corrente sanguínea promove a excreção do antimicrobiano utilizado no tratamento contra a mastite em todos os quartos mamários (RAIA, 2001; SPINOSA, 2017). O tratamento por via intramamária em casos de mastite clínica pode gerar excreção de antimicrobiano nos quartos mamários adjacentes, ou seja, os não tratados de uma mesma vaca. Isso, pois, acredita-se que há absorção do princípio ativo pela corrente sanguínea e biodisponibilidade, agindo dessa maneira, como tratamento via parenteral (COELHO, 2003; SILVA et al., 2013).

Raia Júnior (2007) estudou a influência do processo inflamatório na persistência de resíduo de antimicrobianos após o período de carência com tratamento por via intramamária. Verificou que a ocorrência de resíduos foi maior em quartos com mastite clínica quando comparados a quartos com mastite subclínica. Também, verificou que quando comparados com quartos mamários sem processo inflamatório, os quartos com mastite clínica (diferença estatística extremamente significativa) e subclínica (diferença estatística significativa) tem maior ocorrência de resíduo de antimicrobianos após o período de carência. O autor utilizou teste qualitativo para detecção dos resíduos (Delvotest®).

Trabalho de Macedo e Freitas (2009) encontrou resíduo de antimicrobianos em amostras de leite cru refrigerado proveniente de tanque de resfriamento de propriedades leiteiras e usinas de beneficiamento de leite, também, em amostras de leite de origem desconhecida à venda no mercado varejista na cidade de Belém/PA.

Nero et al. (2007) encontraram resíduo de antimicrobianos por meio de teste qualitativo (em especial beta-lactâmicos e sulfonamidas) em amostras de leite cru refrigerado de propriedades leiteiras das regiões de Viçosa/MG (8,5% das amostras), Pelotas/RS (6,0%), Londrina/PR (20,6%) e Botucatu/SP (8,0%). A região de Londrina mostrou maior ocorrência entre todas estudadas.

Vieira et al. (2012) realizaram pesquisa por resíduo de antimicrobiano utilizando teste qualitativo em amostras de leite pasteurizado comercializados no varejo. Do total de amostras, 19% foram positivas, sendo que dessas: 40% com cloranfenicol, 20% com tetraciclina, 6,7% com gentamicina, 20% com estreptomicina, 13,3% com beta-lactâmicos e 20% com dois princípios ativos simultaneamente.

Para determinar a positividade de uma amostra de leite quanto à presença de antimicrobianos – como resíduo químico - é necessário conhecer os Limites

Máximos de Resíduo. Ou seja, valores determinados pelas normas vigentes expressas em  $\mu$  /kg (Quadro 1). Existem testes de triagem qualitativo, ou seja, com resultado negativo e positivo. Assim, em uma amostra de leite, quando a quantidade do antimicrobiano excede o LMR, o teste exibirá positividade. Também, existem os testes quantitativos confirmatórios que avaliam a quantidade do antimicrobiano em uma amostra e o resultado é expresso em  $\mu$ / kg (GONÇALVES, 2008).

Quadro 1. Limite Máximo de Resíduo (LMR em  $\mu$ /kg de leite) de antimicrobianos e métodos analíticos para testes confirmatórios de acordo com a Instrução Normativa número 42 do MAPA, de 1999.

Classificação	Drogas	Método Analítico	LMR
Antimicrobianos	Penicilina		4
	Estreptomicina		200
	Tetraciclina		100
	Eritromicina	Enzimaimunoensaio	40
	Neomicina		500
	Oxitetraciclina	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	100
	Clortetraciclina		100
	Ampicilina		4
	Amoxicilina		4
	Ceftiofur		100
	Sulfametazina	Enzimaimunoensaio	100
	Sulfadimetoxina		100
	Sulfatiazol	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	100
		Cromatografia por Camada Delgada	
		Densitometria	
Cloranfenicol	Enzimaimunoensaio	5	
	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)		

Fonte: Brasil, 1999.

Anualmente, o PNCR realiza pesquisa por resíduo de antimicrobianos em 600 amostras de leite oriundo da indústria de beneficiamento com selo de inspeção federal. Em 2016 foram feitas pesquisas para 49 princípios ativos diferentes e apenas uma amostra testou positivo – sem especificação, acima do LMR, representando 0,17% do total. A gentamicina, antimicrobiano amplamente utilizado na medicina veterinária não fez parte dos princípios ativos pesquisados e não consta na relação de LMR dos antimicrobianos da Instrução Normativa número 42 do MAPA (BRASIL, 2016; SPINOSA, 2017). Porém, no Brasil, quando não especificada a LMR de algum antimicrobiano, deve-se seguir as normas do Mercosul, União Europeia e *Codex Alimentarius* (BRASIL, 2003).

O LMR da gentamicina é de 200  $\mu$ g/l de leite segundo o *Codex*

*Alimentarius*, valor utilizado no Brasil como referência (GONÇALVES, 2008; CODEX ALIMENTARIUS, 2015).

No Brasil, entre os anos de 2009 a 2011 foram analisadas 961 amostras de leite pasteurizado, leite UHT e leite em pó colhidas em comércio varejista de diversas marcas para antimicrobianos, monitoradas pelo Programa Oficial de Análises de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal, e nenhuma apresentou resultado acima do LMR. Segundo esse estudo, o consumo do leite não representa risco toxicológico e não deve ser considerado problema de saúde coletiva (NOVAES et al., 2017).

Porém, a presença de resíduos de antimicrobianos no leite cru refrigerado é recorrente no Brasil e situação que demanda controle. Afetam a qualidade da matéria-prima na indústria de beneficiamento e gera risco a saúde do consumidor (NETTO et al., 2005; MARTIN, 2011; MARTINS et al., 2016).

#### **2.4.1 PESQUISA POR RESÍDUOS GENTAMICINA NO LEITE**

A pesquisa por resíduos de antimicrobianos no leite no Brasil é exigida pela Instrução Normativa n° 62 do MAPA, diária para o leite cru refrigerado processado em indústria de laticínios (BRASIL, 2011).

Existem os métodos de triagem que apontam a presença ou ausência de resíduos de gentamicina (testes qualitativos). Tais testes possuem limite de detecção mínima para o antimicrobiano (acima de tal limite as amostras são positivas e abaixo negativas) e não necessitam de pessoal capacitado para realização, instrumentos laboratoriais e podem ser feitas várias análises simultaneamente. Esses testes tem grande importância, pois quando o resultado de uma determinada amostra de leite é negativa isso indica que está em conformidade com os limites máximos de resíduos estabelecidos por órgãos regulamentadores brasileiros. Quando positivas, devem ser encaminhadas a teste confirmatório qualitativo para determinação da concentração de gentamicina na amostra (PEREIRA, 2017).

No Brasil, o LMR para gentamicina é de 200 µg/ kg de leite (CODEX ALIMENTARIUS, 2017) e os dois testes de triagem disponíveis tem limite mínimo de detecção inferior a este valor. O Charm – Test TM (Charm Science Incorporation, EUA)

tem limite mínimo de detecção de 30 µg/ kg de leite. Este é um teste de inibição do crescimento microbiano e detecta as seguintes classes: Aminoglicosídeos, Beta-lactâmicos, Macrolídeos, Tetraciclina e Sulfonamidas (LE BRETON et al., 2007).

O Delvotest® SP NT (DSM Foods Specialties B.V. Delft, The Netherlands) também é um teste de triagem de inibição microbiana e detecta Aminoglicosídeos e Beta-lactâmicos. O limite de detecção mínima desse teste para a gentamicina é de 50 µg/ kg de leite e é muito utilizado nas usinas de beneficiamento de leite por detectar uma diversidade de compostos e apresentar limites de detecção sempre abaixo dos LMR brasileiros para todos os antimicrobianos passíveis de serem detectados (LE BRETON et al., 2007). Esse teste é aprovado no Brasil pela Portaria nº 8 de 26/06/1984 do serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura publicada no Diário Oficial da União em 11/07/1984 (BRASIL, 1984).

O teste confirmatório quantitativo de gentamicina aprovado no Brasil pelo MAPA (BRASIL, 1999) é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A sensibilidade desse teste pode chegar a 1 µg/ kg de leite e o resultado é quantitativo, ou seja, determina a concentração da gentamicina presente na amostra em µg/ kg de leite (PEREIRA, 2017).

## **2.5 ANTIMICROBIANOS E A RELAÇÃO COM A SAÚDE PÚBLICA**

Muitos antimicrobianos utilizados na medicina veterinária são utilizados na medicina humana, como por exemplo: amoxicilina, bacitracina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, neomicina, penicilina procaína, tetraciclina e estreptomicina e estima-se que 50% de todos os antibióticos existentes são utilizados na medicina veterinária (TEUBER, 2001; MARSHALL e LEVY, 2011).

A utilização de antimicrobianos na produção animal é feita, sobretudo, com dois objetivos: (1) como promotores de crescimento para melhorar a produção de alimentos (frangos de corte, bovinos de corte e suínos); (2) tratamento, prevenção e controle de doenças bacterianas (BARTON, 2000; MARSHALL e LEVY, 2011).

A utilização como promotores de crescimento remete a década de 1950, quando se descobriu que antimicrobianos fornecidos na alimentação dos animais de produção em doses subterapêuticas aumentavam a conversão alimentar – penicilina

procaína e tetraciclina (STOCKSTAD AND JUKES, 1950). Então, durante muitos anos essa prática foi fomentada e defendida pelo prisma do aumento da produção de alimentos de origem animal. Porém, em determinado momento percebeu-se que isso poderia trazer consequências negativas a saúde pública, principalmente, como o aumento do aparecimento de bactérias multirresistentes a antimicrobianos (GORBACH, 2001; LEVY, 2002; MILES et al., 2006).

A resistência a medicamentos segue a droga como uma sombra fiel, disse Paul Ehrlich, bacteriologista alemão (EBRAHIM, 2010). Refere-se aos microrganismos que não são inibidos em concentrações habitualmente alcançadas no sangue ou tecidos pelos antimicrobianos. Pode ter origem na mutação espontânea e recombinação de genes (bacterianos) ou na transferência direta de uma bactéria a outra por contato, e as drogas atuam como agentes seletivos. A prática de fornecer promotores de crescimento na alimentação animal pode selecionar microrganismos resistentes a antimicrobianos e a pressão seletiva exercida pelo uso intensivo de antimicrobianos está dando forças ao desenvolvimento de resistência (MOTA et al., 2005).

Estudos sugerem que há relação entre o uso de agentes antimicrobianos na produção animal e a emergência de patógenos humanos menos ou nada sensíveis aos antibióticos. Assim, as infecções bacterianas que acometem os seres humanos e tem origem nos animais de produção (agem como reservatório de bactérias patogênicas) tornam-se preocupantes, pois, podem apresentar resistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento (AARESTRUP, 2005; MILES et al., 2006).

Por outro lado, a utilização de antimicrobianos, principalmente, no tratamento de infecções bacterianas no gado leiteiro pode gerar resíduos no leite acima do LMR das normas específicas. Quando ingeridos por seres humanos, trazem riscos à saúde.

A presença de resíduo de antimicrobianos no leite pode desencadear reações de hipersensibilidade e alergia, danos nos nervos cranianos (gentamicina e neomicina), na formação óssea e causar danos irreversíveis ao DNA e indução de tumores. Ainda, a exposição contínua a esses resíduos pode propiciar a seleção de bactérias resistentes da microbiota e a transferência dessa resistência a outras bactérias susceptíveis (FONSECA e SANTOS, 2000; SPINOSA, 2017).

Sendo assim, a utilização de antimicrobianos gera perigo a saúde humana, principalmente por duas vias: criando bactérias multirresistentes que podem

desenvolver graves infecções com difíceis tratamentos e por meio da ingestão direta de resíduos na carne e no leite – sobretudo – que podem gerar reações alérgicas e de hipersensibilidade a quem consome (MILES et al., 2006; MARSHALL e LEVY, 2011).

No ano de 2017, entrou em vigor a Instrução Normativa número 41 do MAPA que visa controlar a resistência aos antimicrobianos e entre as atividades previstas está a vigilância e o monitoramento do uso dos antimicrobianos no setor pecuário, além da promoção do seu uso racional com vistas ao conceito de Saúde Única, que estabelece a interdependência entre a saúde humana, animal e ambiental, por meio de atividades de educação, vigilância e defesa agropecuária (MAPA, 2017).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo geral desse trabalho foi investigar a presença de resíduo de gentamicina nos quartos mamários tratados e adjacentes não tratados em vacas com mastite subclínica.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Realizar a cultura das amostras de leite de vacas com CCS acima de 200.000 células/ mL/ leite para identificar a bactéria presente no processo inflamatório e teste de sensibilidade das bactérias isoladas ao antimicrobiano utilizado no tratamento deste experimento;

Realizar o tratamento dos animais com gentamicina e verificar a influência sobre a mastite subclínica bovina durante a lactação, contagem de células somáticas, teor de gordura, teor de proteína total e teor de lactose;

Investigar a presença de resíduo de gentamicina nos quartos mamários tratados e adjacentes não tratados por meio de teste qualitativo de inibição microbiológica.



## **4. AVALIAÇÃO DE RESÍDUO DE SULFATO DE GENTAMICINA NO LEITE DE VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA TRATADAS POR VIA INTRAMAMÁRIA**

### **4.1 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1.1 APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PARANÁ – CEUA/UENP**

Todos os procedimentos realizados neste estudo envolvendo animais estavam de acordo com os padrões éticos da CEUA/UENP, conforme documento declaração n° 03/2017, registrado no SECAPEE n°3653, em anexo.

#### **4.1.2 CARACTERÍSTICAS DA PROPRIEDADE**

Está localizada no município de Joaquim Távora/PR e era uma propriedade particular de produção leiteira. Possuía média de produção diária de 2.760 litros e 120 vacas em lactação. Os animais eram alojados em terreno sombreado entre as ordenhas e eram alimentados em pista coberta no sistema de canzil. Importante mencionar que não possuía sistema de alojamento e resfriamento adequado e as vacas ficavam em contato direto com ambiente contaminado entre as ordenhas e, portanto, eram susceptíveis a adquirir infecções intramamárias.

Nesta propriedade, as vacas eram alimentadas com silagem de milho, ração comercial com 20% de proteína bruta e alta energia, farelo de soja, feno de aveia e sal mineral em ração fornecida duas vezes ao dia após as ordenhas.

O rebanho estudado consiste de vacas da raça Holandesa Preta e Branca. Esses animais eram ordenhados duas vezes ao dia (05h:00 e 16h:00) em sistema mecânico em circuito fechado, com extração automática dos conjuntos de ordenha. Antes de serem ordenhados, realizava-se o teste da caneca do fundo preto para detecção de mastite clínica e desinfetava-se os tetos com solução de iodo a 2.500 ppm, posteriormente secos com

papel toalha descartável. Ao término da ordenha, desinfetavam-se os tetos com solução de iodo a 10.000 ppm e os animais eram dirigidos à pista de alimentação. Aqueles que apresentavam mastite clínica eram ordenhados separadamente e o leite total era descartado até o término do tratamento. O leite dos animais com mastite clínica era colhido e submetido a isolamento bacteriano e antibiograma antes do início do tratamento. Mensalmente colhiam-se amostras de todas as vacas em lactação para avaliação da contagem de células somáticas, teor de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e ureia, controle leiteiro realizado pela Associação de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH). A ordenha se iniciava pelas vacas primíparas, em seguida pelas multíparas e, por fim, as que apresentavam mastite.

#### **4.1.3 ANIMAIS SELECIONADOS**

Dez vacas em lactação, multíparas, com contagem de células somáticas acima de 200.000 células/ml/leite e cinco abaixo de 200.000 células/ml/leite sem histórico de tratamento com antimicrobianos nos últimos 40 dias antes do início do tratamento foram selecionadas. Em seguida, as vacas foram submetidas ao California Mastitis Test (CMT), conduzido conforme Daniel et al. (1996), atribuindo escores de 0 (negativo), 1, 2 e 3.

As vacas foram divididas em três grupos: no grupo 01 (n=5) as vacas apresentavam contagem de células somáticas abaixo de 200.000 células/ mL/ leite e o resultado para o CMT foi de escore 0 para todos os quartos mamários, média de dias em lactação (DEL) de 154,80 dias, média de produção diária de 30,87 litros de leite e média de 2,9 lactações; no grupo 02 (n=5) as vacas apresentavam contagem de células somáticas com valor intermediário (entre 200.000 e 500.000 células/ ml/ leite) e apenas um quarto mamário com escore 1 no CMT, média de DEL de 180,86 dias, média de produção diária de 28,78 litros de leite e média de 4,7 lactações; no grupo 03 (n=5) as vacas apresentavam contagem de células somáticas elevada (acima de 900.000 células/ ml/ leite) e ao menos um quarto mamário com escore 2 ou 3 no CMT, média de DEL de 217,00 dias, produção diária de 27,61 litros de leite e média de 5,6 lactações.

No grupo 01, todas as vacas receberam o tratamento no quarto mamário anterior direito, para facilitar o manejo durante o experimento. Nos grupos 2 e 3, o quarto

mamário positivo no CMT foi selecionado para o tratamento.

#### **4.1.4 TRATAMENTO**

O tratamento foi realizado nos dias 11/12/2016 e 12/12/2016 e consistiu em infusão intramamária de sulfato de gentamicina (150 mg em 50 mg de cloridrato de bromexina e 10 mL de excipiente q.s.p.) uma vez ao dia após a segunda ordenha do dia durante dois dias. O tratamento recomendado pelo fabricante era de três dias consecutivos, porém, por ser uma propriedade comercial foi decidido reduzir em um dia o tratamento para diminuir o impacto gerado no manejo de ordenha. O antimicrobiano foi administrado em apenas um quarto mamário de cada animal dos três grupos, após a desinfecção do teto com álcool 70%. O sulfato de gentamicina foi selecionado por ser amplamente utilizado no Brasil no tratamento de casos de mastite, por ser um produto de baixo custo em relação aos outros antimicrobianos intramamários e por apresentar baixa resistência bacteriana (OLIVEIRA et al., 2012). O período de carência recomendado pelo fabricante é de 96 horas após a última infusão.

#### **4.1.5 COLHEITA DAS AMOSTRAS DE LEITE**

As amostras foram colhidas entre os dias 11/12/2016 e 18/12/2016. Para a pesquisa por resíduo de gentamicina, as amostras foram colhidas separadamente do quarto mamário tratado e do pool dos quartos adjacentes não tratados de cada animal em frasco plástico com capacidade de 250 ml com tampa em sistema “abre-fecha” lacradas. Foram colhidas amostras em seis tempos diferentes de cada animal: 0, 12, 36, 48, 72, 120 e 144 horas após a primeira infusão de gentamicina de todos os animais. Amostras foram colhidas antes do início do tratamento com gentamicina para confirmar a ausência de resíduo de antimicrobianos no leite, consideradas como tempo 0.

Foram selecionadas para análise as amostras nos tempos 0, 36, 72, 120 e 144 dos quartos mamários tratados e nos tempos 0, 12, 36, 72 e 120 dos quartos mamários não tratados.

Para análises microbiológicas (isolamento bacteriano e antibiograma

para gentamicina), foram colhidas no tempo 0 dos quartos mamários positivos no CMT dos animais dos grupos 02 e 03. Não houve tentativa de isolamento bacteriano do leite dos animais do grupo 01. As amostras foram colhidas após a desinfecção dos tetos com álcool 70% - aproximadamente 3 ml - e armazenadas em frascos estéreis com tampa tipo “rosca”.

Todas as amostras foram imediatamente congeladas em temperatura de -18°C antes das análises laboratoriais. As análises microbiológicas foram realizadas conforme Martins et al. (2016).

Para a análise de contagem de células somáticas, teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais, as amostras foram colhidas separadamente do quarto mamário tratado e do pool dos quartos adjacentes não tratados de cada animal no tempo 0 e 15 dias após a última infusão. As amostras foram colhidas em frascos com capacidade de 70 ml, tampa com sistema “abre-fecha” e conservante bronopol. Então, foram enviadas 24 horas após as colheitas para a Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa, onde foram realizadas as análises laboratoriais.

#### **4.1.6 ANÁLISE DE RESÍDUO DE GENTAMICINA**

A presença resíduo de gentamicina nas amostras foi verificada utilizando-se teste inibição microbiológica comercial (Delvotest® SP NT, DSM Foods Specialties B.V. Delft, The Netherlands).

Seguiram-se as instruções do fabricante para a realização dos testes: foram utilizadas ampolas plásticas próprias produzidas pelo fabricante contendo em seu interior meio de cultura sólido semeado com esporos de *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* e pastilhas nutrientes de glucose, pipetas plásticas dosadoras descartáveis reguladas para 0,1 mL e uma incubadora (DSM Foods Specialties B.V. Delft, The Netherlands). Os testes seguiram a sequência: pequena abertura da tampa de alumínio da ampola (uma amostra por vez), adição de 0,1 mL da amostra de leite a ser testada por meio da pipeta descartável e, por fim, colocadas na incubadora a 64 °C por três horas e quinze minutos. Após esse tempo, foram realizadas as interpretações. A capacidade de detecção mais baixa em que a gentamicina pode ser detectada 95% do tempo pelo teste utilizado é de 50 µg/ kg (DSM Food Specialties, 2012).

Os resultados das cores obtidas nos testes foram interpretados de acordo com Martins (2013): perfil 1, AAA (100%), negativo; perfil 2, AAR (75% amarelo e 25% roxo), negativo; perfil 3, AR (50% amarelo e 50% roxo), concentração próxima ao limite de detecção do teste; perfil 4, ARR (25% amarelo e 75% roxo), positivo; perfil 5, RRR (100% roxo), positivo.



Figura 1. Interpretação dos resultados do Delvotest® SP NT. Fonte: Martins (2013).

#### 4.1.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi realizado teste T para amostras pareadas para as variáveis: contagem de células somáticas (CCS), teor de gordura, proteína, lactose e sólidos totais. A significância estatística foi definida em  $P \leq 0,05$ . Os valores da CCS foram transformados na base logarítmica-10, para poder trabalhar com dados de distribuição normais (RYSANEK et al., 2007; ZAFALON et al., 2008; PAIXÃO et al., 2017). Desta forma, segue a seguinte fórmula:

$\text{Log}N = x$ , onde  $10^x = N$ , em que N é igual a contagem de células somáticas.

A Tabela abaixo, 4.1, representa os valores de CCS em células/ mL/ leite transformados em  $\log_{10}$ .

Tabela 4.1 Valores absolutos (células/ ml/ leite) das médias de CCS e seus respectivos valores em  $\log_{10}$  do leite dos quartos mamários tratados e não tratados antes e depois do tratamento com gentamicina.

Grupo	Quarto Mamário	Valor absoluto (células/ ml/ leite)	
		CCS T0 <sup>1</sup>	Log <sub>10</sub> CCS T0 <sup>1</sup>
01	Tratado	48.400,00	4,68
	Não tratados	103.600,00	5,02
02	Tratado	398.000,00	5,60
	Não tratados	241.200,00	5,38
03	Tratado	4.420.200,00	6,65
	Não tratados	2.482.000,00	6,39

<sup>1</sup>Média antes do tratamento

<sup>2</sup>Média 15 dias após o tratamento

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram realizadas análises microbiológicas dos animais do grupo 01, pois apresentaram resultado negativo no CMT e possuíam CCS abaixo de  $5,3 \log_{10}$ . O resultado das análises microbiológicas dos grupos 02 e 03 encontram-se na Tabela 5.1. Tabela 5.1 Resultados do isolamento bacteriano e antibiograma para gentamicina dos animais dos grupos 02 e 03.

	Grupo		Total	Resistência a gentamicina
	02 (Frequência)	03 (Frequência)		
Amostras de GM	5 (100%)	5 (100%)	10	
Bactérias Isoladas	4 (80%)	5 (100%)	09	
<i>Bacillus sp.</i>	1 (10%)	0 (0%)	1 (10%)	Sensível
<i>Staphylococcus sp.</i>	1 (10%)	0 (0%)	1 (10%)	Sensível
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 (10%)	0 (0%)	1 (10%)	Sensível
<i>Corynebacterium sp.</i>	1 (10%)	3 (60%)	4 (40%)	Resistente
<i>Streptococcus sp.</i>	0 (0%)	1 (10%)	1 (10%)	Intermediária
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1 (10%)	0 (0%)	1 (10%)	Intermediária
Não Houve Crescimento	0	1 (10%)	1 (10%)	

GM – glândula mamária

Do total, em uma amostra não houve crescimento bacteriano. É sabido que 15 a 40% das amostras de leite de casos de mastite podem dar resultados negativos no cultivo bacteriano, mesmo com métodos de coleta e isolamentos corretos (OLDE REIKERINK et al., 2008). Portanto, em 90% das amostras foi diagnosticada a mastite subclínica pela CCS acima de 200.000 células/ ml/ leite e presença de bactéria na amostra de leite colhida.

Dentre as bactérias isoladas, *Corynebacterium sp.* apareceu com frequência de 60% no grupo 03 e 10% no grupo 02 e apresentou-se resistente a gentamicina. Esse gênero bacteriano é considerado agente causador comum da mastite subclínica e foi isolado com frequência entre 7,2% e 29,57% em estudos ao longo dos anos (WILSON et al., 1997; BARKEMA et al., 1997; SOUTO et al., 2008 SCHUKKEN et al., 2009). Portanto, pode ser considerada um importante agente causador da mastite subclínica, pois além de ser isolada frequentemente em trabalhos publicados, causa significativo aumento da CCS e diminuição dos teores de gordura, lactose e proteína total do leite (VITORIA et al., 2005).

As demais bactérias isoladas foram: *Bacillus sp.* com 10% de frequência no grupo 01, *Staphylococcus sp.*, 10% no grupo 01, *Staphylococcus aureus*,

10% no grupo 01, *Streptococcus sp.*, 10% no grupo 02 e *Streptococcus dysgalactiae*, 10% no grupo 01. Essas bactérias são consideradas agentes causadores da mastite subclínica e foram isoladas em amostras de leite de vacas com mastite subclínica em trabalhos já publicados (MOTA et al., 2005; CUNHA et al., 2006; AIRES, 2010; OLIVEIRA e RUEGG, 2014).

*Staphylococcus aureus* é considerado importante agente causador etiológico da mastite subclínica no Brasil e é responsável pela queda na produção e dos teores componentes do leite – proteína, gordura e lactose. Vacas tratadas contra mastite subclínica isoladas com essa bactéria não apresentaram queda significativa na CCS (ZAFALON et al., 2007; WANG, et al., 2007; ACOSTA et al., 2016; SANTOS et al., 2017).

*Bacillus sp.*, *Streptococcus sp.* e *Streptococcus dysgalactiae* também apresentam-se como comuns agentes causadores de mastite subclínica. Da mesma maneira, provocam aumento da CCS e diminuição dos componentes sólidos do leite (gordura, proteína total e lactose) (OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011).

Quanto a resistência bacteriana à gentamicina, *Corynebacterium sp.* foi 100% resistente, *Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp.* e *Staphylococcus aureus* 100% sensíveis e *Streptococcus sp.* e *Streptococcus dysgalactiae* apresentaram sensibilidade intermediária.

O isolamento bacteriano de amostras de leite de vacas suspeitas de mastite subclínica mostrou-se importante, pois foi possível identificar seis espécies diferentes de bactérias com diferentes graus de sensibilidade a gentamicina.

Foi encontrada resistência bacteriana de 100% e intermediária à gentamicina neste trabalho e isso revela a necessidade da realização do isolamento bacteriano seguido de teste de sensibilidade, destarte, o tratamento correto pode ser implantado e isso elimina a possibilidade de utilização inadequada de antimicrobianos, que muito provavelmente não promoverá a cura da doença.

Neste trabalho, o antimicrobiano utilizado não foi eficaz contra *Corynebacterium sp.*, ao contrário, foi eficaz contra *Bacillus sp.* e *Staphylococcus aureus* no teste de sensibilidade. Dessa maneira, o tratamento contra *Corynebacterium sp.* demandou a utilização de outro princípio ativo que não a gentamicina.

Os resultados referentes a contagem de células somáticas do leite dos quartos mamários tratados e do leite do pool dos quartos não tratados com

gentamicina encontram-se na tabela 5.2.

Tabela 5.2 Média e coeficiente de variação da contagem de células somáticas ( $\log_{10}CCS$ ) no leite dos quartos mamários tratados e do pool dos não tratados com gentamicina.

Grupo	Tempo	CCS dos quartos mamários tratados			CCS dos quartos mamários não tratados		
		m <sup>3</sup>	c.v. <sup>4</sup>	P <sup>5</sup>	m <sup>3</sup>	c.v. <sup>4</sup>	P <sup>5</sup>
01	T0 <sup>1</sup>	4,68	28	0,16	5,02	42	0,31
	T15 <sup>2</sup>	5,05	50		4,80	24	
02	T0 <sup>1</sup>	5,60	9	0,64	5,38	13	0,14
	T15 <sup>2</sup>	5,85	9		5,71	13	
03	T0 <sup>1</sup>	6,65	13	0,41	6,39	51	0,62
	T15 <sup>2</sup>	6,58	50		6,26	76	

<sup>1</sup>Tempo 0, antes do tratamento

<sup>2</sup>Quinze dias após o tratamento

<sup>3</sup>Média

<sup>4</sup>Coeficiente de variação (%)

<sup>5</sup>Valor-P ( $P \leq 0,05$ )

A análise estatística não mostrou diferença significativa entre as médias antes e após o tratamento para CCS no leite dos quartos mamários tratados e no pool dos quartos não tratados nos grupos 01, 02 e 03 ( $P \leq 0,05$ ).

A média da CCS encontrou-se em conformidade com a Instrução Normativa n° 62 (IN 62) do MAPA no grupo 01 antes e depois do tratamento e no grupo 02 antes do tratamento no leite dos quartos mamários tratados e do pool dos quartos não tratados. Após o tratamento no grupo 02 e antes e depois do tratamento no grupo 03, no leite dos quartos mamários tratados e do pool dos quartos não tratados, a média da CCS foi acima da estabelecida pela IN 62, ou seja, em não conformidade.

Os grupos não apresentaram redução significativa da CCS após o tratamento no leite dos quartos mamários tratados e do pool dos quartos não tratados. Além disso, os quartos mamários tratados apresentaram aumento da CCS após o tratamento nos grupos 01 e 02. O fato das vacas do experimento serem altamente susceptíveis a novas infecções intramamárias devido ao alojamento inadequado – contato direto com ambiente altamente contaminado entre as ordenhas – pode ter sido fator determinante para esse resultado, além da ineficiência do antimicrobiano sobre algumas das bactérias isoladas.

Sabe-se que a CCS é altamente influenciada pelo ambiente (RUEGG, 2017). Então, mesmo que o antimicrobiano tivesse causado melhora imediata na saúde da glândula mamária dos animais desse experimento (em alguns casos), é possível que tenha havido nova contaminação (agente ambiental ou contagioso) e posterior quadro de inflamação da glândula mamária e resultado no aumento da CCS após o tratamento.

Na Tabela 5.3 encontram-se as médias e coeficiente de variação dos teores de gordura, proteína total e lactose no tempo 0 e quinze dias após o tratamento, no

leite dos quartos mamários tratados com gentamicina.

Tabela 5.3 Média e coeficiente de variação do teor de gordura (g/ 100g), teor de proteína total (g/ 100g) e teor de lactose (g/ 100g) dos grupos 01, 02 e 03 no T0 e quinze dias após, T+15, no leite dos quartos mamários tratados com gentamicina.

Grupo	Tempo	Gordura			Proteína			Lactose		
		m <sup>3</sup>	c.v. <sup>4</sup>	P <sup>5</sup>	m <sup>3</sup>	c.v. <sup>4</sup>	P <sup>5</sup>	m <sup>3</sup>	c.v. <sup>4</sup>	P <sup>5</sup>
01	T0 <sup>1</sup>	3,47	8	0,21	3,41	5	0,93	4,59	7	0,74
	T15 <sup>2</sup>	2,18	13		3,43	21		4,61	2	
02	T0 <sup>1</sup>	2,32	7	0,19	3,29	15	0,30	4,63	5	0,18
	T15 <sup>2</sup>	1,95	7		3,05	42		3,97	11	
03	T0 <sup>1</sup>	3,12	7	0,99	3,19	37	0,46	4,06	19	0,46
	T15 <sup>2</sup>	3,11	8		3,29	30		4,62	39	

<sup>1</sup>Tempo 0, antes do tratamento

<sup>2</sup>Quinze dias após o tratamento

<sup>3</sup>Média

<sup>4</sup>Coeficiente de variação (%)

<sup>5</sup>Valor-P ( $P \leq 0,05$ )

A análise estatística não mostrou diferença significativa entre as médias antes e após o tratamento para os teores de gordura, proteína total e lactose no leite dos quartos mamários tratados 01, 02 e 03 ( $P \leq 0,05$ ).

Na Tabela 5.4 encontram-se as médias e coeficiente de variação dos teores de gordura, proteína total e lactose no tempo 0 e quinze dias após o tratamento, no leite oriundo do pool dos quartos mamários não tratados com gentamicina.

Tabela 5.4 Média e coeficiente de variação do teor de gordura (g/ 100g), teor de proteína total (g/ 100g) e teor de lactose (g/ 100g) dos grupos 01, 02 e 03 no T0 e quinze dias após, T+15, no leite do pool dos quartos mamários não tratados com gentamicina.

Grupo	Tempo	Gordura			Proteína			Lactose		
		m <sup>3</sup>	c.v. <sup>4</sup>	P <sup>5</sup>	m <sup>3</sup>	c.v. <sup>4</sup>	P <sup>5</sup>	m <sup>3</sup>	c.v. <sup>4</sup>	P <sup>5</sup>
01	T0 <sup>1</sup>	3,05	17	0,33	3,42	8	0,71	4,57	8	0,63
	T15 <sup>2</sup>	2,19	6		3,26	19		4,61	2	
02	T0 <sup>1</sup>	2,48	8	0,28	3,24	21	0,92	4,68	1	0,14
	T15 <sup>2</sup>	2,05	9		3,25	54		4,44	14	
03	T0 <sup>1</sup>	3,02	7	0,45	3,40	11	0,50	4,07	26	0,82
	T15 <sup>2</sup>	2,62	10		3,32	17		4,14	56	

<sup>1</sup>Tempo 0, antes do tratamento

<sup>2</sup>Quinze dias após o tratamento

<sup>3</sup>Média

<sup>4</sup>Coeficiente de variação (%)

<sup>5</sup>Valor-P ( $P \leq 0,05$ )

A análise estatística não mostrou diferença significativa entre as médias antes e após o tratamento para os teores de gordura, proteína total e lactose no leite do pool dos quartos mamários não tratados 01, 02 e 03 ( $P \leq 0,05$ ).

O teor de proteína total manteve-se acima do limite mínimo estabelecido pela IN 62 nos três grupos, no leite dos quartos mamários tratados e no do pool dos não tratados antes e depois do tratamento. O teor de lactose dos três grupos,

antes e depois do tratamento, no leite dos quartos mamários tratados e do pool dos quartos não tratados apresentou-se abaixo do estabelecido pela literatura como normal (entre 4,74 e 4,90 g/ 100g) (GONÇALVES, 2012).

Apesar de não haver tido diferença estatística significativa nos resultados dos teores de gordura, proteína total e lactose após o tratamento no leite dos quartos mamários tratados e do pool dos não tratados, o teor de gordura apresentou queda notória após o tratamento nos três grupos estudados tanto nos quartos mamários tratados quanto não tratados.

Sabe-se que o teor de gordura é o componente do leite que apresenta maior variação durante a lactação. É influenciado principalmente pelo Escore de Condição Corporal e pela dieta fornecida (BLOWEY e EDMONDSON, 2010; FORSBÄCK, 2010). Além disso, elevação na CCS em virtude de processo inflamatório gera diminuição do teor de gordura.

Os resultados do leite dos quartos mamários tratados referentes ao Delvotest<sup>®</sup> seguem na tabela 5.5 e são apresentados em frequência relativa.

Tabela 5.5 Resultados dos quartos mamários tratados apresentados pelo Delvotest<sup>®</sup> antes e após o tratamento com gentamicina em frequência relativa (%).

Grupo	Tempo em horas após a primeira infusão														
	0			36			72			120			144		
	Neg. <sup>1</sup>	Lim. <sup>2</sup>	Pos. <sup>3</sup>	Neg. <sup>1</sup>	Lim. <sup>2</sup>	Pos. <sup>3</sup>	Neg. <sup>1</sup>	Lim. <sup>2</sup>	Pos. <sup>3</sup>	Neg. <sup>1</sup>	Lim. <sup>2</sup>	Pos. <sup>3</sup>	Neg. <sup>1</sup>	Lim. <sup>2</sup>	Pos. <sup>3</sup>
01	100%	0%	0%	0%	0%	100%	40%	20%	40%	40%	20%	40%	60%	0%	40%
02	100%	0%	0%	0%	0%	100%	40%	0%	60%	40%	0%	60%	20%	0%	80%
03	100%	0%	0%	0%	20%	80%	0%	0%	100%	0%	20%	80%	0%	20%	80%

<sup>1</sup>Negativo

<sup>2</sup>Próximo ao limite de detecção

<sup>3</sup>Positivo ( $\geq 50 \mu\text{g/L}$ )

Originalmente, o meio de cultura das ampolas do kit Delvotest<sup>®</sup> são de cor roxa. Em caso de positividade no teste, ou seja, presença de antimicrobiano no leite igual ou acima do limite mínimo de detecção, a cor permanece a mesma. Quando o teste é negativo, presença de antimicrobiano no leite abaixo do limite mínimo de detecção, a cor altera-se para amarela.

A fabricante do Delvotest<sup>®</sup> considera quatro tons diferentes de cores nos resultados apresentados: cor amarela e cor intermediária entre amarela e roxa como negativos. Cor roxa fraca e cor roxa forte como positivos.

Diferentemente da bula do Delvotest<sup>®</sup>, Martins (2013) considerou cinco resultados possíveis, classificando em relação a proporção da presença das cores amarela e purpúrea. Quando 100 e 75% amarelo, considerou negativo (abaixo do limite mínimo

de detecção). Quando 50% amarelo e 50% roxa, considerou o resultado como: próximo ao limite de detecção (ou seja, que as amostras continham resíduos em uma concentração próxima ao limite de detecção do teste). Quando 75 e 100% roxas, positivo (igual ou acima do limite mínimo de detecção). Neste trabalho, foi utilizado como padrão de resultado os apresentados por Martins (2013).

O fabricante do teste considera como limite mínimo de detecção para a gentamicina no Delvotest<sup>®</sup> SP NT a concentração de 50 µg/ L e Martins (2013) considerou como limite de detecção para o mesmo teste a concentração de 200 µg/ L, que é a concentração máxima de resíduo gentamicina determinada pelo CODEX ALIMENTARIUS, 2017), assim para as amostras com perfil 3 (próximo ao limite de detecção) no Delvotest<sup>®</sup> neste estudo, serão consideradas aptas ao consumo humano por estarem abaixo do LMR de 200 µg/ L.

A realização de teste quantitativo torna-se necessário, pois a determinação real da concentração de resíduo de gentamicina no leite, possibilitará a determinação do limite mínimo de detecção do Delvotest<sup>®</sup> SP NT para as amostras de leite com resíduo de gentamicina e positivas no teste (perfis 4 e 5) bem como nas amostras com perfil 3.

O grupo 01 apresentou 100% de amostras negativas no tempo 0 e 100% positivas no tempo 36. Esse resultado é esperado, já que no tempo 0 os animais não haviam recebido o tratamento e no tempo 36 haviam passado 12 horas da última infusão. No tempo 72 e 120 – último dia do período de carência, 40% das amostras foram positivas, 20% próximas ao limite de detecção e 40% negativas. Esse resultado demonstra que há diminuição da presença de resíduo do antimicrobiano no leite pela diminuição da frequência de amostras positivas. Está em acordo com Martins (2013), que avaliou a presença de resíduo de gentamicina no leite de vacas após o tratamento e período de carência contra mastite clínica e subclínica e relatou decréscimo na frequência de amostras positivas durante o período de coleta do experimento.

Após o término do período de carência, 40% das amostras foram positivas no Delvotest<sup>®</sup>, assim devem ser analisadas em teste quantitativo de alta sensibilidade para que se possa determinar se ultrapassam ou não o limite máximo de resíduo de 200 µg/l estabelecido.

O grupo 02 apresentou 100% das amostras negativas no tempo 0 e 100% positivas no tempo 36. Resultado esperado e igual ao do grupo 01 (a mesma

justificativa se aplica). Nos tempos 72 e 120 – último dia do período de carência, 60% das amostras foram positivas e 40% negativas. Como descrito acima, também segue diminuição da frequência e diminuição da presença de resíduo do antimicrobiano com o aumento do tempo após o tratamento. Nota-se que o grupo 02 apresentou mais amostras positivas que o grupo 01 no tempo 72 e 120.

Raia 2007, relatou que vacas com maior grau de inflamação da glândula mamária excretam resíduos de antimicrobianos por mais tempo que vacas com glândula mamária sadia, o que justifica a maior frequência de amostras positivas no grupo 02 quando comparadas ao grupo 01. No tempo 144, ou seja, 24 horas após o término do período de carência segundo o fabricante do antimicrobiano utilizado, a frequência de amostras positivas aumentou de 60% para 80% e negativas diminuiu de 40% para 20%. Podem ocorrer oscilações da presença de resíduos de gentamicina a medida em que se avança no tempo após a última infusão intramamária.

O grupo 03 apresentou 100% das amostras negativas no tempo 0, resultado esse esperado, pois nesse momento os animais ainda não haviam sido tratados com a gentamicina. No tempo 36, 80% das amostras foram positivas e 20% próximas ao limite de detecção. Segundo o fabricante, amostras que apresentem resultado próximo ao limite de detecção são consideradas negativas, por sua vez, Martins (2013) considera que essas amostras possuem resíduo do antimicrobiano próximo a 50µg/l, ainda sim negativas, pois continuam abaixo do limite máximo de resíduo estabelecido pelo *Codex Alimentarius*.

É possível que ocorra oscilação no resultado das amostras analisadas pelo Delvotest® após o término do tratamento com gentamicina intramamária no leite de vacas com mastite clínica e subclínica (MARTINS et al., 2016). Ou seja, em um período de 120 horas uma mesma amostra pode apresentar resultados positivos ou negativos em tempos diferentes.

Animais com mastite clínica e subclínica tendem a ter eliminação mais lenta e maior concentração do fármaco administrado no tecido glandular mamário, pois os leucócitos acumulam moléculas da droga e transportam o antimicrobiano até o sítio de infecção. A leucocitose pode aumentar o tempo de retenção dos medicamentos na glândula mamária, fazendo com que o grupo 02 apresentasse nos tempos 72 e 120 60% de amostras positivas e no tempo 144 80% (LUCAS et al., 2009).

Considerando que animais com inflamação causada por infecção

intramamária têm maior absorção sistêmica e apresentam eliminação mais lenta do antimicrobiano que animais com glândula mamária saudável (CAGNARDI et al., 2010; LAINESSE et al., 2012; MARTINS, 2013), é possível que parte do medicamento tenha sido absorvido para a corrente sanguínea e sido distribuído para outros tecidos. Bem como, uma explicação referente aos leucócitos que acumulam e retêm moléculas do antimicrobiano pode explicar o fato de 20% das amostras apresentarem resultado próximo ao limite de detecção, quando esperava-se 100% de amostras positivas nesse período. Ou seja, parte do antimicrobiano estava ligado ao sítio de infecção ao invés de ser eliminado pelo leite (LUCAS et al., 2009).

Sabe-se ainda que a gentamicina, após a infusão intramamária, não é detectada no plasma de vacas com glândula mamária saudável, porém, é absorvida por vacas com mastite e detectada no plasma (SWEENEY et al., 1996). No tempo seguinte analisado, 72 horas após a primeira infusão, novamente 100% das amostras testaram negativas, o que fortalece a explicação anterior.

A utilização do teste de triagem quantitativo é importante pois, quando as amostras são negativas – no caso da utilização da gentamicina, é possível dizer com certeza que estão abaixo do limite máximo de resíduo permitido por lei. Isto, pois o limite mínimo de detecção do teste é de 50 µg/l e todas as amostras negativas estão abaixo desse valor.

No caso das positivas, não é possível afirmar com certeza se estão acima do limite máximo de resíduo. Sabe-se, certamente, que a concentração das amostras está acima de 50 µg/l, mas não é possível afirmar se acima de 200 µg/l. Para isso, é necessário a realização de teste de detecção de resíduo quantitativo com alta sensibilidade.

Observou-se durante o experimento que a quantidade de amostras positivas, em geral, decresce a medida em que se distancia da última infusão intramamária, considerando que a propriedade em que o experimento foi realizado faz duas ordenhas diárias. Ao término do período de carência preconizado pelo fabricante do antimicrobiano intramamário, o grupo 03 com maior grau de CCS, apresentou maior número de animais positivos, seguido pelo grupo 02 e pelo grupo 01 – 80%, 60% e 40% respectivamente. Esse resultado corrobora com o de outros pesquisadores que relatam que animais com infecção intramamária e processo inflamatório eliminam antimicrobianos por mais tempo e mais lentamente que animais com a glândula mamária saudável (RAIA, 2001, LUCAS, 2009).

Os resultados evidenciaram que existe a possibilidade de haver amostras acima do limite máximo de resíduo além do período de carência estipulado pelo fabricante do antimicrobiano intramamário, no grupo 02 e, principalmente, no grupo 03. É necessário quantificar a concentração de resíduos do antimicrobiano por meio de CLAE (GONÇALVES, 2008).

Segue na tabela 5.6 os resultados do leite dos quartos mamários não tratados referentes ao Delvotest<sup>®</sup> e são apresentados em frequência relativa.

Tabela 5.6 Resultados dos quartos mamários não tratados apresentados pelo Delvotest<sup>®</sup> antes e após o tratamento com gentamicina em frequência relativa (%).

Grupo	Tempo em horas após a primeira infusão														
	0			12			36			72			120		
	Neg. <sup>1</sup>	Lim. <sup>2</sup>	Pos. <sup>3</sup>	Neg. <sup>1</sup>	Lim. <sup>2</sup>	Pos. <sup>3</sup>	Neg. <sup>1</sup>	Lim. <sup>2</sup>	Pos. <sup>3</sup>	Neg. <sup>1</sup>	Lim. <sup>2</sup>	Pos. <sup>3</sup>	Neg. <sup>1</sup>	Lim. <sup>2</sup>	Pos. <sup>3</sup>
01	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%
02	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%
03	100%	0%	0%	100%	0%	0%	40%	60%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%

<sup>1</sup>Negativo

<sup>2</sup>Próximo ao limite de detecção

<sup>3</sup>Positivo ( $\geq 50 \mu\text{g/L}$ )

No grupo 01 e 02, 100% das amostras foram negativas nos tempos 0, 12, 36, 72 e 120 horas após a primeira infusão. Sweeney et al. (1996) não detectaram resíduo de gentamicina após infusão intramamária ( $1,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) em leite quartos mamários não tratados adjacentes ao tratado em vacas experimentalmente induzidas a mastite com *Escherichia coli*. O autor realizou as coletas 10, 15, 30, 45 e 60 minutos e 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a infusão. Vale ressaltar que no experimento citado foi realizada apenas uma infusão intramamária. A concentração do antimicrobiano e a natureza do veículo afetam tanto o tempo de eliminação quanto a concentração do resíduo eliminado no leite.

No presente estudo, foram realizadas duas infusões de 150 mg de sulfato de gentamicina com intervalo de 24 horas, assim considerando o peso médio de vacas holandesas de 600 kg, a dose utilizada foi de  $0,25 \text{ mg.kg}^{-1}$ , menor que a dose relatada por Sweeney et al. (1996), validando a possibilidade de leite oriundo de tetos não tratados com antibiótico, estarem aptos para consumo humano por apresentarem resíduo de antibiótico dentro dos padrões requeridos pela legislação.

O grupo 03, apresentou 100% das amostras negativas nos tempos 0 e 12. No tempo 36, 40% das amostras foram negativas e 60% próximas ao limite de detecção. Nos demais tempos posteriores, 100% das amostras foram negativas. Esse

resultado demonstra que existe resíduo de antimicrobiano no leite dos animais do grupo 03 no tempo 36, mas inferior ao limite máximo de resíduo preconizado pelo *Codex Alimentarius*.

Esse grupo foi o que apresentou maior média de CCS no momento da primeira infusão de gentamicina, 6,51  $\log_{10}$  ou 4.420.200.000 células/ml nos quartos mamários tratados. Possivelmente o grau de inflamação aumenta a permeabilidade celular e conseqüentemente ocorre maior absorção sistêmica da gentamicina que se distribui pelo tecido mamário dos quartos adjacentes ao tratado (ALLEN et al., 1990; BARBANO et al., 1991).

Cagnardi et al. (2010) observaram maior absorção sistêmica de cefoperazona administrada via intramamária em vacas com mastite subclínica infectadas com *Staphylococcus aureus* do que em vacas saudáveis.

Nos grupos 01 e 02, em todos os tempos estudados, fica evidenciado que não houve eliminação de resíduo de gentamicina ou se houve, foi abaixo do limite mínimo de detecção do teste. Já no grupo 03, 60% das amostras apresentaram resultado próximo ao limite de detecção, o que indica que houve passagem do antimicrobiano para os quartos não tratados. Mas, nos tempos à frente, 72 e 120 horas (término do período de carência) após a primeira infusão novamente 100% das amostras foram negativas no Delvotest<sup>®</sup>. Sendo assim, todas as amostras suspeitas (próximas ao limite de detecção do teste) e negativas estão abaixo do LMR estabelecido pelo *Codex Alimentarius*.

Esse resultado possibilita pensar que, em vacas com mastite, há maior absorção sistêmica de antimicrobiano administrado por via intramamária e é possível a passagem para quartos adjacentes não tratados. Mas, ao que indica, abaixo do limite máximo de resíduo permitido. Bem como, que em animais saudáveis ou com CCS em níveis intermediários não há passagem, ou se há, a concentração está dentro do limite admitido e não causaria danos à saúde dos consumidores.

A instrução normativa vigente no Brasil que rege a qualidade do leite, nº 62 do MAPA, publicada em 29 de dezembro de 2011, diz em seus anexos I e II, no item 4 sobre sanidade animal, que toda vaca em lactação que estiver sob tratamento com medicamento veterinário passível de eliminação pelo leite deve ser retirada do sistema de produção pelo tempo de carência estipulado pelo fabricante. Não há especificação sobre a via de administração. É possível entender que a retirada do animal do sistema de produção seja o afastamento das demais vacas em lactação e que o seu leite total seja

descartado, ou apenas a segunda afirmação. Independentemente, nos dois cenários o produtor terá que descartar todo o leite produzido pelo animal em tratamento.

Sabe-se que a administração de antimicrobianos por via intramuscular e intravenosa acarretará em eliminação de resíduo pelos quatro quartos mamários do animal, isso é ponto pacífico. Porém, no caso da administração por via intramamária, foi demonstrado que o leite dos quartos mamários adjacentes ao tratado está abaixo do limite máximo de resíduo para a gentamicina. Sendo assim, o leite oriundo dos quartos mamários adjacentes ao tratado por via intramamária está apto a ser comercializado como leite tipo A ou cru refrigerado sem comprometimento do sistema como um todo e respeitando a ideia de saúde única do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, por meio da instrução normativa nº 42.

Outro ponto importante a se olhar com essa possibilidade de aproveitamento do leite dos quartos mamários não tratados é a diminuição do impacto econômico negativo da mastite, pois o leite que seria previamente descartado poderá ser fonte de faturamento ao produtor.

## 6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados expostos no trabalho, que vacas com CCS acima de 200.000 possuíam mastite subclínica bacteriana. Também, que o tratamento realizado (realizado com duas aplicações com intervalo de 24 horas) com gentamicina não proporcionou diferença significativa na CCS e nos teores de gordura, proteína total e lactose no leite tanto dos quartos mamários tratados quanto não tratados.

Ocorre oscilação na frequência de amostras positivas no Delvotest<sup>®</sup> (hora positivas, hora negativas) nos quartos mamários tratados com gentamicina em vacas com mastite subclínica.

Existem amostras de leite positivas no Delvotest<sup>®</sup> após o término do período de carência em quartos mamários tratados com sulfato de gentamicina tanto em vacas saudáveis quanto em vacas com mastite subclínica.

Amostras positivas para gentamicina no Delvotest<sup>®</sup> não são confirmatórias de estarem acima do LMR permitido. Amostras negativas no para gentamicina no Delvotest<sup>®</sup> estão abaixo no LMR permitido.

Existe a possibilidade de vacas com mastite subclínica eliminarem resíduo de gentamicina além do prazo de carência estabelecido pelo fabricante do produto comercial de infusão intramamária no quarto mamário tratado.

## 7. REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F.M. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 96, p. 271-281, 2005.
- ACOSTA, A.C.; da SILVA, L.B.G.; MEDEIROS, E.S.; JUNIOR, J.W.P.; MOTA, R.A.; Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 565-573, 2016.
- AIRES, T.A.C.P. **Mastites em Bovinos: caracterização etiológica, padrões de sensibilidade e implementação de programas de qualidade do leite em explorações do Entre-Douro e Moinho**. 2010. 77f. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, 2010.
- ALLEN, J.C. Milk synthesis and secretion rates in cows with milk composition changed by oxytocin. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 975-984, 1990.
- ALMEIDA, A.C.; FONSECA, Y.M.; SOARES, T.M.P.; DA SILVA, D.B.; BUELTA, T.T.M.; SILVA, G.L.M.E. Tratamentos de mastite subclínica em bovinos utilizando bioterapia. **Revista da Universidade de Alfenas**, v. 5, p. 199-203, 1999.
- ANDREW, S.M.; FROBISH, R.A.; PAAPE, M.J.; MATURIN, L.J. Evaluation of selected antibiotic residue screening tests for milk from individual cows and examination of factors that affect the probability of false-positive outcomes. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 3050-3057, 1997.
- ATTAIE, R.; BSHARAT, M.; GUTIERREZ, A.M.; WOLDESENBET, S. *Short communication*: Determination of withdrawal time for oxytetracycline in different types of goats for milk consumption. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 1-7, 2015.
- AULDIST, M.J.; COATS, S.; ROGERS, G.L.; MCDOWELL, G.H. Changes in the composition in milk from healthy and mastitic cow during the lactation cycle. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 35, p. 427-436, 1995.

- AULDIST, M.J.; HUBBLE, I.B. Effects of mastitis on raw milk and dairy product. **Australian Journal of Dairy Technology**, V. 53, P. 28-37, 1998.
- AUTO, H.F.; CONSTANT, J.M.C.; COSTANT, A.B.L. Antibióticos e Quimioterápicos. Editora Edufal, 5. ed., 2008.
- BARBALHO, T.F.C.; MOTA, R.A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 2, p. 31-36, 2001.
- BARBANO, D.M.; RASMUSSEN, R.R.; LYNCH, J.M. Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 369-388, 1991.
- BARKEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y.H.; LAM, T.J.; GALLIGAN, D.T.; BEIBOER, M.L.; BRAND, A. Estimation of interdependence among quarters of the bovine udder with clinical mastitis and implications for analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1592-1599, 1997.
- BARTON, M.D. Antibiotic use in animal feed and its impacts on human health. **Nutrition Research Reviews**, v. 13, p. 279-299, 2000.
- BERGLUND, I.; PETTERSON, G.; ÖSTENSSON, K.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. Quarter milking for improved detection of increased SCC. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 427-432, 2007.
- BLOWEY, R.; EDMONDSON, P. **Mastitis control in dairy herds**, 2 Ed. London: CAB international, 2010. p. 266.
- BOBBO, T.; RUEGG, P.L.; STOCCO, G.; FIORE, E.; GIANESELA, M.; MORGANTE, M.; PASOTTO, D.; BITTANTE, G.; CECCHINATO, A. Associations between pathogen-specific cases of subclinical mastitis and milk yield, quality, protein composition, and cheese-making traits in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 1-16, 2017.
- BOCHNIARZS, M.; ZDZISINSKA, B.; WAWRON, W.; SZCZUBIAL, M.; DABROWSKI, R. Milk and sérum IL-4, IL-6, IL-10, and amyloid A concentrations in cows with subclinical staphylococci. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 1-7, 2017.
- BRAMLEY, A. J.; DODD, F. H. Reviews of the progress of Dairy Science: Mastitis control – progress and prospects. **Journal of Dairy Research**, v. 51, p. 481-512, 1984.

BRASIL, Leis, Decretos, etc. Portaria n.8, de 26 jun. 1984. In: Balde Branco, São Paulo, v.18, n.238, p.30-35, 1984. [Ministério da Agricultura, secretária Nacional de Defesa Agropecuária e Secretária de Inspeção de Produto Animal definem normas técnicas e higiênico-sanitárias para a produção de leite tipo “B”].

BRASIL. 2003b. Resolução RDC n° 253, de 16 de setembro de 2003. Cria Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal - PAMVet. **Diário Oficial da União, Brasília**, p. 90- 91, 18 set. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 45, de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCRP, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 22 dez. 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 29 set. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 31 dez. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 62, de 23 de outubro de 2017. Institui o Programa Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos na Agropecuária – AgroPrevine, no âmbito do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 09 nov. 2017.

- BROOKS, B. W.; BARNUM D. A. Experimental colonization of the bovine teat duct with *Corynebacterium bovis* and the effect on milk somatic cell counts. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 48, p. 141–145, 1984.
- BROOKS, B. W.; BARNUM, D. A.; MEEK, A. H. 1983. An observational study of *Corynebacterium bovis* in selected Ontario dairy herds. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 47, p. 73–78, 1983.
- BUENO, V.F.F.; MESQUITA, A.J.; NICOLAU, E.S.; OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, J.P.; NEVES, R.B.S.; MANSUR, J.R.G.; THOMAZ, L.W. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. **Ciência Rural**, v. 35, p. 848-854, 2005.
- CAGNARDI, P.; VILLA, R.; GALLO, M.; LOCATELLI, C.; CARLI, S.; MORONI, P.; ZONCA, A. Cefoperazone sodium preparation behavior after intramammary administration in healthy and infected cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 4105-4110, 2010.
- CANUTO, G.A.P.; XAVIER, A.A.O.; NEVES, L.C.; BENASSI, M.T. Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 196-205, 2010.
- CASELANI, K. Resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. **Arquivos de Ciência Veterinária e Zoologia da UNIPAR**, v. 17, p. 187-195, 2014.
- CECIL, H.C.; BITMAN, J.; WOOD, J.R. Changes in milk glycogen during mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 48, p. 1607-1611, 1965.
- CODEX ALIMENTARIUS. **Maximum Residues Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for Residues of Veterinary Drugs in Food**. CAC/MRL 2-2015. Disponível em: <[www.fao.org/input/download/standards/45/MRL2\\_2015e.pdf](http://www.fao.org/input/download/standards/45/MRL2_2015e.pdf)>. Acesso em: 09 jan. 2017.
- COELHO, V.R.P. **Avaliação de resíduos de antimicrobiano no leite de quartos mamários não tratados de vacas com mastite tratadas por via intramamária**. 2003. 102 f. Dissertação (Mestrado em Qualidade Produtiva Animal) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2003.

CRUVINEL, W.M.; JÚNIOR, D.M.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; SOUZA, A.W.S.; SILVA, N.P.; ANDRADE, L.E.C. Sistema imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 434-461, 2010.

CUNHA, A.P.; DA SILVA, L.B.G.; PINHEIRO JÚNIRO, J.W.; DA SILVA, D.R.; OLIVEIRA, A.A. da F.; DA SILVA, K.P.C.; MOTA, R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, p. 17-21, 2006.

DE VliegHER, S.; FOX, L.K.; PIEPERS, S.; McDOUGALL, S.; BARKEMA, H.W. *Invited review*: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 1025-1040, 2012.

DSM Food Specialties. Disponível em: <<https://nelsonjameson.com/content/wp-content/uploads/2015/08/Detection-Sensitivity-list-of-the-Delvotest-SP-NT.pdf>>.

Acesso em: 5 mar. 2018.

EBRAHIM, G.J. Bacterial resistance to antimicrobials. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 56 p. 141-143, 2010.

ELVINGER, F.; NATZKE, R. P. Elements of mastitis control. In: VAN HORN, H. H.; WILCOX, C. J. **Large dairy herd management**. Champaign: American Dairy Science Association, 1992. 440-447p.

ESTEVÃO-NETO, A.; JÚNIOR, F.G.; SANTOS, J.C.A.; SILVA, L.C.A.; MATOS, R.A.T. Avaliação de resíduo de antibiótico em amostras de leite de vacas após a terapia de vacas secas. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 82, p. 1-4, 2015.

FERREIRA, R.G.; SPISSO, B.F.; DA HORA, I.M. de C.; MONTEIRO, M.A.; PEREIRA, M.U.; DA COSTA, R.P.; CARLOS, B. de S. Panorama da ocorrência de resíduos de medicamentos veterinários em leite no Brasil. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 19, p. 30-49, 2012.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. Qualidade do leite e controle de mastite. São Paulo: Lemos, 2000. 175 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Maximum Residue Limits**, 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/en/>. Acesso em: 09 jan. 2017.

FORSBÄCK, L.; LINDMARK-MANSSON, A.; ANDRÉN, A.; AKERSTEDT, M.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. Udder quarter milk composition at different levels of somatic cell count in cow composite milk. **Animal: an International Journal of Animal Bioscience**, v. 3, p. 710-717, 2009.

FORSBÄCK, L. **Bovine Udder quarter milk relation to somatic cell count**. 2010. 70f. Tese (Doutorado) – Faculty of Veterinary Medicina and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences, Switzerland, 2010.

FREITAS, M.F.L. de; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; STAMFORD, T.L.M.; RABELO, S.S. de A.; da SILVA, D.R.; SILVEIRA FILHO, V.M. da; SANTOS, F.G.B.; SENA, M.J. de; MORA, R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiano *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v; 72, p. 171-177, 2005.

GALLIN, J.I.; GOLDSTEIN, I.M.; SNYDERMAN, R. **Inflammation: Basic principles and basics correlates**. 2. ed. Nova Iorque: Raven Press. 1992.

GOLNÇALVES, S. **Avaliação da presença de resíduo de gentamicina em leite de vaca após o tratamento com mastite**. 2008. 77f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas) – Faculdades de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

GONÇALVES, J.L. **Produção e composição do leite de vacas com mastite causada por *Corynebacterium spp.***. 2013. 128f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassunuga, 2012.

GORBACH, S.L. Antimicrobial use in animal feed – time to stop. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, p. 1202-1203, 2001.

GROOMS, D.L.; NORBY, B.; GOOMS, K.E.; JAGODZINSKI, E.N.; ERSKINE, R.J.; HALBERT, L.W.; COETZEE, J.F.; WULF, L.; RICE, J.A. Short communication: Use of the BetaStar Plus assay for detection of ceftiofur antimicrobial residues in milk from individual cows following intramammary treatment for mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 6270-6277, 2015.

HAIMERL, P.; HEUWIESER, W. *Invited review*: Antibiotic treatment of metritis in dairy cows: A systematic approach. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 6649-6661, 2014.

HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting sommatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2103-2112, 1994.

- JAMALI, H.; RADMEHR, B.; ISMAIL, S. *Short communication: Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 2226-2230, 2014.*
- JONES, G. M.; SEYMOUR, E. H. Cowside antibiotic residue testing. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 2292-2296, 1988.
- JUNG, C.F.; JÚNIOR, A.A.M. Produção leiteira no Brasil e características da bovinocultura leiteira no Rio Grande do Sul. **Revista Ágora**, v. 19, p. 34-47, 2017.
- KACZOREC, E.; MALACZEWSKA, J.; WÓJCIK, R.; REKAWEK, W.; SIWICKI, K. Phenotypic and genotypic antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus spp.* isolated from cases of clinical mastitis in dairy cattle in Poland. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 1-12, 2017.
- KANG, J.H.; JIN, J.H.; KONDO, F. False-positive outcome and drug residue in milk samples over withdrawal times. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 908-913, 2005.
- KAYITSINGA, J.; SCHEWE, R.L.; CONTRERAS, G.A.; ERSKINE, R.J. Antimicrobial treatment of clinical mastitis in the eastern United States: The influence of dairy farmers' mastitis management and treatment behavior and attitudes. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 1388-1407, 2017.
- KUIPERS, A.; KOOPS, W.J.; WEMMWNHOVE, H. Antibiotic use in dairy herds in the Netherlands from 2005 to 2012. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 1632-1648, 2016.
- LAINESSE, C.; GEHRING, R.; PASLOSKE, K.; SMITH, G.; SOBACK, S.; WAGNER, S.; WHITTEM, T. Challenges associated with the demonstration of bioequivalence of intramammary products in ruminants. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 35, p. 65-79, 2012.
- LARANJA, L.F.; MACHADO, P.F. Ocorrência de mastite bovina em fazendas produtoras de leite B no estado de São Paulo. **Scientia Agrícola**, v. 51, p. 578-585, 1994.
- LE BRETON, M-H.; SAVOY-PERROUD, M-C.; DISERENS, J-M. Validation and comparison of the Copan Milk Test and Delvotest SP-NT for the detection of antimicrobials in milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 586, p. 280-283, 2007.
- LEITNER, G.; KRIFUCKS, O.; MERIN, U.; LAVI, Y.; SILANIKOVE, N. Interactions between bacteria type, proteolysis of casein and physico-chemical properties of bovine milk. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 648-654, 2006.
- LEVY, S.B. The antibiotic paradox: how the misuse of antibiotics destroys their curative powers, 2nd edition. **International Microbiology**, v. 5, p. 155-156, 2002.

- LIMA, L.S.G.F.; DO VALLE, C.R.; RIBEIRO, A.R.; BRAGA, F.A. Avaliação da sensibilidade de *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp* e *Corynebacterium spp* em fazendas do sul de minas gerais e nordeste de são paulo no quinquênio de 2006 a 2010. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, p. 134-135, 2013.
- LIU, H.; LI, S.; MENG, L.; DONG, L.; ZHAO, S.; LAN, X.; WANG, J.; ZHENG, N. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy herds in northern China. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 1-8, 2017.
- LUCAS, M.F.; ERRECALDE, J.O.; MESTORINO, M. Pharmacokinetics of azithromycin in lactating dairy cows with subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 33, p. 132-140, 2009.
- MACEDO, L.C.S.; FREITAS, J.A. Ocorrência de resíduos de antimicrobianos em leite. **Revista de Ciências Agrárias**, n. 52, p. 147-157, 2009.
- MARQUES, A.P.L.; BOTTEON, R.C.C.M.; MACHADO, C.H.; MEDEIROS, B.P.; ASSIS, J.D.; BARROS, J.P.N.; ARAÚJO, F.L. Contagem diferencial de células no leite de vacas com mastite subclínica com as colorações de May-Grünwald Giemsa e Gram. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 38, p. 123-127, 2016.
- MARSHALL, B.M.; LEVY, S.B. Food animals and antimicrobials: impact on human health. **Clinical Microbiology Review**, v. 24, p. 718-733, 2011.
- MARTIN, J.G.P. Resíduos de antimicrobianos em leite – uma revisão. **Segurança Alimentar e Nacional**, v. 18, p. 80-87, 2011.
- MARTINS, T. **Resíduos de Gentamicina no Leite de Vacas com Mastite Clínica e Subclínica Submetidas a Tratamento Intramamário**. 2013. 85 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal Sustentável) – Instituto de Zootecnia APTA/SAA, 2013.
- MARTINS, T.; ROSA, A.F.; CASTELANI, L.; MIRANDA, M.S.; ARCARO, J.L.P.; POZZI, C.R. Intramammary treatment with gentamicin in lactating cows with clinical and subclinical mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, p. 283-289, 2016.
- METTIFOGO, E.; MULLER, E.E.; FREITAS, J.C.; MEGID, J.; ALFIERI, A.A.; BELOTI, V. Subclinical mastitis attributable to *Corynebacterium bovis* in cattle from Northern Paraná, Brazil. **Semina Londrina**, v. 12, p. 41-4, 1991.

- MILES, T.D.; McLAUGHIN, W.; BROWN, P.D. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from broiler chickens and humans. **BMC Veterinary Research**, v. 2, p. 1-9, 2006.
- MOTA, R.A.; SILVA, K.P.C.; FREITAS, M.F.L.; PORTO, W.J.N.; SILVA, L.B.G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, p. 465-470, 2005.
- NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; AMARAL, do L.A.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; OLIVEIRA, R.P. Sensibilidade antimicrobiano dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, p. 1-4, 2007.
- NERO, L.H.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; FRANCO, B.D.G.M. Resíduo de antibióticos em leite de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 391-393, 2007.
- NETO, A.E.; JÚNIOR, F.G.; SANTOS, J.C.A.; SILVA, L.C.A.; MATOS, R.A.T. Avaliação de resíduos de antibióticos em amostra de leite de vacas após a terapia de vacas secas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, p. 1-4, 2015.
- NETTO, P.D.; LOPES, M.O.; DE OLIVEIRA, M.C.S.; NUNES, M.P.; JUNIOR, M.M.; BOSQUIROLI, S.L.; BENATTO, A.; BENINI, A.; BOMBARDLLI, A.L. de C.; FILHO, D.V.; MACHADO, E.; BELMONTE, I.L.; ALBERTON, M.; PEDROSO, P.P.; SCUCATO, E.S. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Paraná. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 27, p. 145-151, 2005.
- NIELEN, M.; SCHUKKEN, Y.W.; BRAND, A. Detection of subclinical mastitis from on-line milking parlor data. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 1039-1049, 1995.
- NIEMIALTOWSKI, M.; NONNECKE, B.J.; TARGOWSKI, S.P. Phagocytic activity of milk leukocytes during chronic staphylococcal mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 780-787, 1988.
- NOBREGA, D.B.; DE BUCK, J.; NAQVI, S.A.; LIU, G.; NAUSHAD, S.; SAINI, V.; BARKEMA, H.W. Comparison of treatment records and inventory of empty drugs containers to quantify antimicrobial usage in dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v.100, p. 1-10, 2017.
- NOVAES, S.F.; SCHREINER, L.L.; SILVA, I.P.; FRANCO, R.M. Residues of veterinary drug in milk in Brazil. **Revista Ciência Rural**, v.47, n. 8, 2017.

- 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.
- OLIVEIRA L.; HULLAND, C.; RUEG, P.L. Characterization of clinical mastitis occurring in cows on 50 large dairy herds in Wisconsin. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 7538-7549, 2013.
- OLIVEIRA, L.; RUEGG, P.L. Treatments of clinical mastitis occurring in cows on 51 large dairy herds in Wisconsin. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 1-11, 2017.
- OLIVEIRA, U.V.; GALVÃO, G.S.; PAIXÃO, A.R.R.; MUNHOZ, A.D. Ocorrência, etiologia infecciosa e fatores de riscos associados à mastite bovina na microrregião de Itabuna-Ilhéus, Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 11, p. 630-640, 2010.
- OLIVEIRA, U.V.; GALVÃO, G.S.; RIBEIRO, A.R.P.; ANDRIOLI, J.L.; MUNHOZ, A.D. Eficácia *in vitro* da gentamicina sobre bactérias isoladas de vacas com mastite subclínica na microrregião Ilhéus-Itabuna, Bahia. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, p. 213-218, 2012.
- OVIDO-BOYSO, J.; VALDEZ-ALARCÓN, J.J.; CAJERO-JUÁREZ, M.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-MEZA, J.E.; BRAVO-PATIÑO, A.; BAIZABAL-AGUIRRE, V.M.; Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. **Journal of Infection**, v. 54, p. 399-409, 2007.
- PAAPE, M.J.; BANNERMAN, D.D.; ZHAO, X.; LEE, J.W. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. **Veterinary Research**, v. 34, p. 597-627, 2003.
- PAIXÃO, M.G.; ABREU, L.R.; RICHERT, R.; RUEGG, P.L. Milk composition and health status from mammary gland quarts adjacent to glands affected with naturally occurring clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 1-12, 2017.
- PARK, C. S.; LINDBERG, G. L. Glândula Mamária e Lactação. In: DUKES, H. H. **Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007, p. 670-690.
- PEREIRA, M.N.; SCUSSEL, V.M. Resíduos de antimicrobianos em leite bovino: fonte de contaminação, impactos e controle. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 16, p. 170-182, 2017.

- PRESTES, D.S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: fatores que influenciam – uma revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 9, p. 118-132, 2002.
- RADOTISTIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária: um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 1880p.
- RAIA JUNIOR, R. B. **Fatores fisiológicos, clínicos e farmacológicos, determinantes de resíduos de antimicrobianos no leite, avaliados em protocolos terapêuticos de mastite em bovinos leiteiros**. 2007. 85 f. Dissertação (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2007.
- RAIA JUNIOR, R. B. **Influência da mastite na ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite**. 2001. 106 f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2001.
- REBHUN, W.C. **Doenças do gado leiteiro**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2000. 643p.
- REECE, W. O. Lactação. In: REECE, W. O. **Anatomia Funcional e Fisiologia dos Animais Domésticos**. 3 ed. São Paulo: Roca, 2008, p. 418-431.
- REIS, S.R.; SILVA, N. BRESCIA, M.V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p.651-658, 2003.
- REYHER, K.K.; DOHOO, I.R. Diagnosing intramammary infections: Evaluation of composite milk samples to detect intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 3387-3396, 2011.
- RUEGG, P.L. A 100-Year Review: mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 10381-10397, 2017.
- RYSANEK, D.; BABAK, V.; ZOUHAROVA, M. Bulk tank milk somatic cell count and sources of raw milk contamination with mastitis pathogens. **Veterinarni Medicina**, v. 52, p. 223-230, 2007.
- SAEKI, E.K.; PEIXOTO, E.C.T.M.; MATSUMOTO, L.S.; MARCUSSO, P.F.; MONTEIRO, R.M. Mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, p. 284-290, 2011.

SAINI, V.; McCLURE, J.T.; LÉGER, D.; DUFOUR, S.; SHELDON, A.G.; SCHOLL, D.T.; BARKEMA, H.W. Antimicrobial use in Canadian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, 95, p. 1209-1221, 2012.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. 1ªed. Barueri: Manole, 2007. 314p.

SARGEANT, J.M.; LESLIE, K.E.; SHIRLEY, J.E.; PULKRABEK, B.J.; LIM, G.H. Sensitivity and specificity of somatic cell count and california mastitis test for identifying intramammary infection in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 2018-1024, 2001.

SCHUKKEN, Y.H.; GONZÁLEZ, R.N.; TIKOFSKY, L.L.; SCHULTE, H.L.; SANTISTEBAN, C.G.; WELCOME, F.L.; BENNET, G.J.; ZURAKOWSKIM.J.; ZADOKS, R.N. CNS mastites: nothing to worry about? **Veterinary Microbiology**, v. 134, p. 9-14, 2009.

SCHUKKEN, Y.H.; de LEEMPUT, E.S.; MORONI, P.; WELCOME, F.; GUARJAR, A.; ZURAKOWSKI, M.; GUTIERREZ, C.; CEBALLOS, A.; ZADOKS, R. Countagious or environmental - A herd diagnosis. In: XXVII World Buiatric Congress, p. 145-148, 2012. Lisbon Portugal. **Anais...** Lisbon: Lisbon Congress Center, 2012. 178p.

SCHALLIBAUM, M. Impact of SCC on the quality of fluid milk and cheese. In: **National Mastitis Council**, Inc. 40th Annual Meeting Proceedings, p. 38-46, 2001.

SHARMA, N.; SINGH, N.K.; BHADWAL, M.S. Relationship of somatic cell count and mastitis: an overview. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 24, p. 429-438, 2011.

SHEPHARD, R.W.; MALMO, J.; PFEIFFER, D.U. A clinical trial to evaluate the effectiveness of antibiotic treatment of lactating cows with high somatic cell counts in their milk. **Australian Veterinary Journal**, v. 78, p. 763-768, 2000.

SILVA, M. C. **Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema SimPlate**. São Paulo. Dissertação (Mestrado)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2012.

SILVA, D.P.; GELLEN, F.L.A.; SILVA, T.S.; COSTA, J.L.; SILVA, A.L.L.; SCHEIDT, G.N. Resíduos de antibióticos em leite: prevalência, danos à saúde, e prejuízos na indústria de laticínios. **Evidência**, v. 13, p. 127-152, 2013.

- SILVA, M.V.C.; QUINTÃO, D.F.; FERNANDES, F. Avaliação dos padrões físico-químicos do leite pasteurizado comercializado em Muriaé (MG). **Revista Científica da Faminas**, v. 9, n. 3, 2013.
- SOUZA, F.N.; CUNHA, A.F.; ROSA, D.L.S.O.; BRITO, M.A.V.; GUIMARÃES, A.S.; MENDONÇA, L.S.; SOUZA, G.N.; LAGE, A.P.; BLAGITZ, M.G.; LIBERA, A.M.M.P.D.; HEINEMANN, M.B.; CERQUEIRA, M.M.O.P. Somatic cell count and mastitis pathogen detection in composite and single or duplicate quarter milk samples. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 811-818, 2016.
- SPINOSA, H. S. GÓRNIAC, S. L. BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2017. 288p.
- STEPHENS, M.R. Policies and programs concerning antibiotic and pesticide residues in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 43, p. 580-583, 1960.
- STOKSTAD, E.L.R.; JUKES, T.H. Further observations on the "Animal Protein Factor.". **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 73, p. 523-528, 1950.
- SUOJALA, L.; POHJANVIRTA, T.; SIMOJOKI, H.; MILLYNIEMI, A.; PITKÄLÄ, A.; PELKONEN, S.; PYÖRÄLÄ, S. Phylogeny, virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated in clinical bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 147, p. 383-388, 2011.
- SWEENEY, R.W.; FENNEL, M.A.; SMITH, C.M.; BARDALAYE, P.C. Systemic absorption of gentamicin following intramammary administration to cows with mastitis. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 19, p. 155-157, 1996.
- TEUBER, M. Veterinary use and antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v.4, p. 493-499, 2005.
- THORBERG, B-M.; DANIELSSON-THAM, M-L.; EMANUELSON, U.; WALLER, K.P. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 4962-4970, 2009.
- TIMONEN, A.A.E.; KATHOLM, J.; PETERSEN, A.; MÖTUS, K.; KALMUS, P. Within-herd prevalence of intramammary infection caused by *Mycoplasma bovis* and associations between cow udder health, milk yield, and composition. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 6554-6561, 2017.
- URECH, E.; PUHAN, Z.; SCHALLIBAUM, M. Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2402-2411, 1999.

- VIEIRA, T.S.W.J.; RIBEIRO, M.R.; NUNES, M.P.; JÚNIOR, M.M.; NETTO, D.P. Detecção de resíduos de antibióticos em amostras de leite do Estado do Paraná, Brasil. **Ciências Agrárias**, v. 33, p. 791-796, 2012.
- VITÓRIA, C.; DA SILVA, A.V.; ELIAS, A.O.; LANGONI, H. *Corynebacterium bovis* e os padrões de contagem de células somáticas no Brasil. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 8, p. 161-164, 2005.
- WANG, D.; ZHANG, L.; YONG, C.; SHEN, M. ALI, T.; SHAHID, M., HAN, K.; ZHOU, X.; HAN, B. Relationships among superantigen toxin gene profiles, genotypes, and pathogenic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 1-11, 2017.
- WILSON, D.J.; GONZALES, R.N.; DAS, H.H. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 2592-2598, 1997.
- ZAFALON, L.F.; AMARAL, L.A.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J.V.; REZENDE, F.D.; OLIVEIRA, J.A. Influência das bactérias do gênero *Corynebacterium* e *Estafilococcus coagulase* positivos e negativos, sobre a contagem de células somáticas e a produção láctea de quartos mamários com mastite subclínica. **Revista do NAPGAMA**, v. 6, p. 4-6, 1999.
- ZAFALON, L.F.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J.V.; RESENDE, F.D. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia em vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 577-585, 2007.
- ZHANG, D.; ZHAND, Z.; HUANG, C.; GAO, X.; WANG, Z.; LIU, Y.; TIAN, C.; HONG, W.; NIU, S.; LIU, M. The phylogentic group, antimicrobial susceptibility, and virulence genes of *Escherichia coli* from clinical bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 572-580, 2018.

## 8. ANEXO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PR COMITÊ DE  
ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA UENP PORTARIA 266/2016

DECLARAÇÃO n° 03/2017

Certificamos que o Projeto registrado no SECAPEE n° 3653

**Avaliação de resíduo de sulfato de gentamicina no leite de vacas com mastite subclínica tratadas por via intramamária** sob a responsabilidade de Prof. MARCELO ALVES DA SILVA está de acordo com os PRINCÍPIOS ÉTICOS DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL vigentes na legislação Brasileira e foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais da universidade Estadual do Norte do Paraná.

(We certify that the research: **Valuation of gentamicine sulphate residue in milk of cows with subclinical mastitis treated by intramammary infusion** agrees with Brazilian ethical principles in animal research and was approved by the ETHICAL COMMISSION OF UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PARANÁ having been approved by its reporters.) Bandeirantes, 20 de abril de 2017.

Prof. Dra. Mariza Fordellone Rosa Cruz  
Coordenação CEUA/UENP