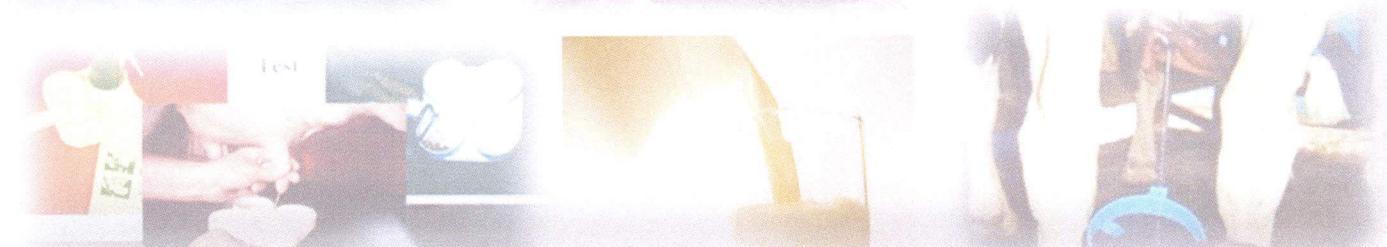




ANNA CATHARINA MAIA DEL GUERCIO VON SYDOW



Comparação entre a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) e contagem de células somáticas (CCS) de leite proveniente de glândulas mamárias de bovinos com mastite subclínica e associadas à presença de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. e a associação de ambos microrganismos



São Paulo
2010

ANNA CATHARINA MAIA DEL GUERCIO VON SYDOW

Comparação entre a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) e contagem de células somáticas (CCS) de leite proveniente de glândulas mamárias de bovinos com mastite subclínica e associadas à presença de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. e a associação de ambos microrganismos

São Paulo
2010

ANNA CATHARINA MAIA DEL GUERCIO VON SYDOW

Comparação entre a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) e contagem de células somáticas (CCS) de leite proveniente de glândulas mamárias de bovinos com mastite subclínica e associadas à presença de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. e a associação de ambos microrganismos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Nilson Roberto Benites

São Paulo
2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2299
FMVZ

Von Sydow, Anna Catharina Maia Del Guercio

Comparação entre a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) e contagem de células somáticas (CCS) de leite proveniente de glândulas mamárias de bovinos com mastite subclínica e associadas à presença de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. e a associação de ambos microrganismos / Anna Catharina Maia Del Guercio Von Sydow. -- 2010.

65 f.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Roberto Benites.

1. Mastite. 2. *Staphylococcus* spp. 3. *Streptococcus* spp. 4. CCS. 5. UFC. I. Título.



Comissão de Ética no uso de animais

PARECER

Interessado: Anna Catharina Maia Del Guercio Von Sydow

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo analisou o projeto protocolado sob o número 1956/2010, intitulado: "Comparação entre a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) e contagem de células somáticas (CCS) de leite proveniente de glândulas mamárias de bovinos com mastite subclínica e associadas à presença de *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus spp.* e a associação de ambos microorganismos", no qual foram utilizadas 80 amostras de leite de vacas primíparas e múltiparas holandesas ou mestiças, em diferentes estágios de lactação, pertencentes a plantéis de propriedades de exploração leiteira localizadas no Estado de São Paulo, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, e constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de ética adotados por esta Comissão.

São Paulo, 14 de junho de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: VON SYDOW, Anna Catharina Maia Del Guercio

Título: Comparação entre a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) e contagem de células somáticas (CCS) de leite proveniente de glândulas mamárias de bovinos com mastite subclínica e associadas à presença de *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus spp.* e a associação de ambos microrganismos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe, irmã, filhos e marido, familiares e amigos que me deram apoio e incentivo ao longo de todos esses anos, contribuindo direta ou indiretamente, para conclusão deste trabalho, com sua paciência, idéias, compreensão e abnegação pelos momentos de ausência.

Aos animais em geral que com sua infinita beleza, pureza e simplicidade sempre nos mostram quão bela é a natureza e o quanto devemos lutar por ela.

AGRADECIMENTOS

Ao meu amigo e orientador, Prof. Dr. Nilson Benites, que soube como poucos transmitir seus conhecimentos, sabedoria e experiências de vida e profissional.

À Dra. Priscilla, pelo apoio, incentivo e carinho, que soube como me ajudar nos momentos difíceis dessa jornada.

A todos os meus colegas do Laboratório de Doenças Infecciosas pelo apoio, carinho e incentivo constantes. Aos Professores da FMVZ e demais unidades da USP que souberam transmitir seus conhecimentos com entusiasmo e dedicação.

Ao CNPq pelo apoio ao nosso projeto.

RESUMO

VON SYDOW, A. C. M. DEL G. **Comparação entre a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) e contagem de células somáticas (CCS) de leite proveniente de glândulas mamárias de bovinos com mastite subclínica e associadas à presença de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. e a associação de ambos microrganismos.** [Comparison between the amount of colony forming units (CFU) and the body cells count (BCC) from milk taken from bovines mammary glands, suffering from subclinical mastitis, associated to the presence of *Staphylococcus* spp and *Streptococcus* spp. as well as the association of both microorganisms]. 2010. 65 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A mastite é uma doença complexa que pode ter diferentes causas, graus de intensidade e variações de duração e de conseqüências. Os processos inflamatórios na glândula mamária são especialmente freqüentes e importantes em bovinos leiteiros. A mastite infecciosa é a mais importante sob os pontos de vista econômico e de saúde pública. A forma subclínica é a mais onerosa e prevalente com um comprometimento mundial de 40% do rebanho leiteiro e perdas econômicas entre 5% e 25% da produção leiteira. No Brasil, a mastite subclínica caracteriza-se pela alta incidência, com índices variando de 44,88% a 97,0%, e a redução da produção leiteira situa-se entre 25,4% e 43,0%. Dentre os agentes etiológicos mais isolados em casos de mastite subclínica destacam-se os *Staphylococcus* spp., os *Streptococcus* spp. e o *Corynebacterium bovis*. A quantidade de UFC/mL no leite proveniente diretamente da glândula mamária bovina com infecção permitiria o conhecimento da quantidade de microrganismos associada a uma determinada intensidade de processo inflamatório na glândula. A comparação destas informações com a contagem de células somáticas na amostra avaliaria mais acuradamente a natureza do processo inflamatório e infeccioso na glândula. Importante seria o risco que representa a presença de microrganismos no leite, sobretudo se considerar o hábito do consumo de leite “in natura”, verificando em um estudo quantitativo desta natureza, a carga microbiana ingerida pelo homem. Foram examinadas 80 amostras de leite de vacas mestiças ou holandesas, primíparas e múltiparas, em diferentes estágios de lactação de plantéis do Estado de São Paulo. Quatro grupos foram formados de 20 animais cada: grupos com crescimento negativo, de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. em cultura pura e grupo com a associação de ambos microrganismos. O objetivo deste trabalho consistiu em avaliação comparativa da quantidade de UFC/mL de microrganismos e CCSs no leite proveniente de glândulas mamárias bovinas, associadas com a presença dos microrganismos *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. e infecções mistas ocorridas com a presença de ambos. Tanto *Staphylococcus* spp. (mediana = 4,772), quanto *Streptococcus* spp.

em cultura pura (mediana = 5,933), não apresentam diferenças significativas na contagem de UFC com seus respectivos agentes em associação (*Staphylococcus* spp. com mediana da associação foi de 5,048 e mediana de *Streptococcus* spp. da associação foi de 5,792). Nas amostras em que houve crescimento de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. associados, a quantidade de UFC de *Streptococcus* spp. foi estatisticamente maior. Comparados entre si (crescimento em cultura pura de *Staphylococcus* spp. com mediana = 5,765 e *Streptococcus* spp., mediana = 5,920), mesmo apresentando um maior número na CCSs no grupo de crescimento de *Streptococcus* spp., este aumento não foi significativo estatisticamente. Porém, quando associados (mediana = 5,673), comparados à cultura pura de *Staphylococcus* spp. (mediana = 5,765), este último teve aumento significativo. Tanto em cultura pura como em associação, a presença dos microrganismos quando comparados, não induziram a um aumento significativo na CCSs ou à contagem de UFCs em amostras de leite com sinais de mastite subclínica, porém *Staphylococcus* spp. induziu maior contagem de células somáticas.

Palavras-chave: Mastite. *Staphylococcus* spp. *Streptococcus* spp. CCS. UFC.

ABSTRACT

VON SYDOW, A. C. M. DEL G. **Comparison between the amount of colony forming units (CFU) and the somatic cells count (SCC) from milk taken from bovines mammary glands, suffering from subclinical mastitis, associated to the presence of *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. as well as the association of both microorganisms.** [Comparação entre a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) e contagem de células somáticas (CCS) de leite proveniente de glândulas mamárias de bovinos com mastite subclínica e associadas à presença de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. e a associação de ambos microrganismos]. 2010. 65 f. (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Mastitis is a complex disease that can occur due to different causes, intensity of degrees and variation of duration and consequences. The inflammatory processes in the mammary gland are specially frequent and important in dairy producing cattle. The infectious mastitis is the most important because of the economic aspects and public health. The subclinical manifestation is the most expensive and prevailing affecting 40% of the milk producing herd and causing an economic loss between 5% and 25% of all dairy production. In Brazil, the subclinical mastitis is characterized by high incidence, with indexes varying from 44,8% to 97,0 % with the reduction of milk production between 25,4% and 43%. Among the more isolated etiological agents in subclinical mastitis, is the *Staphylococcus* spp., the *Streptococcus* spp. and the *Corynebacterium bovis*. The amount of CFU/mL in the milk directly originated from the infected cow mammary gland would make possible to know the amount of microorganisms associated to a determined intensity of inflammatory process in the gland. The comparison between this information with the number of body cells in the sample would evaluate more precisely the nature of the inflammatory process in the gland. The risk represented by the presence of microorganisms in the milk is very important mainly because of the habit of milk consumption “in natura”, checked in a quantitative study of this nature, based on the amount of microbes intake by man. Eight milk samples of half-breed cows and Dutch cows were examined as well as those in first or after various calving, in different lactation stages in breeding stocks in São Paulo State. Four groups were organized, with 20 animals in each with negative *Staphylococcus* spp. growth and *Streptococcus* spp. in pure culture and group, with the association of both microorganisms. The purpose of this study is the comparative assessment of the amount of CFU/mL of microorganisms and CCSs in the milk from the mammary bovine glands, associated with the presence of microorganisms *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. and a mixed infection that occurred

with the presence of both. The *Staphylococcus* spp. (median = 4,772) as well as the *Streptococcus* spp. in pure culture (median= 5,933) did not show significant differences in the CFU count, with their respective agents in association (*Staphylococcus* spp. with median of association was of 5,048 and median of *Streptococcus* spp. of the association was of 5,792). On the samples in which there was a growth of *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. associated, the amount of CFU of *Streptococcus* spp. was statistically larger. Compared between themselves (growth in pure culture of *Staphylococcus* spp., median = 5,920, this increase wasn't statistically significant. Although when associated (median=5,673), compared to the pure culture of *Staphylococcus* spp. (median=5,765), the latter had a significant increase. In pure culture as well as in association, the presence of microorganisms when compared to a significant increase in CCSs or to the CFUs count in milk samples with indication of subclinical mastitis, but the *Staphylococcus* spp. induced a larger count of somatic cells.

Key words: Mastitis. *Staphylococcus* spp. *Streptococcus* spp. SCC. CFU.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Comparação na CCSs (contagem de células somáticas) em leite de glândula mamária de vacas em lactação, de rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo, em logarítimo, apresentando cultura pura de *Staphylococcus* spp., cultura pura de *Streptococcus* spp. *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. em associação..... 44
- Tabela 2 - Comparação de contagem de células PMNs (polimorfonucleares) em leite de glândula mamária de vacas em lactação, de rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo, em logarítimo e porcentagem, apresentando cultura pura de *Staphylococcus* spp., cultura pura de *Streptococcus* spp. *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. em associação..... 46
- Tabela 3 - Comparação da contagem da quantidade de UFC (unidades formadoras de colônias) em leite de glândula mamária de vacas em lactação, de rebanhos do Estado de São Paulo, apresentando cultura pura de *Staphylococcus* spp., cultura pura de *Streptococcus* spp. *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. em associação..... 47

LISTA DE ABREVIATURAS

CCS	contagem de células somáticas
CMT	california mastitis test
HE	Hematoxilina-Eosina
IIM	infecções intramamárias
IL-1	interleucina
ml	mililitro
MN	mononucleares
PMN	neutrófilos polimorfonucleares
UFC	unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVO	39
3	MATERIAL E MÉTODO	40
3.1	Avaliação do “status” microbiológico de amostras de leite de vacas em lactação que apresentaram ou não mastite	40
3.2	Contagem dos microrganismos <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Streptococcus</i> spp. através da contagem de UFC em amostras de leite de vacas em lactação que apresentaram ou não infecção intramamária	41
3.3	Contagem de células somáticas em amostras de leite de vacas em lactação que apresentaram infecções intramamárias subclínicas	41
3.4	Análise estatística	42
3.5	Comparações dos resultados da CCSs e contagem dos microrganismos <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Streptococcus</i> spp. encontrados nos testes microbiológicos das amostras de leite de vacas em lactação que apresentam infecção intramamária	42
4	RESULTADO	43
4.1	Comparação entre os grupos de amostras de leite de vacas em lactação que apresentaram mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas (CCS)	43
4.2	Comparação entre os grupos de amostras de leite de glândula mamária de vacas em lactação que apresentaram mastite subclínica em relação à contagem de polimorfonucleares (PMN)	44
4.3	Comparação entre os grupos de amostras de leite de glândula mamária de vacas em lactação que apresentaram mastite subclínica em relação à contagem de UFC	46
5	DISCUSSÃO	48
6	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

Ao final do século XVIII, considerava-se que as enfermidades da glândula mamária dos bovinos eram causadas por picadas de insetos ou pelo contato com sangue ou com secreções de feridas supuradas. Em 1787, Von Willburg iniciou estudos com bases científicas das doenças da mama, todavia, o empenho dos especialistas estava voltado apenas para a nosologia das moléstias da glândula mamária, não abordando aspectos relacionados à etiopatogenia dessas enfermidades, pois desconhecia-se a existência de microrganismos. O interesse demonstrado por veterinários e criadores de gado leiteiro determinou o início de uma nova era no estudo da patologia da glândula mamária, pela necessidade prática e científica das classificações da mastite (GREGORI et al., 2001). Von Frank, em 1876, foi o pioneiro em pesquisas relativas à etiologia infecciosa das mastites, mas, apesar de ter demonstrado a existência de microrganismos em amostras de leite, colhido de glândulas enfermas, não determinou quais seriam esses agentes etiológicos. No ano de 1910, Poels apresentou a primeira classificação etiológica das mastites. Götze, em 1931, pela primeira vez classificou as mastites obedecendo aos critérios propostos pela Propedêutica Veterinária, isto é, pelo exame do leite e pela avaliação criteriosa das características físicas da mama (volume, deformações, lesões e alterações da consistência, da sensibilidade da mama). Assim sendo, pelas características da glândula e do leite, detectadas por inspeção, palpação dos tetos e dos tecidos constituintes, o mencionado pesquisador classificou as mastites, obedecendo a critérios e princípios clínicos, em três tipos: intersticial, catarral e parenquimatosa. Schalm et al. (1971) classificaram as mastites segundo as suas formas clínicas em quatro tipos: hiperaguda; aguda; subaguda e subclínica. Todavia os critérios mencionados como básicos para a classificação, não se referiam à forma clínica, mas ao tipo de evolução da doença. Na mastite subaguda distinguiriam-se a hiperemia, rubor, calor, dor, edema, alteração da função, além do estado geral do animal estar alterado pela febre. Na mastite aguda os mesmos sinais de inflamação, apesar de atenuados, também com febre e apatia do animal. Permanecendo a perda da função, a mastite seria classificada como subaguda. Nos casos em que houvesse permanência do aumento da celularidade no leite, ocorreria uma mastite denominada subclínica. Nos casos reais de infecção sempre existiriam sinais clínicos evidentes, que poderiam ser detectados no exame clínico, como: diminuição da produção leiteira, pH alcalino do leite, aumento dos teores de cloreto e do número de células somáticas, predominando polimorfonucleares neutrófilos (GREGORI et al., 2001).

No período de 1971 a 1987, a International Dairy Federation (Federação Internacional de Produtores de Leite) apresentou e recomendou uma definição das inflamações da glândula mamária baseada em dois conceitos: avaliação do número de células somáticas e isolamento de patógenos de amostras de leite (GREGORI et al., 2001).

A mastite consiste em processo inflamatório total ou parcial da glândula mamária, acompanhada da redução da secreção de leite e mudança da permeabilidade da membrana dos ácinos, o que ocasiona mudança na sua composição, pode ocorrer como consequência de alterações fisiológicas e/ou metabólicas, traumas, tóxicas, alergias ou, como ocorre mais frequentemente, associada à ação de microrganismos (infeciosa), sendo esta última a mais importante sob os pontos de vista econômico e de saúde pública (COSTA, 1991; COLDEBELLA, 2003; SOUZA et al., 2007). É uma doença complexa que pode ter diferentes causas, graus de intensidade e variações de duração e consequências, consiste em um processo inflamatório da glândula mamária, agudo ou crônico, sendo mais importante nos ruminantes e neles, os agentes etiológicos são predominantemente bacterianos (LANGONI et al., 2000; COSTA, 2003). Apesar do advento da pasteurização, a transmissão de patógenos via leite e seus derivados representa um risco durante as falhas neste processo, principalmente no nicho de mercado de produtos lácteos não pasteurizados. Afirma-se que 44% do leite consumido no Brasil é proveniente do mercado informal, sendo comercializado sem qualquer tratamento térmico ou controle laboratorial. Portanto, a transmissão dos patógenos da mastite e suas toxinas via leite e produtos lácteos corresponde a um risco à saúde do consumidor (MARTINS et al., 2010).

Os processos inflamatórios da glândula mamária sendo especialmente frequentes e importantes em bovinos leiteiros geram prejuízos à pecuária leiteira, pois afetam a produção de leite, principalmente pela redução da capacidade produtiva dos rebanhos infectados, estando entre as doenças de maior importância nos sistemas de exploração pecuária (COSTA, 2003). O leite constitui um meio excelente para a multiplicação de microrganismos patogênicos ao homem, os quais podem ser originados de contaminações pós ordenha e/ou de infecções do próprio animal. A mastite bovina é uma das principais doenças que acometem os rebanhos leiteiros no mundo e levam a perdas econômicas significativas para o setor agropecuário. Também é um problema grave de saúde pública, ao considerar que o leite proveniente de animais portadores da doença apresenta alto grau de contaminação, pode conter enterotoxinas e, principalmente resíduos de antibióticos (SOUZA et al., 2007).

As mastites podem ser classificadas sob o ponto de vista clínico e anátomo-patológico. Uma das formas de classificação é aquela que divide as mastites em clínica e subclínica,

denominações estas que permitem a diferenciação da intensidade do processo inflamatório (BLOOD; RADOSTITS, 1991), sendo estas expressões reconhecidas na área veterinária utilizadas em âmbito internacional.

A mastite subclínica tem grande impacto na produtividade dos rebanhos leiteiros porque sua prevalência é maior que a da forma clínica e, assim, as medidas para seu controle têm recebido grande atenção (BRITO et al., 1997). A invasão da glândula mamária por microrganismos é seguida de um aumento do número de leucócitos no leite, a maioria, neutrófilos polimorfonucleares. Essas células fazem parte dos mecanismos naturais de defesa animal, migram da corrente circulatória para a glândula mamária e são designadas de células somáticas do leite. O principal fator que influencia o aumento de células somáticas no leite é o processo infeccioso. Outros fatores como estágio da lactação, idade do animal, estação do ano e vários tipos de estresse podem influenciar a contagem de células somáticas (CCS) mas não tem tanta importância se não ocorre infecção da glândula mamária (BRITO et al., 1997). Uma outra classificação é aquela montada por Rosenberger et al. (1993), segundo os quais as mastites podem apresentar evolução aguda, superaguda ou crônica, e podem ser classificadas clinicamente em: catarral (geralmente crônica e causada principalmente por cocos), flegmonosa (aguda ou superaguda, causada principalmente por coliformes), apostematosa (crônica, causada principalmente por *Arcanobacter pyogenes*), micótica (aguda ou crônica, causada por fungos) e gangrenosa (superaguda e causada por *Staphylococcus aureus*, coliformes ou clostrídios). A classificação de Jain (1979) e Blood e Radostits (1991) é semelhante à proposta por Rosenberger et al. (1993), sendo que as formas clínicas da mastite podem ser classificadas de acordo com sua severidade em: per-aguda (inflamação severa do quarto com ocorrência de intensa reação sistêmica), aguda (inflamação severa do quarto com discreta reação sistêmica), sub-aguda (inflamação moderada da glândula com alteração persistente das características do leite), crônica (inflamação recorrente com pequena alteração das características do leite).

A mastite clínica caracteriza-se por modificações visíveis no leite como a presença de grumos de fibrina ou pus no mesmo e muitas vezes alterações na glândula mamária como aumento de volume, presença de dor, aumento de temperatura e rubor. A mastite subclínica não apresenta sinais clínicos evidentes, sendo que o leite apresenta aspecto macroscópico normal e não há sinais visíveis de inflamação do úbere, podendo ser detectada somente por provas indiretas com o leite (como o "California Mastitis Test" – CMT), pois se caracteriza somente por aumento da celularidade (BLOOD; RADOSTITS, 1991; ANDREWS, 1992; DU PREEZ; GIESECKE, 1994; SMITH, 1994; COSTA et al., 1995; RIBEIRO et al., 2003). Com

relação ao isolamento bacteriano do leite de vacas com mastite subclínica, observou-se que quanto maior o escore do CMT maior a probabilidade de isolamento de agentes (BARBALHO; MOTA, 2001).

A mastite subclínica pode ser detectada pela contagem direta ou indireta de células somáticas no leite. Estas são compostas basicamente por dois tipos de células principais: células de descamação do epitélio secretor e leucócitos de origem do sangue, sendo que estas se apresentam com elevadas concentrações nos casos de mastite (RIBEIRO et al., 2003).

Os métodos de diagnóstico da mastite subclínica incluem exames microbiológicos, métodos químicos indiretos e a CCS (contagem de células somáticas) do leite dos quartos mamários individuais, dos animais ou do rebanho. A mastite infecciosa subclínica é aquela que apresenta resultado positivo aos testes de CMT (California Mastitis Test), ou outros testes indicativos, sendo confirmada pelo crescimento microbiano (BRITO et al., 1997). O CMT é um dos testes mais usuais para o diagnóstico da mastite subclínica, sendo um indicador indireto da contagem de células somáticas no leite. No caso das formas clínicas, o diagnóstico é realizado pelo uso da caneca de fundo preto ou telada onde visualizam-se as alterações macroscópicas do leite (RIBEIRO et al., 2003).

A forma subclínica é a mais onerosa e prevalente com um comprometimento mundial de 40% do rebanho leiteiro e perdas econômicas entre 5% e 25% da produção leiteira. A diversidade de fatores envolvidos e o fato de a forma subclínica ser mais frequente dificultam o controle e a erradicação da doença (SOUZA et al., 2007). Um quarto de úbere infectado pode reduzir a produção de 10% a 12% na mesma lactação. Se a infecção ocorrer no período seco, a perda pode chegar a 40% no potencial do quarto na lactação seguinte. O controle da mastite não só tem importância devido a grandes perdas econômicas para o produtor e para a indústria láctea, como também para o consumidor, pois ocorre perda da qualidade nutritiva e higiênica do leite (LANGONI et al., 2000).

No Brasil, a mastite subclínica caracteriza-se pela alta incidência, com índices variando de 44,88% a 97,0%, e a redução da produção de leite situa-se entre 25,4% e 43,0%. Vários levantamentos realizados a partir de 1970, indicam altos índices variando de 11,9% a 72,3% de vacas infectadas por rebanho. Este resultado é preocupante, já que a forma subclínica é responsável pelas maiores perdas na produção leiteira (COLDEBELLA, 2003; RIBEIRO et al., 2003).

Além da diminuição na produção, observa-se perda da qualidade do leite e da função do parênquima glandular, tornando o úbere uma reserva de patógenos. O animal não apresenta alterações visíveis na glândula, porém o leite apresenta alta contagem de células somáticas

(CCS). Essas infecções, além de contribuírem com significativas perdas econômicas, podem ser consideradas como um problema sério para a saúde pública (REIS; SILVA; BRESCIA, 2003).

Antunac et al. (1997) relata a ligação direta entre as perdas econômicas causadas pela mastite (do grego *mastos*) ou mamite (do latim *mammae*) (ALMEIDA et al., 2004), com propriedades físicas, químicas e organolépticas do leite, a propriedade de coagulação (importante na indústria de produtos lácteos), valores de pH, higiene do produto e também presença de antibióticos no leite.

Segundo Araújo (1994), a mastite é uma doença que causa grande prejuízo à pecuária leiteira no Brasil, particularmente no Estado de São Paulo, pois seus sintomas determinam a redução da qualidade do leite produzido e alterações de suas características, tornando-o impróprio para o consumo e a industrialização. Em vista disso, a produção de leite em boas condições higiênicas deve ser uma das principais metas de todos os segmentos profissionais que atuam na pecuária leiteira visando proporcionar um alimento de alto valor nutritivo, reduzindo o risco de se veicular agentes nocivos à saúde do consumidor. O Brasil ocupa hoje o sétimo lugar na produção mundial de leite. O crescimento da competitividade nacional, aliado ao interesse de o País inserir-se no mercado internacional de lácteos, tem estimulado as indústrias a buscarem novas tecnologias para melhorar a qualidade de seus produtos, a redução dos custos e um maior rendimento industrial (SOUZA et al., 2007). Um aspecto importante a se considerar está diretamente relacionado com as condições precárias de higiene dos animais, instalações e ambiente onde é realizada a ordenha, com alta prevalência das mastites subclínicas, que ocorrem com mais frequência que a mastite clínica e causam grandes prejuízos econômicos devido à queda na produção de leite pela atrofia do epitélio secretor glandular (BARBALHO; MOTA, 2001).

Lightner et al. (1988) relacionaram os fatores que determinam as perdas causadas pela mastite: redução na produção leiteira, descarte de leite, aumento da necessidade de reposição de matrizes, decréscimo no valor de venda dos animais, custos com assistência veterinária e medicamentos e aumento na necessidade de mão-de-obra.

Segundo Costa (1998), uma das principais causas da redução da produção leiteira é determinada pela mastite, sendo o prejuízo estimado nas propriedades leiteiras brasileiras em torno de US\$332/vaca/ano. Este índice supera a média observada em outros países, como por exemplo, nos Estados Unidos da América, aonde a média anual chega a US\$200/vaca. O custo com a prevenção da mastite subclínica é estimado em US\$14,50/vaca/ano nos rebanhos americanos (MILLER et al., 1993). No entanto, o Brasil gasta quase o dobro deste valor,

cerca de US\$24,55/vaca/ano para esta mesma enfermidade (COSTA, 1998). Coldebella (2003), relata que as perdas mundiais causadas por esta doença chegam a 35 bilhões de dólares por ano, e estima que somente nos Estados Unidos os prejuízos anuais são da ordem de 2 a 4 bilhões de dólares.

A patogênese dos diferentes tipos de mastite infecciosa leva a diferentes respostas desenvolvidas pela glândula mamária, as quais são determinadas tanto pelas características intrínsecas ao agente como pela capacidade de defesa do tecido mamário (PATTISON, 1958). O estabelecimento dos microrganismos na glândula mamária e o consequente desencadeamento do processo inflamatório apresenta a seguinte sequência de eventos: penetração - instalação - multiplicação. Portanto, o estabelecimento de infecção por um determinado patógeno na glândula mamária depende de vários fatores ligados ao microrganismo, ao hospedeiro, ao meio ambiente.

Entre os fatores ligados aos microrganismos, fatores de virulência, destaca-se o fato de que multiplicam-se bem no leite, habilidade de aderir ao epitélio, presença de cápsula que dificultaria a fagocitose. A epidemiologia da mastite varia consideravelmente dependendo da espécie, quantidade, patogenicidade e infectividade do agente envolvido e há evidências de que os fatores de risco diferem conforme essas características (COSTA, 1998; PRESTES; FILAPPI; CECIM, 2002). O leite é um ótimo meio para desenvolvimento de microrganismos. Apesar da grande variedade de agentes infecciosos isolados a partir da glândula mamária, existem alguns que podem ser predominantes, como é o caso dos estafilococos e estreptococos (ZAFALON, 2005).

Os microrganismos que comumente causam mastite podem ser divididos em dois grupos baseados na sua origem: patógenos contagiosos e patógenos ambientais. Na mastite contagiosa a transmissão ocorre principalmente durante a ordenha de animal para animal, que possui como reservatório o próprio animal e sua localização é intramamária. O grupo dos microrganismos contagiosos assume importância, compreendendo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, seguidos por *Corynebacterium bovis*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Mycoplasma* sp. e uma série de patógenos “menores” envolvidos geralmente em infecções subclínicas de menor severidade. Os *Staphylococcus* frequentemente causam mastite e são encontrados colonizando a pele da glândula mamária, tetos e lesões nessas áreas, porém, quartos mamários infectados são o principal reservatório desses microrganismos, sendo transmitido por qualquer forma de contato. Os *Streptococcus agalactiae* são os microrganismos melhor adaptados à glândula mamária, raramente são encontrados fora dela; geralmente estão envolvidos em doenças clínicas agudas e infecções subclínicas persistentes.

Os *Streptococcus dysgalactiae* estão envolvidos com lesão nos tetos, sendo comumente associado à mastite no período seco (COSTA, 1998; FILAPPI; CECIM, 2002; SOUZA et al., 2007). Langoni (2000) relata que a mastite contagiosa é aquela causada por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* ou *Corynebacterium bovis*, cujo habitat preferencial é o interior da glândula mamária. Seu controle é mais fácil, e é realizado através de medidas higiênicas durante o processo de ordenha.

O ambiente é definido como a associação de condições físicas externas que afetam e influenciam no crescimento, desenvolvimento e sobrevivência de um organismo ou grupo de organismos. É no ambiente que se origina o segundo grupo de patógenos envolvidos nas infecções intramamárias, geralmente bactérias Gram-negativas, incluindo *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Streptococcus uberis*, *Enterobacter sp.* e outros patógenos predominantemente oportunistas (*Pseudomonas sp.*, *Prototheca sp.*, *Nocardia sp.*, etc), que adentram a glândula mamária quando os mecanismos de defesa estão comprometidos. Esses microrganismos requerem materiais orgânicos como alimento, nestas condições alguns materiais utilizados como cama para os animais promove um ambiente propício para propagação (PRESTES; FILAPPI; CECIM, 2002; SOUZA et al., 2007). Enquanto que Langoni (2000) apresenta a mastite ambiental como aquela ocasionada por agentes que compartilham o mesmo ecossistema da vaca, tais como: solo, piso cama, esterco e materiais orgânicos. Dentre eles destacam-se a *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp.*, estafilococos coagulase – negativos, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*. A contaminação dos animais por esses microrganismos, embora possa ocorrer durante o processo de ordenha (normalmente por falhas no funcionamento do equipamento), acontece principalmente entre ordenhas.

As bactérias envolvidas na etiologia da mastite também podem ser classificadas em patógenos maiores e menores. Na primeira categoria estão incluídas as bactérias capazes de ocasionar CCS superiores, além de alterações consideráveis na composição do leite, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, coliformes, estreptococos, enterococos. Estafilococos coagulase negativos e *Corynebacterium bovis* são considerados patógenos menores e causam inflamação moderada e CCS de no máximo duas a três vezes superior a dos quartos mamários sadios (SOUZA et al., 2007).

O equipamento de ordenha e o ato em si sejam mecânico ou manual, pode influenciar direta ou indiretamente na saúde da glândula mamária. Os aspectos negativos envolvidos nesse processo e que podem influenciar na susceptibilidade à mastite compreendem: 1. facilidade de transmissão de patógenos entre vacas e no mesmo animal pela inadequada

preparação da glândula para a ordenha (lavagem e secagem) e da ordenhadeira (copos coletores com superfície interna contaminada; 2. pelas possíveis flutuações no sistema de vácuo da ordenhadeira, facilitando a difusão de microrganismos entre os quartos mamários; incrementam a penetração de microrganismos no canal da teta devido ao “mecanismo de impacto”, no qual há movimento reverso do leite; propensão à exposição do orifício e canal da teta aos patógenos, uma vez que pode modificar as condições da teta (eversão do orifício, microlesões e vesículas hemorrágicas; alguns germicidas podem ter efeitos irritantes sobre a pele das tetas, resultando nesses casos em elevação na colonização por patógenos. (PRESTES; FILAPPI; CECIM, 2002).

Características do úbere, como tamanho, forma e tamanho dos tetos e tonicidade dos ligamentos, a integridade e perfeita oclusão dos canais do teto, sendo o orifício do teto a principal porta de entrada de patógenos são fatores anatômicos determinados pela herança genética. Os mecanismos podem ser não imunológicos (inespecíficos) ou imunológicos. O primeiro deles, está constituído por uma barreira física que inclui canal e esfíncter da teta, os quais possuem propriedades defensivas como um mecanismo de oclusão relativamente eficiente, a roseta de “Furtenberg’s” e ainda, proteínas bactericidas. Após a ordenha o canal do teto torna-se dilatado e permanece assim por aproximadamente duas a quatro horas e, neste caso, o diâmetro e comprimento do canal do teto influenciam na susceptibilidade à mastite, pois um canal curto facilita a saída de fluídos, porém diminui a resistência às infecções intra mamárias. Um mecanismo adicional de defesa do teto, é o seu revestimento por uma camada de queratina (composta por células epiteliais descamadas, ácidos graxos e proteínas catiônicas). Há evidências de que a queratina tenha função de adsorver as bactérias, prendendo-as e removendo-as juntamente com parte da camada de queratina durante o processo de ordenha. A segunda linha de defesa glandular, está constituída pelo sistema imunológico, o qual envolve imunidade celular e humoral. A primeira é conferida pelos leucócitos que são células efetoras do sistema imune. Os tipos leucocitários incluem: granulócitos (neutrófilos polimorfonucleares- PMN, basófilos e eosinófilos): fagócitos que ingerem e destroem materiais estranhos; contém enzimas hidrolíticas e outras antibacterianas, linfócitos (células T e células B): as células T possuem em sua superfície uma estrutura de reconhecimento capaz de distinguir determinantes antigênicos. Existem dois tipos de linfócitos T, os indutores e os citotóxicos. Os linfócitos T indutores participam na resposta inflamatória por produzir citocinas, em resposta ao estímulo antigênico e induzem a diferenciação dos linfócitos B. As células B atuam na síntese local de imunoglobulinas; monócitos (mononucleados): também denominados de macrófagos. São importantes na

iniciação de respostas imunes celulares e humorais, além de atuarem na fagocitose de células estranhas. A fagocitose é um processo complexo, através do qual os PMN produzem, quando estimulados, interleucina (IL-1) e mediadores lipídicos, sendo estrategicamente posicionados nos locais de defesa primários, como os ductos alveolares (COSTA, 1998, PRESTES; FILAPPI; CECIM, 2002). Os neutrófilos (polimorfonucleares, PMN) são o tipo celular predominante nos tecidos e nas secreções mamárias no início da inflamação e podem constituir 90% do total de leucócitos na glândula, permanecendo numerosos também nos processos crônicos. Durante a mastite ou a involução da glândula, são as primeiras células a adentrar nos alvéolos, porém atuam por curtos períodos, tendo em vista que sua meia-vida é curta. Os neutrófilos migram da circulação sanguínea para a glândula em resposta a uma grande variedade de mediadores inflamatórios, mas principalmente em resposta às citocinas (CARNEIRO, DOMINGUES,VAZ, 2009).

Traumas externos como cortes e ferimentos; leite retido no úbere, em consequência de ordenha incompleta, e que por ser um excelente meio de cultura propicia a multiplicação de microrganismos; animais mais idosos possuem maior predisposição para desenvolver a doença; doenças infecciosas provocam queda de resistência orgânica nos animais e ainda, condições ambientais, nutrição e funcionamento inadequado da ordenhadeira mecânica influenciam o desempenho dos mecanismos naturais de defesa. Vacas que parem no verão produzem menos leite no início da lactação, mas têm menores decréscimos de produção após o pico. É o efeito do estresse calórico se manifestando, pois as vacas paridas no verão sofrem com as condições ambientais desfavoráveis (temperatura, principalmente) no início da lactação, produzindo menos leite, e na maioria das vezes terminam a lactação no inverno, período mais favorável para a produção de leite, O estresse térmico compromete a resposta imune, por exemplo, interfere com a migração dos PMN para o foco de infecção, a glândula infectada, e os linfócitos B, secretam menos anticorpos. Também deficiências em alguns minerais e vitaminas comprometem o desempenho da resposta imune, itens relacionados à sanidade e ao estado nutricional do animal (COSTA, 1998; SOUZA, 2007).

Em consequência da doença, ocorrem alterações no tecido glandular e distúrbios funcionais. Em função do aumento da permeabilidade vascular, os produtos da inflamação são repassados ao leite e alteram sua composição e aparência. O epitélio alveolar danificado pela inflamação ou pela pressão da inflamação adjacente passa a secretar menor quantidade de leite (SOUZA et al., 2007). Na forma subclínica, ocorrem alterações na composição do leite e deste são isolados microrganismos patogênicos. A invasão da glândula mamária por microrganismos é seguida de um aumento do número de leucócitos no leite ou glóbulos

brancos do sangue, a maioria, neutrófilos polimorfonucleares. Estas células fazem parte dos mecanismos naturais de defesa do animal, migram da corrente circulatória para a glândula mamária também células epiteliais da glândula e são designadas de células somáticas do leite. O principal fator que influencia o aumento das células somáticas no leite é o estado infeccioso. Outros fatores podem influenciar a contagem de células somáticas (CCS) como estágio da lactação, idade do animal, estação do ano, nutrição do animal e vários tipos de estresse mas não tem tanta importância se não ocorre infecção da glândula mamária (BRITO et al., 1997, SOUZA et al., 2007). O desencadeamento da mastite está vinculado à complexa tríade: animal hospedeiro, ao agente etiológico e/ou ao meio ambiente, fazendo desta uma enfermidade multifatorial. Como tal, a sua prevenção e controle dependem do conhecimento dos padrões de ocorrência da doença, que só se torna possível, através de um estudo epidemiológico da situação. Os fatores determinantes que influenciam na susceptibilidade à mastite incluem: resistência natural da glândula mamária; estágio da lactação; hereditariedade; idade do animal; espécie, infectividade e patogenicidade do agente etiológico; ordenha; manejo; clima e nutrição (PRESTES; FILAPPI; CECIM, 2002).

A etiologia da mastite é complexa e multivariada o que torna necessária a identificação dos microrganismos que causam a infecção da glândula mamária, tanto para o controle e prevenção, quanto para o monitoramento de rebanhos (RIBEIRO et al., 2003).

Mais comumente, a mastite tem início como consequência da penetração de microrganismos através do canal do teto em direção ao interior da glândula mamária. Se o ambiente interno da glândula é favorável ao estabelecimento e multiplicação dos agentes invasores, os produtos oriundos do crescimento bacteriano e de seu metabolismo ocasionam uma resposta inflamatória, a qual constitui uma expressão da defesa da glândula com o objetivo de destruir o invasor, permitir a reparação do tecido e seu retorno ao funcionamento normal (SCHALM; CARROLL; JAIN, 1971).

O resultado final de uma invasão da glândula mamária por um microrganismo pode ser o aumento da celularidade no leite e nos tecidos, involução, fibrose, necrose ou gangrena. Entretanto, o processo patológico progressivo envolvido na produção destes resultados ainda é pouco compreendido. Como, porque e a velocidade que estas alterações ocorrem na glândula e quais os fatores que controlam a duração e severidade da reação inflamatória, são questões ainda não totalmente esclarecidas (PATTISON, 1958).

A produção do leite cai como resultado do tecido secretor da glândula mamária ter sido prejudicado, e também ocorrem mudanças marcantes nos níveis de gordura, proteína, lactose, caseína, sólidos totais, constituintes do leite. Essas mudanças são reflexos do grau de

prejuízo causado às células secretoras e ao complexo de capilares sangüíneos da glândula, e podem afetar o rendimento industrial e a qualidade do produto lácteo, prejudicando, assim, a indústria e o consumidor, além do produtor (PEREIRA et al., 1997). A glândula com mastite subclínica apresenta alteração na composição do leite, com a tendência da mesma em aproximar-se à composição do sangue. O leite de vacas com mastite possui maior teor de sódio, menor concentração de potássio, cálcio e fósforo, um pH maior e também uma menor acidez titulável. Somente em poucos casos as infecções da glândula mamária podem provocar o aparecimento de leite com maior acidez titulável, quando os microrganismos envolvidos são produtores de ácidos (ZAFALON, 2005).

A ocorrência e o tipo de sintomatologia de mastite infecciosa estão relacionados fundamentalmente a patogenicidade do microrganismo e à sua capacidade de invasão tecidual, bem como à resistência da glândula mamária. Estes fatores determinam a severidade dos sintomas, que podem variar desde um aumento na contagem de células sem alterações visíveis do leite, até a formação gradual de fibrose tecidual sem sinais sistêmicos ou então a ocorrência de toxemia grave com sintomas sistêmicos (BLOOD; RADOSTITS, 1991).

A mastite subclínica é diagnosticada por meio da realização de exames microbiológicos, métodos químicos indiretos e CCS do leite dos quartos mamários individuais dos animais ou do rebanho. Os testes devem ser realizados diariamente no momento da ordenha, associados à observação dos sintomas clínicos (SOUZA et al., 2007).

O exame microbiológico é considerado o método padrão para determinação da saúde do úbere e para o diagnóstico da mastite bovina, sendo que o seu principal objetivo é oferecer resultados rápidos e seguros ao veterinário, para que ele possa identificar os problemas do rebanho. Desse modo, medidas específicas de controle direcionadas para o ambiente, ou para a higiene da ordenha, podem ser indicadas de acordo com o padrão de infecção encontrado. O diagnóstico bacteriológico é decisivo, porém caro e mais demorado, sendo pouco aplicável a rebanhos com grande número de animais. Várias simplificações vêm sendo estudadas, visando eliminar estas dificuldades com a utilização de meios de cultura especiais e a criação de esquemas de identificação presuntivo (RIBEIRO et al., 2003).

Langenegger et al. (1981), estudou 70 pares de quartos mamários opostos e concluiu que os quartos com mastite subclínica diagnosticada pelo CMT produziam 25,4% menos leite do que os quartos normais. A reação positiva ao CMT foi relacionada com o exame bacteriológico, onde constatou-se que a intensidade com que a mastite subclínica afeta a produção de leite, em quantidade e qualidade, variou de acordo com a natureza dos agentes etiológicos envolvidos, com duração das infecções e propagação da infecção no rebanho.

Assim sendo, o leite bem como os derivados lácteos contaminados com microrganismos podem se constituir em potenciais vias de transmissão de zoonoses (BADINI, 1995; COSTA et al., 1995; MELVILLE et al., 1999). Por esta razão, é importante atentar para o risco que constitui a presença destes agentes no leite, principalmente quando se considera que, em diversas localidades do Brasil é hábito comum o consumo de leite e produtos lácteos crus.

Sendo a mastite um processo inflamatório da glândula mamária, há uma determinação do aumento da quantidade de leucócitos na glândula acometida. Esta leucocitose pode ser observada no leite. A contagem de células somáticas no leite tem sido um dos melhores métodos para se verificar a intensidade do processo inflamatório nas glândulas mamárias de bovinos (THIERS et al., 1999). Tal contagem é um indicador geral da saúde do úbere. O fator mais importante que interfere na CCS do leite é o “status” da infecção da glândula mamária (LESLIE; DOHOO; MEEK, 1983). A contagem de células somáticas (CCS) no leite é usada no mundo todo como indicador do nível da infecção intramamária e assim usada como um guia na seleção de vacas para cultura e tem sido um dos melhores métodos para verificar a intensidade do processo inflamatório nas glândulas mamárias dos bovinos. O uso da CCS para o monitoramento do úbere saudável e qualidade do leite e o nível da contagem de células somáticas como limiar de separação entre vacas infectadas das não infectadas tem sido extensivamente usado e discutido e usado como detecção de vacas com mastite subclínica (THIERS et al., 1999; PIEPERS et al., 2007). Embora não exista um nível internacional, geralmente o ponto sugerido, baseado na maioria da literatura é 200.000 células /mL. Na Bélgica, por exemplo, a média geométrica de CCS é maior ou igual a 250.000 células/mL, sendo o leite testado diariamente por três meses é usado como limite para detecção de vacas com mastite subclínica (PIEPIERS et al., 2007). Outros países têm adotado limites máximos de células somáticas como parte de seus padrões nacionais de regulamentação, visando preservar a qualidade higiênica do leite, tais como a Nova Zelândia e a Austrália, assim como a União Européia adotam o limite de 400 mil células/mL. No Canadá o limite é de 500 mil células/mL e nos Estados Unidos da América é de 750 mil. No Brasil, a Portaria 56/99 que regulamenta o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite estabelece o limite de 1 milhão de células/mL para 2002, reduzindo para 750 mil, em 2005 e para 400 mil em 2008 (MÜLLER, 2002). No entanto, ocorre uma grande variação no resultado da CCSs, na ausência ou na presença de uma infecção, hora de ordenha, fração do leite, estágio de lactação, idade do animal, tipo de ordenha, intervalo de ordenha, estresse, genética, hora do dia, estação do ano (GRENN et al., 2008).

A CCS no leite inclui a contagem de células de leucócitos de origem do sangue ou glóbulos brancos do sangue e de células epiteliais ou células de descamação do epitélio secretor da glândula mamária. A mastite subclínica pode ser detectada pela contagem direta ou indireta de células somáticas no leite, que se apresentam com elevadas concentrações nos casos de mastite (RIBEIRO et al., 2003; SOUZA et al., 2007). Os leucócitos, em sua maioria, são mobilizados da corrente sanguínea para o tecido mamário diante de alterações na permeabilidade capilar. O aporte destas células se intensifica na quarta semana pré-parto, diminuindo gradativamente até uma semana pós-parto. Na secreção láctea de vacas com infecção intramamária, ocorre um aumento no número de células de defesa passando a predominar neutrófilos, seguidos por macrófagos, linfócitos e o número de células epiteliais permanece inalterado (MULLER, 2002). Portanto, a CCS constitui uma análise relevante para o diagnóstico da mastite subclínica, para estimar perdas quantitativas e qualitativas de produção de leite e derivados, para indicar a qualidade de leite cru e para estabelecer medidas de prevenção e controle da mastite (SOUZA et al., 2007). Costa et al. (2000) constataram que a média de células somáticas no leite de tanque de refrigeração de propriedades leiteiras que apresentaram até 15% de mastite subclínica foi de 90.000 células/mL. Em propriedades com 16 a 30% de mastite subclínica obtiveram média de 245.000 células/mL; nas propriedades em que a porcentagem de mastite subclínica variou de 31% a 45% a média de células no leite do tanque foi de 388.000 células/mL. Quando a porcentagem de mastite subclínica variou de 46% a 60% a média de células somáticas foi de 402.000 células/mL e nas propriedades em que a mastite subclínica variou de 61% a 77%, o número médio de células de 1.145.000 células/mL. As propriedades que apresentaram os maiores níveis de células somáticas por mililitro foram também as que apresentaram os maiores escores de CMT (“Califórnia Mastitis Test”) e os maiores níveis de mastite subclínica.

Animais portadores de mastites subclínicas não apresentam alterações visíveis na glândula, porém o leite apresenta alta contagem de células somáticas, sendo este um dos critérios utilizados para o seu diagnóstico, como também para avaliar a qualidade do leite e as perdas de produção decorrentes das infecções da glândula mamária (REIS; SILVA; BRESCIA, 2003). Em 1910, Prescott e Breed desenvolveram um método para determinação da quantidade de células no leite, baseando-se na microscopia óptica direta, utilizando esfregaços de leite fixados e corados em lâminas. A contagem celular por este método é realizada por um profissional especializado (THIERS et al., 1999). Este método tem importância na estimativa de quantidade de células e não na determinação do número absoluto das mesmas. Desde então, modificações do método foram introduzidas para servir às

necessidades específicas dos pesquisadores, alterações estas que nem sempre contribuíram para aumentar a acurácia do método (SCHALM; CARROLL; JAIN, 1971). No entanto, atualmente com o auxílio de contadores eletrônicos é possível detectar-se rápida e eficientemente o número de células em uma suspensão, mas somente pode-se obter o resultado após alguns dias da colheita do material (THIERS et al., 1999).

O “California Mastitis Test” ou CMT desenvolvido por Schalm e Noorlander em 1957 (RIBEIRO et al., 2003), é um exame bastante utilizado a campo para diagnóstico de mastite. É um dos testes mais usuais para o diagnóstico da mastite subclínica, sendo um indicador indireto da contagem de células somáticas no leite. Este exame é capaz de detectar a presença de processo inflamatório na glândula mamária através do aumento das células somáticas, principalmente polimorfonucleares (PMN). É um método indireto e por meio dele é determinado o número de células somáticas do leite. Constitui-se numa prova de triagem para detecção de mastite subclínica de fácil execução, sendo indicado para monitorar rebanhos a campo onde observaram que amostras reagentes ao CMT nos graus 1+, 2+ e 3+ concordaram com o exame bacteriológico em 22,4%, 74,4% e 85,6% respectivamente (RIBEIRO et al., 2003, SOUZA et al., 2007). Este consiste na coleta de leite dos quartos mamários, individualmente, em uma bandeja apropriada. A prova baseia-se na reação de um detergente aniônico (alquil-lauril sulfonato de sódio) capaz de emulsionar os lipídios das membranas dos leucócitos presentes no leite, e conseqüentemente, liberar o material presente no núcleo dos mesmos, sendo que o DNA liberado leva à formação de um composto gelificado de intensidade correspondente à quantidade de células presentes. A intensidade da reação produzida pelo CMT é classificada em cinco escores: negativo, traços ou suspeito, 1+, 2+ e 3+. Schalm e Noorlander (1957) referem estes cinco níveis de reação do CMT segundo o grau de positividade e correlacionam com o número de células somáticas: negativo (0 a 200.000 células/mL por leite e 25% de PMN), traço ou suspeito (150.000 a 400.000 células/mL por leite, com 30 a 40 % de PMN), 1+ (300.000 a 1.000.000 células/mL por leite com 40 a 60% de PMN), 2+ (700.000 a 2.000.000 células/mL por leite com 60 a 70% de PMN) e 3+ (com mais de 2.000.000 células/mL por leite, com 70 a 80% de PMN).

Segundo Scheppers et al. (1997), quando a contagem de células é inferior a 100.000 células/mL, considera-se ausência de processo inflamatório na glândula mamária. Quando este valor está entre 200.000 a 500.000 células/mL, é recomendável o exame microbiológico para elucidar a situação. Por sua vez, quando a contagem é superior a 500.000 células/mL, considera-se a presença de processo inflamatório, não se podendo afirmar ser o mesmo de natureza infecciosa.

Thiers (1998) ao correlacionar a contagem de células somáticas com o teste de CMT observou que quantidade de células associadas à reação de CMT negativo e traços correspondeu respectivamente a 40.000 e 100.000 células/mL de leite e, quando a reação foi positiva 1+, que corresponde à presença de processo inflamatório, a contagem média foi de 219.000 células/mL de leite. Pode-se considerar, na prática, que contagens acima de 200.000 células/mL são indicativas de presença de processo inflamatório na glândula mamária.

A contagem de células totais no leite reflete a quantidade de glândula mamária envolvida no processo inflamatório, enquanto que a contagem de neutrófilos reflete o estágio da inflamação. Uma elevada contagem total (por exemplo, 10^6 /mL) e uma alta proporção de PMN neutrófilos (por exemplo, 90%), indicam a presença de uma inflamação aguda. Por outro lado, uma baixa contagem total (por exemplo, 500.000/mL) e uma baixa proporção de PMN neutrófilos (por exemplo, menos de 40%) podem indicar uma lesão crônica (BLOOD; RADOSTITIS, 1991).

As contagens elevadas de células somáticas demonstram a presença de mastite no rebanho. Tendo em vista que a maioria dos casos de mastite é de natureza infecciosa, tem-se que a presença de processo inflamatório na glândula mamária pode ser indicativa de presença de microrganismos no leite. O leite de uma glândula mamária perfeitamente sadia não deveria conter células somáticas, tendo em vista que a glândula não é holócrina. Entretanto, tal leite dificilmente poderia ser encontrado, sendo universalmente aceita a presença de certa quantidade de células somáticas no leite. Diversos pesquisadores propuseram uma quantidade máxima de células/mL no leite de glândulas normais, que varia de 50.000 a 1.500.000/mL (SCHALM; CARROLL; JAIN, 1971).

Os neutrófilos (polimorfonucleares, PMN) são o tipo celular predominante nos tecidos e nas secreções mamárias no início da inflamação e podem constituir 90% do total de leucócitos na glândula, permanecendo numerosos também nos processos crônicos. Durante a mastite ou a involução da glândula, são as primeiras células a adentrar nos alvéolos porém atuam por curtos períodos, tendo em vista que sua meia-vida é curta (SORDILLO et al., 1997). Os neutrófilos migram da circulação sanguínea para a glândula em resposta a uma grande variedade de mediadores inflamatórios, mas principalmente em resposta às citocinas.

A determinação de UFC/mL (unidades formadoras de colônias por mililitro) de leite indica a quantidade de microrganismos que apresentam capacidade de se multiplicar neste meio. Uma quantidade elevada de UFC/mL em amostras oriundas de tanques de refrigeração de leite pode estar relacionada à contaminação em uma ou mais etapas do processo de ordenha do leite e/ou à presença de microrganismos no interior das glândulas mamárias, no

caso dos animais apresentarem infecção intramamária.

Alguns estudos referem à utilização de diferentes critérios para determinação de infecção intramamária baseados em contagem de unidades formadoras de colônias de microrganismos no leite sem, entretanto, descrever o modo como foram estabelecidos ou definidos estes critérios (HOGAN et al., 1990; OLIVER et al., 1990; ROBERSON et al., 1994; SCHEPERS et al., 1997). Outros estudos, por sua vez, têm sido realizados com intuito de avaliar as alterações nas contagens de células somáticas como indicadores de infecções intramamárias (McDERMOTT et al., 1982; DOHOO et al., 1991; BERNING; SHOOK, 1992; SCHEPERS et al., 1997).

Embora o exame microbiológico do leite do tanque ofereça vantagens, é importante salientar que ele não substitui o exame de animais ou quartos mamários individuais no diagnóstico das infecções intramamárias. Pode ser considerado um instrumento útil para a monitoração de programas de controle de mastite, mas os resultados obtidos não podem ser usados para prever o número de quartos mamários infectados no rebanho, e culturas negativas não oferecem a garantia da ausência dos agentes contagiosos da mastite (BRITO et al., 1998).

Farnsworth (1992) refere que a cultura das amostras do tanque de expansão é um procedimento impreciso e que uma variedade de fatores (tamanho do rebanho, colheita da mesma amostra por mais de um dia, diluição dos microrganismos no tanque, falhas no sistema de resfriamento do tanque) influenciam no isolamento bacteriano e na interpretação dos resultados. O mesmo autor aconselha combinar a cultura do tanque com outras informações, tais como a contagem de células somáticas do tanque e/ou a cultura individual dos tetos das vacas nas fazendas visitadas para se ter uma melhor indicação da etiologia das mastites nos rebanhos com o mínimo de erros.

A identificação de patógenos da mastite é feita geralmente por testes bioquímicos com as bactérias isoladas. Métodos microbiológicos convencionais tem sido os principais para identificar a bactéria no leite. A identificação da bactéria nos laboratórios clínicos é frequentemente baseada em análises de características fenotípicas utilizando testes bioquímicos, sorotipagem e perfil enzimático. Vantagens associadas a métodos de cultura convencional podem identificar a bactéria como agente causal de mastite e suscetibilidade antimicrobiana podem estar trazendo informações para seleção de antibióticoterapia apropriada. No entanto, há muitas desvantagens associadas com os métodos microbiológicos tradicionais. Uma cultura negativa pode ser resultado de resíduo de antibiótico depois de uma terapia ou de um baixo número de patógenos na amostra. A presença de leucócitos no leite de

casos de mastite clínica pode também resultar em cultura negativa. Métodos frequentes de identificação de patógenos da mastite consomem tempo; a identificação da maioria dos patógenos por métodos – padrão requerem mais do que 48 horas para completar. Inadequadas detecção de patógenos ou técnica de confirmação, tem frequentemente demorado na intervenção no controle da doença (GULLIESPE; OLIVIER, 2005).

No entanto, Pyörälä (2003) relata que não existe um sistema de detecção automática realizável, até o presente, para detectar infecção subclínica ou mesmo visualizar um leite anormal. A detecção de mastite subclínica não tem nenhum modelo satisfatório e falsos alertas são tão comuns que as fazendas facilmente deixam de usar os sistemas de detecção automáticos de contagem de células.

A glândula mamária é constantemente exposta a uma grande variedade de microrganismos, mas o desenvolvimento ou não de um quadro de mastite infecciosa depende da natureza do agente, da patogenicidade do mesmo, bem como da susceptibilidade da glândula (DU PREEZ; GIESECKE, 1994). Sua defesa é mediada por diferentes mecanismos inespecíficos e específicos que podem atuar individualmente ou interagir visando à proteção da glândula. A imunidade inespecífica representa a primeira linha de defesa contra os agentes invasores como microrganismos e, quando esta é insuficiente para resolução do processo, os tecidos da glândula mamária podem se adaptar e produzir uma defesa específica a qual, uma vez desenvolvida, tem a característica de memorizar o invasor e permitir uma resposta rápida e eficiente num contato posterior (CRAVEN; WILLIAMS, 1985; ANDREWS, 1992).

Como a etiologia da mastite é complexa e multivariada, torna-se necessária a identificação dos microrganismos que causam a infecção da glândula mamária, tanto para o controle e prevenção, quanto para o monitoramento de rebanhos (RIBEIRO et al., 2003). Os principais microrganismos (agentes etiológicos) de mastite foram convencionalmente classificados quanto à sua origem e modo de transmissão em dois grupos: microrganismos contagiosos ou transmissíveis, transmitidos principalmente durante a ordenha, sendo denominados “vacas-dependentes”, presentes no corpo do animal com ou sem mastite; e os chamados microrganismos ambientais, ubiqüitários, presentes no ar, água, cama e fezes. No primeiro, estão incluídos: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus aureus* e outros estafilococos, *Corynebacterium bovis*, dentre outros. No segundo grupo encontram-se: *Streptococcus uberis* e outros estreptococos, à exceção dos acima citados, bactérias da família Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., entre outras), fungos, algas do gênero *Prototheca* e *Arcanobacter pyogenes* (REBHUN, 1995; COSTA et al., 1998; MÜLLER, 2002).

Os patógenos contagiosos mais importantes na mastite bovina estão *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*. Já entre os patógenos ambientais, destacam-se a *Escherichia coli* e o *Streptococcus uberis* (MENDONÇA et al., 1999).

Dentre os agentes etiológicos mais isolados em casos de mastite subclínica destacam-se os *Staphylococcus* coagulase positivos e coagulase negativos, os *Streptococcus* spp. e o *Corynebacterium bovis* (MENDONÇA et al.¹, 1999 apud RIBEIRO, 2003, p. 290). Segundo Martins et al. (2010) há uma prevalência de 27,6% de *Corynebacterium* spp., 21,5% de *Staphylococcus aureus* e baixa prevalência de *Streptococcus* spp. na etiologia das mastites subclínicas *Staphylococcus aureus* é reconhecido como sendo o patógeno mais frequentemente isolado em mastite subclínica, relacionado aos microrganismos mais contagiosos. Os quartos mamários infectados, a pele do úbere e dos tetos são os principais sítios de localização desses agentes (FERREIRA et al., 2006). Em revisão, Langenegger et al. (1981), relataram que as perdas por mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus* causam três vezes mais prejuízos que a mastite clínica.

Para Fonseca (1996) é fundamental destacar a importância do *Streptococcus agalactiae* na qualidade do leite. Em primeiro lugar, esse agente desencadeia uma elevada CCS, podendo comprometer a qualidade do leite do rebanho. Além disso, esse é um dos raros casos em que um quadro de mastite pode determinar uma alta contagem total de bactérias no leite enviado à indústria. Isso porque vacas infectadas com *Streptococcus agalactiae* podem eliminar um elevado número de bactérias no leite

Segundo Ribeiro et al. (2003), vários são os agentes etiológicos causadores da mastite bovina, tendo sido relacionados na literatura cerca de 137 espécies de microrganismos pertencentes a 35 gêneros, onde se observou a predominância de bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*, ao passo que Philpot (2002) já relata a identificação de mais de 140 microrganismos relacionados à mastite.

Ainda, segundo Ebrahimi et al. (2008), a mastite continua a ser a doença mais frequente e onerosa do gado leiteiro. Cerca de 150 espécies de microrganismos foram encontradas como agentes etiológicos da mastite. Patógenos de mastite ambiental são emergentes considerados como a mais frequente causa de mastite em muitos rebanhos,

¹ RIBEIRO, M. E. R.; PETRINI, L. A.; AITA, M. F.; BALBINOTI, M.; STUMPF JR, W.; GOMES, J. F.; SCHRAMM, R. C.; MARTINS, P. R.; BARBOSA, R. S. relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 9, n. 3, p. 287-290, 2003.

principalmente os bem manejados. Como manejo principal em muitos rebanhos leiteiros está a terapia antimicrobiana para mastite anteriormente a uma cultura microbiológica.

O exame microbiológico é considerado o método padrão para determinação da saúde do úbere e para o diagnóstico da mastite bovina, sendo que o seu principal objetivo é oferecer resultados rápidos e seguros ao veterinário, para que ele possa identificar os problemas do rebanho. Desse modo, medidas específicas de controle direcionadas para o ambiente, ou para a higiene da ordenha, podem ser indicadas de acordo com o padrão de infecção encontrado (RIBEIRO et al., 2003). Os microrganismos encontrados no leite total do rebanho originam-se dos úberes infectados, da superfície dos úberes e dos tetos, ou de uma variedade de outras fontes do ambiente da fazenda. A presença de *S. agalactiae* em amostras de leite do tanque indica que ele está sendo eliminado a partir de quartos mamários, pois o único reservatório deste microrganismo é o úbere infectado. No caso de *S. aureus*, embora possa ser isolado de diferentes locais em um rebanho, a principal fonte de eliminação no leite são as glândulas mamárias infectadas. Portanto, *S. aureus* isolado de amostras do leite do tanque é também considerado como originário de infecção intramamária. Bactérias do ambiente como *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus bovis*, coliformes e leveduras podem estar presente no leite do tanque como resultado de infecção intramamária ou, mais comumente, devido à contaminação não específica do leite. O isolamento desses agentes do leite do tanque não pode ser considerado como sendo originário das glândulas mamárias (BRITO et al., 1998).

Em estudo acerca da etiologia da mastite bovina nas sete principais bacias leiteiras do Estado de São Paulo, Costa et al. (2000) realizaram exames microbiológicos em 31625 amostras de leite de 11805 vacas leiteiras. Verificou-se que os principais agentes isolados foram *Corynebacterium* sp. (36,63%), *Staphylococcus* sp. (26,22%), *Streptococcus* sp. (18,39%), tendo também sido isolados outros gêneros de bactérias, bem como fungos micelianos, leveduras e algas. Estudo feito com mastite subclínica, em quatro rebanhos compostos por 118 vacas leiteiras e 468 quartos mamários, verificaram que o *Staphylococcus aureus*, foi isolado de 44,7% dos casos, *Staphylococcus* coagulase negativa de 31,6% e *Streptococcus* sp de 11,4%, sendo o *Staphylococcus aureus* o agente etiológico mais freqüente das mastites subclínicas (BARBALHO, 2001). Dentre os estafilococos coagulase positiva, o *Staphylococcus aureus* é considerado o principal microrganismo envolvido na etiologia infecciosa da mastite bovina (ZAFALON, 2005).

Em muitos países, o controle da mastite subclínica foi associado com uma mudança na distribuição dos patógenos envolvidos. Resultados examinados em larga escala na prevalência

de infecção intramamária revelam que *Staphylococcus* spp. (57,2% das amostras com cultura positiva) seguido por *Staphylococcus aureus* (18,4%) e coco esculina positivo (15,9%). *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis* e *S. agalactiae* foram isolados em 2,3%, 0,8% e 0,3%, respectivamente das culturas positivas (PIEPERS et al., 2007).

Staphylococcus aureus é um dos principais agentes das mastites consideradas contagiosas, apresentando uma elevada incidência na maioria dos rebanhos leiteiros em vários países. O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococaceae; são cocos Gram-positivos, imóveis, arrumados em massas irregulares ou em cachos de uva, anaeróbios facultativos ou aeróbios, catalase positivos e apresentam várias espécies (BARBALHO; MOTA, 2001). É reconhecido como sendo o patógeno mais frequentemente isolado em casos de mastite subclínica, relacionado entre os organismos mais contagiosos (SÁ et al., 2004; FERREIRA et al., 2006). As taxas de isolamento são variáveis, entretanto o mesmo tem sido considerado de maior significado nas infecções intramamárias. Quanto a sua participação nas mastites, sejam clínicas ou subclínicas, encontram-se em 52,1%; 16,9% e 76,5% dos casos, respectivamente (SÁ et al., 2004). *Staphylococcus aureus* é reconhecido como o patógeno mais frequentemente isolado em casos de mastite subclínica bovina, relacionado entre os microorganismos mais contagiosos e, por este motivo, é grande a importância de cuidados que previnam a sua disseminação no rebanho durante a ordenha. Os quartos mamários infectados, a pele do úbere e dos tetos são os principais sítios de localização desses agentes (FERREIRA et al., 2006; ZAFALON et al., 2009). Em revisão, Langeneger et al. (1981), relataram que as perdas por mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus* causam três vezes mais prejuízos que a mastite clínica. A importância do gênero *Staphylococcus* spp. ficou também evidente para Langoni et al. (1998), trabalhando com 7902 e 850 amostras de leite provenientes de casos de mastites subclínicas e clínicas, respectivamente, onde o agente foi encontrado em 32,68% das amostras de casos clínicos e 18,88% dos casos subclínicos, com isolamento de *S. aureus* em 22,48% dos casos clínicos e em 11,38% dos subclínicos (SÁ et al., 2004). Segundo Langoni et al. (2000) e Sá et al. (2004) isolaram *S. aureus* em 35,53% nas 702 amostras de leite procedentes de vaca com mastite subclínica. Quanto aos aspectos de saúde pública, *S. aureus* produz enterotoxinas implicadas em casos de toxinfecções alimentares. Amostras de *S. aureus* enterotoxigênicos têm sido isoladas de leite pasteurizado, iogurte caseiro, leite em pó, achocolatados e sorvetes, bem como de outros subprodutos lácteos. A fonte de contaminação pode ser tanto o leite oriundo de vacas com mastite como os manipuladores envolvidos. Sabe-se que a intoxicação estafilocócica não é de notificação compulsória e desta forma é impossível precisar a sua incidência. O leite tem sua composição

e qualidade alteradas quando oriundo de vacas com mastite subclínica bovina, com intensidade que depende da resposta inflamatória do animal, dos fatores de virulência do agente etiológico da doença e da extensão do tecido afetado (ZAFALON et al., 2005).

Almeida et al. (1996) observaram que o *Staphylococcus aureus* é capaz de invadir e se replicar dentro das células epiteliais da glândula mamária bovina, podendo esse mecanismo ser um pré-requisito para a infecção, além de levar a resultados falso negativos nos exames bacteriológicos e influenciar na eficácia dos antibióticos usados no tratamento das mastites por esse microrganismo. Grönlund e Johannison (2006) relatam que durante a mastite crônica, *Staphylococcus aureus* tem sido apontado suprimir a resposta imune por ser citotóxico para os linfócitos circulantes e reduzir a proliferação dos linfócitos do leite. A resposta imune inata também é enfraquecida pela infecção mamária crônica assim como a capacidade fagocítica dos neutrófilos é reduzida. Em infecção experimental, neste mesmo estudo, até 24 horas da infecção, a CCS foi mais alta do que os níveis de pré infecção e permaneceram elevados durante o estudo. *S. aureus* foi detectado no leite dos quartos infectados. Outro achado foi uma grande proporção de células B infectadas tanto nos quartos controle como no sangue na fase crônica comparada com a pré infecção e a fase aguda.

S. aureus contém enzimas de degradação de carboidratos, gorduras e proteínas e pode obter metabólitos em uma variedade de ambientes. Este *Staphylococcus* raramente invade e infecta a pele normal, mas a pele injuriada e a pele do final do teto são particularmente suscetíveis à colonização. Tal bactéria é difícil de eliminar porque sobrevive por longos períodos sob a pele (MCDONALD, 1977).

A maior parte das informações sobre incidência de infecção intramamária, inclui *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *S. uberis*, sendo o *S. agalactiae* o mais prevalente. Os streptococos pertencem à família *Streptococaceae*, gênero *Streptococcus* e são cocos Gram-positivos, geralmente dispostos aos pares ou em cadeias, anaeróbios facultativos ou estritos, catalase positivos. Podem causar o desenvolvimento de ambas as formas de mastite, aguda e crônica. Estas infecções, muitas vezes apresentam sinais clínicos de fácil detecção, porém uma proporção de casos mostrará sinais brandos, que reduzem as chances de detecção, reduzindo significativamente a qualidade do leite a ser processado (BARBALHO; MOTA, 2001; DENIS et al., 2006). Estas três formas são consideradas como ambientais, isto é, oportunistas que se originam de contaminação fecal de camas, solo etc. onde o reservatório para contágio é o úbere contaminado de um bovino infectado (JACOBSSON, 2003). *Streptococcus dysgalactiae* estão envolvidos com lesão nas tetas, sendo comumente associado à mastite no período seco. Os *Streptococcus agalactiae* são os

microrganismos melhor adaptados à glândula mamária, raramente são encontrados fora dela; geralmente estão envolvidos em doenças clínicas agudas e infecções subclínicas persistentes, afetando a qualidade do leite. O *Streptococcus agalactiae* é um parasita altamente contagioso, obrigatório da glândula mamária bovina. Este organismo rapidamente morre quando exposto à pele saudável ou desgastada. Por isso ele pode sobreviver por longos períodos apenas na glândula. Sua erradicação em um rebanho é possível, porém o processo é muito custoso. A infecção é geralmente crônica e sua detecção precisa de assistência laboratorial (MCDONALD, 1977; PRESTES; FILAPPI; CECIM, 2002; BROCHET et al., 2006). *Streptococcus agalactiae* ou *Streptococcus* do grupo B são bem reconhecidos por todo o mundo como agente etiológico da mastite bovina, causando ambas mastites, clínica e subclínica de longa duração. As células bacterianas se depositam no leite de quartos infectados e a transmissão para os quartos não infectados acontese durante a lactação (DUARTE et al., 2004).

Segundo Fonseca (1996) é fundamental destacar a importância do *Streptococcus agalactiae* na qualidade do leite. Em primeiro lugar, esse agente desencadeia uma elevada CCS, podendo comprometer a qualidade do leite do rebanho. Além disso, esse é um dos raros casos em que um quadro de mastite pode determinar uma alta contagem total de bactérias no leite enviado à indústria. Isso porque vacas infectadas com *Streptococcus agalactiae* podem eliminar um elevado número de bactérias no leite. No Brasil, estudos têm sido desenvolvidos pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Agropecuária (Juiz de Fora - MG) para investigar a frequência deste agente bacteriano nas fazendas de leite na região. *Streptococcus* do Grupo B foi identificado como o mais frequente agente, sendo reconhecido em 60% do gado leiteiro avaliado (DUARTE et al., 2004).

Causa muitas infecções neonatais, pneumonia, septicemias e meningites. É causa de mortalidade em pessoas imunodeprimidas. No entanto é um comensal, colonizando o trato gastrointestinal e genitourinário de mais de 50% de adultos saudáveis. Também pode ser isolado de outros animais tais como cães, cobaias, cavalos e peixes (BROCHET et al., 2006). Cepas humanas de *Streptococcus agalactiae* normalmente não fermentam a lactose, mas a habilidade de fermentar a lactose pode ser obtida depois de 8 a 10 passagens em substrato contendo lactose. A mesma mudança pode ser assumida na glândula mamária devido à presença da lactose no leite. Estudo feito na Dinamarca mostra uma média de 1,3 a 11,9% de cepas isoladas serem lactose negativo, a qual poderia implicar em significativa influência de reservatório humano, isto é, ser causa contínua de infecção das vacas no rebanho (ANDERSEN et al., 2003). Sua atividade proteolítica, hidrólise da caseína, encontrada como

característica comum do *Streptococcus* do grupo B, assim como a fermentação da galactose são essenciais para a aquisição de nutrientes da degradação do leite, levando à sobrevivência da bactéria dentro do úbere (DUARTE et al., 2004). Reconhecido, desde 1920 como agente etiológico da mastite bovina, tem sido associado a infecções em parturientes e recém nascidos, provocando uma importante morbidade e mortalidade entre os neonatos e mulheres grávidas (EL BEITUNE; DUARTE; MAFFEI, 2005).

Quartos mamários de animais nos terços inicial e médio de lactação possuem menores chances de serem curados após tratamento da mastite subclínica durante a lactação. Os mecanismos de defesa do animal têm baixa capacidade de resposta a infecções no período situado entre três semanas antes do parto até três semanas pós-parto. Quanto mais elevado o número de lactações de um animal, aumentam as chances dele tornar-se uma fonte de infecção para o rebanho. Uma infecção crônica pode permanecer subclínica ou evoluir para um quadro clínico, quando, então, o tratamento não é apenas uma questão de custo-benefício e começam a vigorar aspectos legais, éticos e de bem-estar animal para tomada de decisão sobre o mesmo (ZAFALON, 2005).

Os programas de controle de mastite visam diminuir a prevalência da doença a níveis aceitáveis, uma vez que sua erradicação não é viável. Entre as medidas recomendadas para o controle das mastites produzidas pela maioria dos organismos incluem-se as medidas higiênicas. Esses procedimentos, entretanto, não são eficazes contra as infecções intramamárias (IIM) produzidas por microrganismos de origem ambiental ou oportunistas como *Streptococcus uberis*, *S. dysgalactiae* ou coliformes. Assim, encurtar a duração da IIM é um importante componente dos programas de controle de mastites, o que pode ser feito por meio de tratamentos das mastites subclínicas durante a lactação. Tratamentos das mastites subclínicas, causadas principalmente por estafilococos e estreptococos, durante a lactação apresentam resultados variáveis quanto ao sucesso das terapias. Segundo autores citados por Reis, Silva e Brescia (2003) os índices de recuperação da glândula variam entre 3,6% e 92%. Em alguns experimentos os resultados não foram considerados significativos. (REIS; SILVA; BRESCIA, 2003).

A contagem de UFC/mL no leite geralmente é realizada pelo exame de amostra obtida a partir dos tanques de refrigeração de leite e não diretamente de cada glândula mamária de vaca com infecção intramamária. Assim sendo, a contagem de UFC/mL no leite proveniente diretamente de uma única glândula mamária bovina que apresenta infecção intramamária permitiria o conhecimento da quantidade de microrganismos que estaria associada a uma determinada intensidade de processo inflamatório que possa estar ocorrendo na glândula.

Poder-se-ia avaliar desta forma o comportamento de cada um dos agentes etiológicos de mastite infecciosa, particularmente no que tange o aspecto quantitativo, frente às diferentes intensidades de processo inflamatório na glândula. Além disso, a comparação destas informações com a contagem de células somáticas na amostra de leite permitiria uma avaliação mais acurada da natureza do processo inflamatório e infeccioso da glândula. Dever-se-ia considerar ainda, conforme mencionado anteriormente, o risco que representa a presença de microrganismos no leite, sobretudo quando se considera o hábito do consumo de leite “in natura”, podendo-se verificar em um estudo quantitativo desta natureza, a carga microbiana potencialmente capaz de ser ingerida pelo homem.

Tendo em vista a inexistência de relatos na literatura pesquisada, acerca da avaliação da quantidade de UFC de microrganismos/mL no leite proveniente de glândulas mamárias bovinas envolvidas nos diferentes tipos de resposta inflamatória (mastite), foi delineado o presente trabalho com intuito de investigar esta correlação entre quantidade de microrganismos presentes na glândula e intensidade do processo inflamatório a eles associado.

2 OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo a comparação da contagem de células somáticas e contagem de unidades formadoras de colônias provenientes do leite de glândulas mamárias de bovinos, em lactação, com isolamentos de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. em infecções isoladas e associadas.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Avaliação do “status” microbiológico de amostras de leite de vacas em lactação que apresentaram ou não mastite

Foram examinadas vacas primíparas e multíparas holandesas ou mestiças, em diferentes estágios de lactação, todas pertencentes a plantéis de propriedades de exploração leiteira localizadas no Estado de São Paulo entre 2007 e 2008.

Os animais em lactação foram submetidos a provas de campo, Tamis ou *strip cup* (BLOOD; RADOSTITS, 1991) e CMT (California Mastitis Test) (SCHALM; NOORLANDER, 1957), para detecção de mastite clínica e subclínica, respectivamente.

O estudo foi realizado utilizando-se 80 amostras de leite (volume de aproximadamente 5 mL por amostra) de glândulas mamárias de animais examinados previamente, que apresentaram resultado positivo aos testes para detecção de mastite subclínica (CMT positivo), isto é, amostras de leite provenientes de glândulas mamárias associadas a processo inflamatório sem sinais clínicos, mas com aumento de CCSs (CMTs positivos). Tais amostras foram colhidas imediatamente antes da ordenha, após anti-sepsia rigorosa dos tetos pela lavagem prévia das glândulas com água e sabão, utilizando papel toalha para secagem e álcool 70% GL para desinfecção dos tetos. As amostras foram colocadas em tubos de vidro estéreis (16 x 160 mm com rolha de borracha nº 4).

As amostras de leite foram transportadas ao Laboratório de Doenças Infecciosas e Fungos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP sob condições de refrigeração, em caixas de isopor com gelo reciclável. Inicialmente as amostras de leite foram submetidas aos exames microbiológicos, semeadas em placas ágar sangue de carneiro (5%)¹ com incubação em aerobiose a 37°C com leituras a 24-96 horas.

Os microrganismos isolados (bactérias) foram identificados de acordo com Lennette (1985) e classificados segundo Krieg e Holt (1994) e Murray et al. (1999).

¹ Blood agar base - Oxoid - Hampshire - U.K.

3.2 Contagem dos microrganismos *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. através da contagem de UFC em amostras de leite de vacas em lactação que apresentaram ou não infecção intramamária

A partir das amostras de leite das quais foram isolados microrganismos ou não, foram preparadas diluições da ordem de 1/10 até a diluição 10^{-4} das mesmas em solução salina 0,85%, em tubos de vidro. A partir de cada diluição foi colhida uma alíquota de 0,1 mL para cultivo (utilizando-se a técnica de *spread plate* ou, espalhamento em placas, utilizando alça de Drigalsk) em duplicata em ágar sangue de carneiro (5%), com incubação a 37°C por um período de até 96 horas, visando à contagem de unidades formadoras de colônias (UFC).

3.3 Contagem de células somáticas em amostras de leite de vacas em lactação que apresentaram infecções intramamárias subclínicas

Todas as amostras de leite colhidas de vacas em lactação que apresentaram infecções intramamárias (subclínicas) foram submetidas à contagem de células somáticas (CCS) totais, polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN) em microscópio óptico comum, segundo o método de Prescott e Breed (1910).

Segundo a metodologia de Prescott e Breed (1910) modificada com a coloração de Hematoxilina-Eosina (HE), um volume de 0,01 mL de leite foi distribuído em uma área de 1 cm² de lâmina e, após a secagem, fixado com álcool metílico e corado utilizando-se tal técnica (THIERS, 1998).

As amostras que apresentaram crescimento de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. e associação dos mesmos depois de processada a contagem de células somáticas e a contagem dos microrganismos, foram comparadas e analisadas para verificação de infecções mistas. Foram formados 4 grupos para análise e comparação: 1) sem crescimento bacteriano, 2) *Staphylococcus* spp, 3) *Streptococcus* spp., 4) *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. associados.

3.4 Análise estatística

A análise dos dados resultantes das contagens celulares e dos microrganismos frente aos diferentes escores do CMT para os microrganismos isolados, foi feita através do teste estatístico Mann-Whitney para contagem de células somáticas e contagem de unidades formadoras de colônias e ANOVA para contagem PMN utilizando-se o “software” GRAPHPAD INSTAT 1992-98.

3.5 Comparações dos resultados da CCSs e contagem dos microrganismos *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. encontrados nos testes microbiológicos das amostras de leite de vacas em lactação que apresentam infecção intramamária

Todas as amostras de leite colhidas de vacas em lactação que apresentaram mastite subclínica, primeiramente classificadas pelos testes Tamis e CMT, foram submetidas às provas microbiológicas para identificação de microrganismos. As amostras que apresentaram crescimento de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. e associação dos mesmos, depois de processada a contagem de células somáticas e a contagem de microrganismos, foram comparadas e analisadas para verificação de infecções mistas com a presença de ambos, *Staphylococcus* spp e *Streptococcus* spp. Foram definidos quatro grupos experimentais: 20 amostras que não apresentaram crescimento de microrganismos como grupo controle, 20 amostras com crescimento de *Staphylococcus* spp., 20 amostras com crescimento de *Streptococcus* spp. e 20 amostras com crescimento de ambos microrganismos.

4 RESULTADO

Foram consideradas 80 amostras de leite analisadas, onde não houve crescimento bacteriano e houve crescimento de *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., em cultura pura e associações de ambos os microrganismos. Quatro grupos experimentais foram definidos: 20 amostras que não apresentaram crescimento de microrganismos como grupo controle, 20 amostras com crescimento de *Staphylococcus* spp., 20 amostras com crescimento de *Streptococcus* spp. e 20 amostras com crescimento de ambos em associação.

4.1 Comparação entre os grupos de amostras de leite de vacas em lactação que apresentaram mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas (CCS)

As CCSs totais das amostras isoladas de *Staphylococcus* spp. (Mediana = 5,765; Mínimo = 4,810 e Máximo = 6,841) em cultura pura e *Streptococcus* spp. (Mediana = 5,920; Mínimo = 4,986 e Máximo = 7,046) em cultura pura, foram maiores ($P = 0,02$) ($P < 0,05$) estatisticamente do que a CCSs totais das amostras em que não foram isolados microrganismos (Mediana = 5,170; Mínimo = 3,810 e Máximo = 6,734) (Tabela 1).

Na comparação do grupo que não apresentou crescimento de microrganismos (Mediana = 5,170; Mínimo = 3,810 e Máximo = 6,734), com o grupo que apresentou crescimento de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. em associação (Mediana = 5,673; Mínimo = 5,000 e Máximo = 6,725), foi obtido $P = 0,0679$, indicando que não houve diferença estatisticamente significativa na CCS ($P > 0,05$) (Tabela 1).

Não foi constatada diferença estatisticamente significante na CCSs entre os grupos cujas amostras apresentaram crescimento de *Staphylococcus* spp. em cultura pura (Mediana = 5,765; Mínimo = 4,810 e Máximo = 6,841) e *Streptococcus* spp. também em cultura pura (Mediana = 5,920; Mínimo = 4,986 e Máximo = 7,046), com $P = 0,2448$ ($P > 0,05$) (Tabela 1).

Ao comparar as amostras que apresentaram crescimento associado de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. (Mediana = 5,763; Mínimo = 5,000, Máximo = 6,725) com amostras cuja cultura pura foi de *Staphylococcus* spp. (Mediana = 5,765; Mínimo = 4,81 e Máximo = 6,841), P foi 0,0168 ($P < 0,05$). *Staphylococcus* spp. em cultura pura apresentou maior CCS do

que em associação (Tabela 1).

O grupo, cujo crescimento foi verificado ser a associação de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. (Mediana = 5,673; Mínimo = 5,000 e Máximo = 6,725) quando da contagem de células somáticas, comparado com o grupo que apresentou crescimento de *Streptococcus* spp. (Mediana = 5,920; Mínimo = 4,986 e Máximo = 7,046), em cultura pura, P apresentou resultado 0,1265 não apresentando diferença significativa estatisticamente ($P > 0,05$) (Tabela 1).

Não houve diferença estatisticamente significante na comparação entre CCSs totais nas amostras isoladas de *Staphylococcus* spp., de *Streptococcus* spp. e associação de ambos microrganismos.

Tabela 1 - Comparação na CCSs (contagem de células somáticas) em leite de glândula mamária de vacas em lactação, de rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo, em logaritmo, apresentando cultura pura de *Staphylococcus* spp., cultura pura de *Streptococcus* spp. *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. em associação - 2007–2008

CCS total	negativo	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Staphylo/Strepto</i>
Mediana	5,170	5,765	5,920	5,673
Mínimo	3,81	4,81	4,986	5,000
máximo	6,734	6,841	7,046	6,725

4.2 Comparação entre os grupos de amostras de leite de glândula mamária de vacas em lactação que apresentaram mastite subclínica em relação à contagem de PMN

Os quatro grupos também foram comparados em relação à contagem de PMN (polimorfonucleares) presentes no leite, utilizando-se o mesmo teste Mann-Whitney.

Tratando-se da comparação entre as contagens de PMN dos grupos cujo crescimento foi negativo (Mediana = 5,076; Mínimo = 3,810 e Máximo = 6,731) e o que apresentou crescimento, em cultura pura de *Staphylococcus* spp. (Mediana = 5,686; Mínimo = 4,655 e Máximo = 6,823), foi obtido $P = 0,0239$, sendo um resultado maior e estatisticamente significativo ($P < 0,05$) (Tabela 2).

A comparação entre o grupo que não apresentou crescimento de microrganismos

(Mediana = 5,076; Mínimo = 3,810 e Máximo = 6,731) com o grupo com crescimento de *Streptococcus* spp. em cultura pura (Mediana = 5,892; Mínimo = 4,940 e Máximo = 7,025), indicou, na contagem de PMN, um valor de $P = 0,0024$ ($P < 0,05$), maior estatisticamente, nesta amostra de leite (Tabela 2).

A contagem de PMN foi maior no grupo que apresentou crescimento dos microrganismos em associação (Mediana = 5,631; Mínimo = 4,924 e Máximo = 6,721) em comparação com o grupo de crescimento bacteriano negativo (Mediana = 5,076; Mínimo = 3,810 e Máximo = 6,731). O Teste Mann - Whitney mostrou $P = 0,0499$, que é resultado significativo estatisticamente ($P < 0,05$). (Tabela 2).

Não houve diferença estatística significativa entre a contagem de PMN dos grupos com crescimento de cultura pura de *Staphylococcus* spp. (Mediana = 5,686; Mínimo = 4,655 e Máximo = 6,823) e *Streptococcus* spp., também em cultura pura (Mediana = 5,892; Mínimo = 4,940 e Máximo = 7,025). O Teste Mann-Whitney apresentou $P = 0,1763$ ($P > 0,05$) (Tabela 2).

A contagem de PMN em cultura pura de *Staphylococcus* spp. (Mediana = 5,686; Mínimo = 4,655 e Máximo = 6,823) foi comparada com a contagem de PMN da associação de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. (Mediana = 5,631; Mínimo = 4,924 e Máximo = 6,721) onde apresentou $P = 0,9373$, sem diferença estatística ($P > 0,05$) (Tabela 2).

Foi feita, também, a comparação entre os grupos com os microrganismos em cultura pura e em associação o que mostrou índices não significativos nos testes a saber: comparação da contagem de PMN em cultura pura de *Streptococcus* spp. (Mediana = 5,892; Mínimo = 4,940 e Máximo = 7,025) e *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. em associação (Mediana = 5,631; Mínimo = 4,924 e Máximo = 6,721), $P = 0,1405$ ($P > 0,05$) (Tabela 2).

A porcentagem de PMN entre as amostras foi comparada para este estudo (Tabela 2). O teste ANOVA foi feito para a comparação entre os grupos. Sendo $P = 0,1060$ ($P > 0,05$), a porcentagem de PMN não apresenta diferença significativa entre os grupos.

Tabela 2 - Comparação de contagem de células PMNs (polimorfonucleares) em leite de glândula mamária de vacas em lactação, de rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo, em logaritmo e em porcentagem apresentando cultura pura de *Staphylococcus* spp., cultura pura de *Streptococcus* spp. *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. em associação - 2007-2008

PMN	Negativo		<i>Stapylococcus</i>		<i>Streptococcus</i>		<i>Staphylo/Strepto</i>	
	Log	%	Log	%	Log	%	Log	%
Mediana	5,076	84,563	5,686	83,193	5,892	85,647	5,631	90,383
Mínimo	3,810	44,444	4,655	57,547	4,940	77,604	4,924	60,345
Máximo	6,731	100,000	6,823	96,703	7,025	100,000	6,721	99,270

4.3 Comparação entre os grupos de amostras de leite de glândula mamária de vacas em lactação que apresentaram mastite subclínica em relação à contagem de UFC

A avaliação da quantidade de microrganismos obtida através da contagem de UFC/mL (unidades formadoras de colônias por mililitro), também foi analisada utilizando-se o teste Mann - Whitney com $P = 0,0134$, quando da comparação entre os grupos cujas amostras eram de cultura pura de *Staphylococcus* spp. (Mediana = 4,772; Mínimo = 3,279 e Máximo = 7,137) e *Streptococcus* spp. (Mediana = 5,933; Mínimo = 3,782 e Máximo = 7,550) também em cultura pura. O resultado do teste foi considerado maior estatisticamente ($P < 0,05$), isto é, *Streptococcus* spp. estimulou uma maior contagem de UFC (Tabela 3).

Já na comparação do grupo de crescimento de *Staphylococcus* spp. (Mediana = 4,772; Mínimo = 3,279 e Máximo = 7,137) em cultura pura com o grupo de crescimento associado *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. (Mediana = 5,048; Mínimo = 2,811 e Máximo = 7,582), P igual a 0,7764. Não houve diferença estatisticamente relevante entre tais amostras ($P > 0,05$) (tabela 3).

Em se tratando da comparação da contagem de UFC em cultura pura de *Streptococcus* spp. (Mediana = 5,933; Mínimo = 3,782 e Máximo = 7,550) com a associação de ambos os microrganismos (Mediana = 5,792; Mínimo = 3,267 e Máximo = 8,882), $P = 0,9569$ ($P > 0,05$) (Tabela 3).

Verificou-se que quando houve associação de microrganismos, a quantidade de UFC

de *Streptococcus* spp. (Mediana = 5,792; Mínimo = 3,267 e Máximo = 8,882) foi superior ($P = 0,0499$; $P,0,05$) à quantidade de UFC de *Staphylococcus* spp. (Mediana = 5,048; Mínimo = 2,811 e Máximo = 7,582) (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação da contagem da quantidade de UFC (unidades formadoras de colônias) em leite de glândula mamária de vacas em lactação, de rebanhos do Estado de São Paulo, apresentando cultura pura de *Staphylococcus* spp., cultura pura de *Streptococcus* spp. *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. em associação - 2007-2008

UFC	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Staphylo(Stap/Strept)</i>	<i>Strepto(Stap/Strept)</i>
Mediana	4,772	5,933	5,048	5,792
Mínimo	3,279	3,782	2,811	3,267
Máximo	7,137	7,550	7,582	8,882

5 DISCUSSÃO

As mastites, definidas como inflamações da glândula mamária, correspondem a um fator de grande impacto na obtenção de produção leiteira. Essa enfermidade pode ser classificada, conforme a sua manifestação, como subclínica e clínica (MARTINS et al., 2010). Barbalho e Mota (2001) relatam que a mastite subclínica apresenta uma maior importância epidemiológica por alastrar-se silenciosamente pelo rebanho sem que sejam percebidas alterações macroscópicas à inspeção do úbere ou de sua secreção. Identificar uma mama doente, na maioria dos casos não representa uma tarefa difícil, mas considerar um quarto efetivamente sadio ou em vias de apresentar alguma alteração ainda é discutível. Além disso, a maioria das mastites apresenta-se sem sinais físicos de processo inflamatório agudo, sendo crônicas ou incipientes e, apesar do aspecto inofensivo, causam sérios prejuízos econômicos e servem de fonte de infecção, sendo maioria das mastites é causada por infecção bacteriana (RADOSTITIS, 2002; DIAS, 2007).

Segundo Dias (2007), o diagnóstico da mastite clínica pode ser feito através da sintomatologia, como inflamação do úbere, secreção láctea com grumos, sangue, pus, entre outras secreções patológicas. Entretanto, para diagnosticar a mastite subclínica é necessária a utilização de exames complementares baseados no conteúdo celular do leite. Além disso, existe a necessidade da cultura e isolamento dos agentes etiológicos envolvidos, para a implantação de métodos de tratamento e estratégias de controle e profilaxia adequados. O controle da mastite nos rebanhos leiteiros constitui um importante passo para a elaboração de produtos de boa qualidade e diminuição dos riscos à população.

No Brasil, a produção de leite, como os outros segmentos da atual sociedade, é uma atividade cada vez mais competitiva. Portanto, é importante quantificar e qualificar os fatores que podem influenciá-la, buscando ganhos efetivos na quantidade e qualidade do leite produzido, na tentativa de suprir a demanda nacional. O fator que mais contribui para as perdas econômicas da cadeia produtiva do leite é a mastite bovina (COLDEBELLA et al., 2004). Durante as últimas décadas, o impacto econômico da mastite em fazendas leiteiras tem sido o foco de vários estudos e os resultados vêm sendo amplamente divulgados como justificativas para a implantação de medidas de controle da mastite bovina. Entretanto, mesmo com o estudo e desenvolvimento de diversas estratégias de controle e prevenção, a mastite continua sendo a doença que mais causa prejuízos a indústria processadora e ao consumidor. Estima-se um prejuízo de cerca de US\$ 1,8 bilhões/ano nos EUA, em função da ocorrência da

mastite. Já no Brasil, é esperada, em função da alta prevalência de mastite nos rebanhos, a perda de produção entre 12 e 15%, o que significa um total de 2,8 bilhões de litros de leite/ano em relação à produção anual de 21 bilhões de litros (FERREIRA et al., 2010). Analisando-se o percentual de quartos mamários afetados, em um estudo realizado em Mato Grosso por Martins et al. (2010), verificou-se a presença de mastite clínica e subclínica em 5,8% e 65,0% destes, respectivamente. Com este resultado, observaram o predomínio de mastites subclínicas nos rebanhos estudados, havendo uma ocorrência 11,2 vezes maior destas em relação às mastites clínicas. Apesar das perdas na produção de leite associadas com a mastite clínica serem facilmente visíveis, a mastite subclínica representa 82% das perdas com a redução da produção láctea total, sendo que a forma clínica é responsável por apenas 18% do prejuízo total, devido a mortes e descartes prematuros (ZAFALON, 2002).

Estudo realizado por Zafalon et al. (2002) com 29 quartos mamários reagentes ao CMT, com mastite subclínica, verificou que *Staphylococcus* coagulase positiva e coagulase negativa foram os agentes etiológicos mais frequentemente isolados nestas amostras 31,0% e 13,8% (respectivamente), enquanto que *Streptococcus* a porcentagem de isolamento foi de 6,9%.

Segundo Piepers et al. (2007), em países como a Bélgica, aproximadamente 40% do gado leiteiro tem pelo menos um quarto infectado e *Staphylococcus* spp. foi a bactéria patogênica mais prevalente. No entanto, eles são considerados como patógenos menores, oportunistas da microbiota da pele. A maioria da infecções mamárias com alta contagem de células somáticas (CCSs) foi causada por *Staphylococcus* spp. No entanto, no presente trabalho, a CCS no grupo de crescimento de *Streptococcus* spp., em cultura pura (Mediana = 5,920), não apresentou diferença estatística significativa com o grupo cujo crescimento foi de *Staphylococcus* spp., em cultura pura (Mediana = 5,765).

A contagem de células somáticas (CCS) do leite é afetada principalmente pela infecção intramamária e, por ser um indicador de mastite subclínica, pode ser utilizada para quantificar as perdas de produção de leite, em função da mastite (COLDEBELLA et al., 2004). A contagem de células somáticas no leite é um método convencional e amplamente utilizado para o diagnóstico da mastite subclínica bovina. Além de valiosa utilidade na detecção da enfermidade em rebanhos, este método também pode avaliar a qualidade do produto que é enviado aos laticínios. Este fato assume destacada importância, uma vez que o pagamento do leite pela sua qualidade é, cada vez mais, efetuado por diversos laticínios. (ZAFALON et al., 2002).

Thiers (1998), estudando a contagem de células somáticas dos animais de 10 propriedades leiteiras de São Paulo verificou que, tal contagem das amostras com isolamento

de microrganismos (mediana, 290.323 céls/mL ou em logaritmo, 5,463) foi maior quando comparada com as amostras negativas (mediana igual a 25.807 céls/mL ou em logaritmo, 4,418). No presente estudo, o grupo cujo crescimento foi de *Staphylococcus* spp. (Mediana = 5,765), apresentou maior contagem de células somáticas, comparado ao grupo que não apresentou crescimento bacteriano (negativo) (Mediana foi de 5,170). O grupo de crescimento de *Streptococcus* spp. também apresentou maior CCS (Mediana = 5,920) comparado ao grupo negativo. Tal resultado está de acordo com os dados de Thiers.

Green et al. (2008) analisaram a CCS em leite de 178 vacas confinadas e no pasto no período seco durante um ano com cultura positiva para *Streptococcus dysgalactiae*. A contagem de células somáticas apresentou uma média de 197.000 células/mL (média em logaritmo 5,294) para o grupo negativo no início da lactação de primíparas e 280.000 células/mL (5,447) para cultura positiva de vacas multíparas. No presente trabalho, *Streptococcus* spp. apresentou mediana de 5,920, em logaritmo e para o grupo negativo, mediana de 5,170, também em logaritmo. Os dados corroboram com os de Green.

O leite tem sua composição e qualidade alteradas quando oriundo de vacas com mastite subclínica bovina, com intensidade que depende da resposta inflamatória do animal, dos fatores de virulência do agente etiológico da doença e da extensão do tecido afetado. Há uma prevalência de *Staphylococcus aureus* nesta forma da doença (ZAFALON, 2005). *Staphylococcus aureus* é patógeno ainda mais frequentemente isolado de quartos mamários subclínicamente infectados na Bélgica assim como em outras regiões ou países. A maioria das infecções intramamárias são causadas por *Staphylococcus* spp. e causam altos índices de CCSs. Cocos esculina positivos (*Streptococcus agalactiae*) vêm em seguida (PIEPERS et al., 2007).

No presente estudo, os dados mostraram uma maior contagem de células somáticas no grupo que apresentou cultura pura de *Streptococcus* spp (Mediana = 5,920). Entretanto, este aumento não foi significativo perante o grupo que apresentou associação de ambos os microrganismos (Mediana = 5,673) e também não foi significativo quando comparado ao grupo de crescimento de *Staphylococcus* spp. em cultura pura (Mediana = 5,765). Quando o grupo de crescimento em cultura pura foi de *Staphylococcus* spp. (Mediana = 5,765) comparado ao grupo que mostrou associação entre os microrganismos (Mediana = 5,673), houve uma maior CCS no grupo de *Staphylococcus* e esta diferença foi significativa concordando com os autores acima citados. O resultado sugeriu que houve estímulo de produção de células somáticas totais em ambas as culturas puras, contudo o aumento das

células foi praticamente o mesmo para as duas amostras e *Staphylococcus* spp. foi o microrganismo que mostrou um estímulo significativo na produção de células somáticas.

Estudo realizado por Barbalho e Mota (2001) através de exame microbiológico com 104 amostras de leite de 43 animais, demonstrou que as bactérias do gênero *Staphylococcus* sp foram isoladas de 50 mostras, correspondendo a 38,76% do total dos agentes isolados. Estes agentes foram isolados com maior frequência em vacas com mastite subclínica. Segundo os autores, embora existam divergências em relação à frequência de bactérias isoladas no leite de vacas com mastite clínica e subclínica, os *Staphylococcus* spp. continuam sendo os agentes mais isolados neste tipo de infecção, representando grande importância epidemiológica e clínica nas mastites bovinas. No entanto, os dados do presente estudo mostraram que houve uma maior contagem de UFC/mL quando do crescimento do microrganismo *Streptococcus* spp., em cultura pura se comparado ao grupo cujo crescimento foi de *Staphylococcus* spp. em cultura pura. Porém, na comparação do grupo cuja cultura pura foi de *Staphylococcus* spp. com o grupo de cultura em associação dos dois microrganismos (*Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.), não houve diferença estatisticamente relevante entre os grupos. O mesmo aconteceu quando a comparação foi feita com o grupo de cultura pura de *Streptococcus* spp e associação de ambos microrganismos.

Houve um aumento na contagem de células somáticas na presença de cultura pura de *Staphylococcus* spp. nas amostras de leite estudadas, o mesmo acontecendo quando o grupo sem crescimento de microrganismos também foi comparado ao grupo com cultura pura de *Streptococcus* spp., mas não foi um aumento representativo estatisticamente. Mais evidente foi a presença de *Streptococcus* spp.

Patógenos de mastites ambientais são agora emergentes como as mais frequentes causas de mastites em muitos rebanhos, particularmente os bem manejados, sendo o principal manejo a terapia antimicrobiana anterior à cultura microbiológica (EBRAHIMI et al., 2008). Tal informação vem de encontro ao resultado obtido neste trabalho pois, nas amostras em que houve crescimento de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. em associação, a quantidade de UFC de *Streptococcus* spp. foi maior estatisticamente. Embora o *S. aureus* seja apontado como o principal causador de mastites no Brasil e em outros países, estudo feito por Martins et al. (2010) evidenciou o *Corynebacterium* spp. como o maior causador de mastite subclínica e o segundo mais prevalente entre os casos de mastite clínica. Ainda relatou baixa prevalência verificada de bactérias do gênero *Streptococcus*. Foi verificado, no presente estudo que, quando *Staphylococcus* e *Streptococcus* vieram associados em sua cultura, houve maior contagem de UFC de *Streptococcus* spp. dentro da associação dos microrganismos se

comparada à contagem de UFC de *Staphylococcus* spp. dentro da associação. *Corynebacterium* spp. não foi pesquisado neste estudo.

Embora com diferenças, às vezes marcantes, entre os autores *Staphylococcus aureus* pode ser considerado mundialmente como o de maior significado na etiologia das mastites. Reforça esta afirmação a sua presença em 35,53% e 22,48% nas infecções subclínicas. Devem ser levantados os aspectos referentes às raças, idade, aos aspectos ambientais e os de manejo na criação, além de que muitos casos tratam de estudos retrospectivos com números de amostras diferentes; o que deve influenciar na variação dos resultados (SÁ et al., 2004). Nas observações do presente estudo, as amostras com cultura pura de *Staphylococcus* spp. apresentaram uma maior contagem de células somáticas comparadas ao grupo cujas amostras apresentaram crescimento associado dos microrganismos *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. e este crescimento foi significativo, estando de acordo com a observação anterior.

No presente estudo não houve diferença importante entre os grupos *Staphylococcus* spp. em cultura pura, cuja mediana foi de 4,772 (mínimo = 3,279 e máximo = 7,137) e o grupo de associação dos dois microrganismos na contagem de UFC que apresentou mediana = 5,048 (mínimo = 2,811 e máximo = 7,582), assim como quando o grupo de crescimento de *Streptococcus* spp. em cultura pura, sendo mediana = 5,933 (mínimo = 3,782 e máximo = 7,550) foi comparado ao grupo de crescimento de ambos microrganismos em relação a contagem de UFC cuja mediana foi de 5,792 com mínimo da contagem de 3,267 e um máximo de 8,882).

Apesar do advento da pasteurização, a transmissão de patógenos via leite e seus derivados representa um risco durante as falhas neste processo, principalmente no nicho de mercado de produtos lácteos não pasteurizados. Cerca de 44% do leite consumido no Brasil é proveniente do mercado informal, sendo comercializado sem qualquer tratamento térmico ou controle laboratorial. Portanto, a transmissão dos patógenos da mastite e suas toxinas via leite e produtos lácteos corresponde a um risco à saúde do consumidor (MARTINS et al., 2010).

Além da sua importância em saúde pública, fatores como perdas de produção leiteira, custos de tratamento dos casos clínicos, descarte e morte prematura dos animais, somados aos prejuízos da indústria por redução na qualidade e rendimento na fabricação de derivados são responsáveis pelo elevado impacto econômico das mastites (MARTINS et al., 2010). A qualidade do leite in natura é influenciada por muitas variáveis, entre as quais destacam-se fatores zootécnicos associados ao manejo, alimentação, potencial genético dos rebanhos e fatores relacionados à obtenção e armazenagem do leite. Uma das causas que exerce influência extremamente prejudicial sobre a composição e as características físico-químicas

do leite, é a mastite, acompanhada por um aumento na contagem de células somáticas (CCS) no leite. Com o aumento na CCS, a composição do leite, a atividade enzimática, o tempo de coagulação, a produtividade e a qualidade dos derivados lácteos, são influenciados negativamente (MULLER, 2002). A CCS no leite de animais individuais é uma ferramenta valiosa na avaliação do nível de mastite subclínica no rebanho, na estimativa das perdas quantitativas e qualitativas de produção do leite e derivados, como indicativo da qualidade do leite produzido na propriedade e para estabelecer medidas de prevenção e controle da mastite (MULLER, 2002).

Há quantidade considerável de pesquisas indicando que a produção de leite diminui na medida que a contagem de células somáticas aumenta. Com esta elevação do número de células somáticas, o teor da enzima plasmina também eleva-se, causando danos à caseína, o mais importante componente do leite que contribui para a produção de queijo. Assim, o sabor, a validade e a qualidade do produto podem diminuir com o aumento da contagem de células somáticas do leite. Os gastos adicionais representados pelo tratamento das vacas infectadas e pelo descarte do leite secretado por estes animais talvez possam ser compensados pelo ganho decorrente do pagamento por um produto com menor número (ZAFALON et al., 2005).

De acordo com Giannechini et al. (2002), entre casos de mastite clínica o *S. aureus* foi isolado em 37,5% dos casos, seguido da *Escherichia coli* (12,5%) e dos *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN) (7,5%). Quanto à etiologia das mastites subclínicas, os patógenos mais isolados foram *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus sp.*, SCN (*Staphylococcus coagulase negativa*), *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *E. coli* e *Staphylococcus hyicus*. Em estudo de Ebrahimi et al. (2008), *Streptococcus spp.* foi isolado em 52% das mastites subclínicas. No presente estudo, nas amostras observadas em que houve crescimento de *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus spp.* em associação, a quantidade de UFC de *Streptococcus spp.* foi maior estatisticamente, sendo a Mediana do *Staphylococcus spp.* da associação igual a 5,048 e a Mediana do *Streptococcus spp.* da associação igual a 5,792. Além disso, tais microrganismos quando comparados em cultura pura (*Staphylococcus spp.* com Mediana = 4,772 e *Streptococcus spp.* com Mediana = 5,933), *Streptococcus spp.* apresentou uma maior contagem de UFC com diferença estatística significativa, isto é, apresentou maior contagem de UFCs. Nas amostras em que houve crescimento de *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus spp.* associados (Mediana I= 5,792), a quantidade de UFC de *Streptococcus spp.* foi maior estatisticamente (mediana 5,972). Os números absolutos foram convertidos em logarítimo. Os dados do presente estudo corroboram com os dados dos autores acima citados.

Os neutrófilos (polimorfonucleares, PMN) são o tipo celular predominante nos tecidos e nas secreções mamárias no início da inflamação e podem constituir 90% do total de leucócitos na glândula, permanecendo numerosos também nos processos crônicos. Durante a mastite ou a involução da glândula, são as primeiras células a adentrar nos alvéolos, porém atuam por curtos períodos, tendo em vista que sua meia-vida é curta. Os neutrófilos migram da circulação sanguínea para a glândula em resposta a uma grande variedade de mediadores inflamatórios, mas principalmente em resposta às citocinas (CARNEIRO; DOMINGUES;VAZ, 2009). Na mastites subclínicas, apesar de não ser possível diagnosticá-las visualmente, há um aumento acentuado de leucócitos polimorfonucleares, que possibilita a detecção dessa afecção por meios indiretos, como a CCS. Levando-se em consideração os aspectos citológicos do leite mastítico, a mastite pode ser definida como uma enfermidade caracterizada pelo influxo de neutrófilos PMN do tecido mamário para o leite da glândula acometida (LANGONI, 2000b).

Na comparação feita entre as culturas puras de *Staphylococcus* spp. de Mediana = 5,686 (mínimo = 4,655 e máximo = 6,823) e *Streptococcus* spp. de Mediana = 5,892 (mínimo = 4,940 e máximo = 7,025), não houve diferença significativa na contagem de células PMN entre os grupos estudados. Quando da comparação da contagem de células PMN do *Staphylococcus* spp. em cultura pura, a Mediana foi de 5,686 (mínimo = 4,655 e máximo = 6,823) com a associação, cuja Mediana = 5,631 (mínimo = 4,924 e máximo = 6,721) não houve diferença relevante, assim como quando se comparou o grupo de crescimento de *Streptococcus* spp. em cultura pura de Mediana = 5,892 (mínimo = 4,940 e máximo = 7,025) com a associação de ambos microrganismos. Não houve diferença significativa na contagem de células PMN entre os grupos examinados em associação. Porém, na presença de *Staphylococcus* spp. em cultura pura das amostras (Mediana = 5,686), houve uma maior produção de PMN comparado ao grupo de resultado negativo (Mediana = 5,076), assim como a presença de *Streptococcus* spp. em cultura pura (Mediana = 5,892) comparado com o grupo negativo, sendo a diferença significativa entre tais grupos. Os resultados do presente estudo concordam com os dados dos autores acima citados.

As frequências de mastite clínica e subclínica são parâmetros consagrados na avaliação da sanidade da glândula mamária. Logo, constituem os primeiros a serem considerados para a implantação de um programa de controle da mastite. Além disso, análises microbiológicas são complementares e indispensáveis em um programa de controle desta enfermidade, por possibilitarem o isolamento e a identificação do seu agente etiológico (BUENO et al., 2003).

Os objetivos de um teste diagnóstico no contexto do controle e erradicação da doença

animal são identificar rebanhos doentes, além de animais infectados dentro dos rebanhos. Durante a fase inicial de um programa de controle, a sensibilidade de um teste diagnóstico é considerada como a característica mais importante para garantir que todos os animais doentes em um rebanho estejam sendo detectados, a não ser quando se tem uma reduzida prevalência da doença, o que torna a especificidade mais importante e um segundo teste diagnóstico pode ser conduzido para aumentar a capacidade de identificação de animais não doentes (ZAFALON, 2005). Os programas de controle de mastite visam diminuir a prevalência da doença a níveis aceitáveis, uma vez que sua erradicação não é viável. Entre as medidas recomendadas para o controle das mastites produzidas pela maioria dos organismos incluem-se as medidas higiênicas. Esses procedimentos, entretanto, não são eficazes contra as infecções intramamárias (IIM) produzidas por microrganismos de origem ambiental ou oportunistas como *Streptococcus uberis*, *S. dysgalactiae* ou coliformes. Assim, encurtar a duração da IIM é um importante componente dos programas de controle de mastites, o que pode ser feito por meio de tratamentos das mastites subclínicas durante a lactação (REIS; SILVA; BRESCIA, 2003).

Brito et al. (1998), observaram em seu estudo com leite total de rebanhos leiteiros em Minas Gerais, o padrão de eliminação dos agentes contagiosos da mastite pelas glândulas mamárias infectadas geralmente apresenta variabilidade, de modo que a análise de amostras consecutivas tem sido recomendada para aumentar a sensibilidade do exame.

A presença de microrganismos no leite, muitos dos quais agentes de zoonoses constitui fator que compromete a sua qualidade. Assim sendo, o leite bem como os derivados lácteos contaminados com microrganismos podem se constituir em potenciais vias de transmissão de zoonoses (BADINI, 1995; COSTA et al., 1995; MELVILLE et al., 1999). Por esta razão, é importante atentar para o risco que constitui a presença destes agentes no leite, principalmente quando se considera que, em diversas localidades do Brasil é hábito comum o consumo de leite e produtos lácteos crus.

6 CONCLUSÃO

1. Houve diferença entre a contagem de UFC das amostras isoladas de *Staphylococcus* spp. em cultura pura e *Streptococcus* spp. também em cultura pura, sendo que o grupo de *Streptococcus* spp. produziu uma maior contagem de UFC.

2. Nas amostras em que houve crescimento de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. associados, a quantidade de UFC de *Streptococcus* spp. foi maior estatisticamente do que a contagem de UFC de *Staphylococcus* spp.

3. Não houve diferença entre as UFC das amostras isoladas de *Staphylococcus* spp. em cultura pura e *Streptococcus* spp. em cultura pura e as UFC de *Staphylococcus* spp. associados com *Streptococcus* spp. e as UFC de *Streptococcus* spp. associados com *Staphylococcus* spp.

4. Na presença dos microrganismos associados ou em cultura pura, houve um estímulo maior para a produção de células polimorfonucleares quando comparados ao grupo de crescimento negativo e este aumento foi significativo, isto é, a presença de microrganismos, em cultura pura ou em associação estimularam a produção de PMN.

5. Não houve diferença entre as contagens de células PMN entre as culturas puras de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

6. A CCS foi a mesma quando da comparação entre os grupos de crescimento de *Staphylococcus* spp. em cultura pura assim como *Streptococcus* spp. em cultura pura. Portanto, a intensidade do processo inflamatório não mostrou diferença entre os dois grupos de microrganismos.

7. *Staphylococcus* spp. em cultura pura estimulou um aumento maior na CCS do que quando associado ao *Streptococcus* spp.

8. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a CCS de *Staphylococcus* spp. em cultura pura e *Streptococcus* spp. em cultura pura.

9. Deve-se dar a atenção ao risco que representa a presença de microrganismos no leite, sobretudo quando se considera o hábito do consumo de leite “in natura”, podendo-se verificar em um estudo quantitativo desta natureza, a carga microbiana potencialmente capaz de ser ingerida pelo homem.

10. As frequências de mastite clínica e subclínica são parâmetros consagrados na avaliação da sanidade da glândula mamária. Tais parâmetros devem ser considerados para a

implantação de um programa de controle da mastite. Além disso, análises microbiológicas são complementares e indispensáveis em um programa de controle desta enfermidade, por possibilitarem o isolamento e a identificação do seu agente etiológico. A avaliação de amostras múltiplas e consecutivas, coletadas durante um período de tempo, para se considerar um rebanho isento desses agentes deve ser recomendada para um melhor controle da doença.

A mastite subclínica tem grande impacto na produtividade dos rebanhos leiteiros porque sua prevalência é maior que a da forma clínica e medidas para seu controle têm e devem receber grande atenção.

Mais estudos devem ser feitos em relação à mastite subclínica pelo fato de ser uma doença não erradicável, de alta prevalência, dificuldade de diagnóstico e controle e de alto prejuízo à produção leiteira e seus derivados tanto na indústria nacional como em outros países.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. C.; MENDES, C. P. A.; SILVA, D. B. Fatores determinantes da ocorrência de mastite bovina, detectada em rebanhos através da análise de leite de latões. **Higiene Alimentar**, v. 19, n. 14, p. 81-88, 2005.
- ANDERSEN, H. J.; PEDERSEN, L. H.; AARESTRUP, F. M.; CHRLEI, M. Evoluotion of the surveillance program of *Streptococcus agalactiae* in Danish dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 4, p. 1233-1239, 2003.
- ANDREWS, A. H. (Ed.). **Bovine medicine**. Great Britain: Blackwell, 1992. 922 p.
- ANTUNAC, N.; IJAVRANEK, J. L.; SAMARZIJA, D. Somatic cells and their affect on the quality and processing of milk. **Mljekarstvo, Zagreb**, v.47, n. 3, p.183-193, 1997.
- ARAÚJO, W. P. **Constituição físico-química, celular e microbiológica de leites tipo A, B e especial colhidos de vacas criadas no Estado de São Paulo. Contribuição à semiologia da glândula mamária**. 1994. 55 f. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.
- BADINI, K. B. **Estudo das características físico-químicas, microbiológicas e dos hábitos de consumo do leite cru comercializado clandestinamente nos municípios de Botucatu/SP e São Manuel/SP, 1993**. 1995. 124 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1995.
- BARBALHO, T. C. F.; 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, n. 2, p. 31-36, 2001.
- BARBOSA, C. P.; BENEDETTI, E.; RIBEIRO, S. C. A.; GUIMARÃES, E. C. Relação entre contagem de células somáticas (CCS) e os resultados do “California Mastitis Test” (CMT), no diagnóstico de mastite bovina. **Bioscience Journal**, v. 18, n. 1, p. 93-102, 2002.
- BERNING, L. M.; SHOOK, G. E. Prediction of mastitis using milksomatic cell count, N-acetyl- β -D-glucosaminidase, and lactose. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 1840-1846, 1992.

BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M. **Veterinary medicine**. 7. ed. London : Baillière Tindall, 1991. p. 501-59.

RADOSTITIS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Clínica veterinária. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.

BRITO, J. R. F.; CALDEIRA, G. A.V.; VERNEQUE, R. S. da; BRITO, M.A.V.P. Sensibilidade e especificidade do “California Mastitis Test” como recurso diagnóstico na mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 49-53, 1997.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SOUZA, H. M.; VARGAS, O. L. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 39-44, 1998.

BROCHET, M.; COUVE, E.; ZOUINE, M.; VALLAEYS, T.; RUSNIOK, C.; LAMY, M-C.; BUCHRIESER, C.; TRIEU-COUT, P.; KUNST, F.; POYART, C.; GLASER, P. Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1227-1243, 2006.

CARNEIRO, D.M.F.; DOMINGUES, P.F.; VAZ, A.K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.6, p.1934-1943, set, 2009.

COLDEBELLA, A.; MACHADO, P. F.; DEMÉTRIO, C. G. B.; RIBEIRO JÚNIOR, P. J.; MEYER, P. M.; CORASSIN, C.H.; CASSOLI, L. D. Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas confinadas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.3, p.623-634, 2004.

COLDEBELLA, A. **Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas confinadas**. 2003, 99 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2003.

COSTA, E.O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 1, n. 1, p. 3-9, 1998.

COSTA, E. O. Importância econômica da mastite bovina. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 15, n. 1, p. 21-26, 1991.

COSTA, E. O.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; PARDO, R. B.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.17, n. 4, p. 156-158, 1995.

COSTA, E. O.; GARINO, F. G.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, A. R.; SILVA, J. A.;

WATANABE, E. T.; VALLE, C. R. Estudo da etiologia das mastites bovinas nas sete principais bacias leiteiras do Estado de São Paulo. **Napgama**, v. 3, n. 4, p. 6-13, 2000.

COSTA, S. S. **Comparação entre a quantidade de unidades formadoras de colônias de microrganismos e a contagem de células somáticas em amostras de leite provenientes de glândulas mamárias de bovinos com infecção intramamária.** 2003. 84 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2003.

CARNEIRO, D. M. V. F.; DOMINGUES, P. F.; VAZ, A. K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. **Ciência Rural**, v.39, n.6, p.1934-1943, 2009.

CRAVEN, N.; WILLIAMS, M. R. Defense of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancement. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 10, p. 71-127, 1985.

DENIS, M.; PARLANE, N. A.; LACY-HULBERT, J.; SUMMERS, E. L.; BUDDLE, E. M.; WEDLOCK, D. N. Bactericidal activity of macrophages against *Streptococcus uberis* is different in mammary gland secretions of lactating and drying off cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.114, p. 111-120, 2006.

DIAS, V. C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. **Acta Veterinária Brasília**, v. 1, n. 1, p. 23-27, 2007.

DOHOO, I. R.; LESLIE, K. E. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 10, p. 225-237, 1991.

DUARTE, R.S.; MIRANDA, O.P.; BELLEI, B.C.; BRITO, M.A.V.P.; TEIXEIRA, L.M.P. Phenotypic and Molecular Characteristics of *Streptococcus agalactiae* Isolates Recovered from Milk of Dairy Cows in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 9, p.4214-4222, set, 2004.

DU PREEZ, J. H.; GIESECKE, W. H. Mastitis. In: COETZER, J. A. W. (Ed.). **Infectious diseases of livestock**. London: Oxford University Press, 1994. p. 1564-1595.

EBRAHIMI, A.; NIKOOKHAH, F.; NIKPOUR, S.; MAJIAN, F.; GHOLAMI, M. Isolation of *Streptococci* from milk samples of normal, acute and subclinical mastitis cows and determination of their antibiotic susceptibility patterns. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 1, p. 148-150, 2008.

EL BEITUNE, P.; DUARTE, G.; MAFFEI, C. M. L. Colonization by *Streptococcus agalactiae* During Pregnancy: Maternal and Perinatal Prognosis. **The Brazilian Journal of Infections Diseases**, v. 9, n. 3, p. 276-282, 2005.

FARNSWORTH, R. J. The current status of the use of bulk tank milk cultures in milk quality and mastitis control procedures. **Agri-practice**, v. 13, n. 6, p. 5-8, 1992.

FERREIRA, L. M.; FILHO, A. N.; OLIVEIRA DE, E.; ZAFALON, L. F.; SOUZA DE, V. Variedades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina. **Ciência Rural**, v. 36, n. 4, p. 1228-1234, 2006.

FERREIRA, J. L.; PIGATTO, C.P.; LINS, J.L. F. H. A.; AGUIAR FILHO, J.L. C.; CAVALCANTE, T. V. Bactérias causadoras de mastite subclínica em rebanhos leiteiros no Município de Teresina, Piauí. **Revista Científica Eletrônica**, ano VIII, n. 14, jan/2010

FONSECA, L. F. L. Programa de controle da mastite; Mastite Contagiosa definição, diagnóstico e controle. **Bovinocultura Dinâmica**. Rhodia Mérieux. ano 2, n. 4, p. 1-5, maio 1996.

GIANNECHINI, R.; CONCHA, C.; RIVERO, R.; DELUCCI, I.; LOPEZ, M. Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the west littoral region in Uruguay. *Acta veterinária scand*, v.43, n.4, 2002.

GILLESPIE, B.E.; OLIVIER, S. P. Simultaneous Detection of Mastitis Pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction. **Journal Dairy Science**, v.88, p. 3510-3518, 2005

GREEN, M. J.; BRADLEY, A. J.; MEDLEY, G. F.; BROWNE, W. J. Cow, farm, and herd management factors in the dry period associated with raised somatic cell counts in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 4, p. 1403-1415, 2008.

GREGORY, L.; BIRGEL, E. H.; HOEDEMAKER, M.; GRUNERT, E. Mastite dos bovinos: histórico de suas formas clínicas. **Revista Educação Continuada**, v. 4, f. 3, p. 31-38, 2001.

GRÖNLUND, U.; JOHANNISSON, A.; WALLER, K. P. Changes in blood and milk lymphocyte sub-populations during acute and chronic phases of *Staphylococcus aureus* induced bovine mastitis. **Research in Veterinary Science**, v. 80, p. 147-154, 2006.

HOGAN, J. S.; WHITE, D. G.; PANJEY, J. W. Effects of teat dipping on intramammary infections by staphylococci other than *Staphylococcus aureus*. **Journal of the Dairy Science**, v. 70, p. 873-879, 1990.

JACOBSSON, K. A novel family of fibrinogen-binding proteins in *Streptococcus agalactiae*. **Veterinary Microbiology**, v. 96, p. 103-113, 2003.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. C. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9. ed. Baltimore:

Willians & Wilkins, 1994. 2255 p

LANGENEGER, J.; VIANI, M. C. E.; BAHIA, M. G. Efeito do agente etiológico da mastite subclínica sobre a produção de leite. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.1, n.2, p. 47-52, 1981.

LANGONI, H.; PINTO, M.; DOMINGUES, P.F.; LISTONI, F.J.P. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 43, p. 507- 515, 1991.

LANGONI, H. SILVA, A. V.; CABRAL, K. G. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.20, N.5, p.204-209, 1998.

LANGONI, H.; ARAÚJO, W. N.; SILVA, A.V.; SOUZA, L. C. Tratamento da mastite bovina com amoxicilina e enrofloxacin bem como com sua associação. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 177-180, 2000.

LENNETTE, E. H.; BALOWS, A.; HANSLER JR., W. J.; HADOMY, H. J. **Manual of clinical microbiology**. 4. ed. Washington: American Society for Microbiology Press, 1985. 1149 p.

LESLIE, K. E.; DOHOO, I.; MEEK, A. H. Somatic cell counts in bovine milk. **The Compendium on Continuing Education**, v. 5, n. 11, p. 601-612, 1983.

LIGHTNER, J. K.; MILLER, G. Y.; HUESTON, W. D.; DORN, C. R. Estimation of the costs of mastitis, using National Animal Health Monitoring System and milk somatic cell count data. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 10, p. 1410-1413, 1988.

MARTINS, R. P.; SILVA, J. A. G.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; FILHO, E. S. A. de. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 1, p. 181-187, 2010.

McDERMOTT, M. P.; ERB, H. N.; NATZKE, R. P. Predictability by somatic cell counts related to prevalence of intramammary infection within herds. **Journal of Dairy Science**, v. 65, p. 1535 - 1539, 1982.

McDONALD, JOHN S. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 170, n. 10, v.2, p. 1157-1159, 1977.

MELVILLE, P. A.; WATANABE, E. T.; BENITES, N. R.; RIBEIRO, A. R.; SILVA, J. A.; GARINO JR., F.; COSTA, E. O. Evaluation of the susceptibility of the *Prototheca zopffi* to milk pasteurization. **Mycopathologia**, v. 146, n. 2, p. 79-82, 1999.

MILLER, G. Y.; BARTLETT, P. C.; LANCE, S. E.; ANDERSON, J.; HEIDER, L. E. Costs of clinical mastitis and mastitis prevention in dairy herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 202, n. 8, p. 1230-1236, 1993.

MULLER, E.E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. Anais do II Sul-Leite: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil / editores Geraldo Tadeu dos Santos et al. – Maringá : UEM/CCA/DZO – NUPEL, 2002. 212P. Toledo – PR, 29 e 30/08/2002.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**. 7. ed. Washington: American Society for Microbiology. 1999.

PATTISON, I. H. The progressive pathology of bacterial mastitis. **The Veterinary Record**, v. 70, n. 6, p. 114-117, 1958.

PEREIRA, A. R.; MACHADO, P. F.; BARANCELLI, G.; SILVA, L. V. F. Contagem de células somáticas e qualidade do leite. **Revista Criadores**, v. 67, n. 807, p. 19-21, 1997.

PIEPERS, S.; MEALERMEESLER, L.D.; DE KRUIF, A.; OPSOMER, G.; DE VLUEGHER, S. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. *Journal of Dairy Research*, v.74, p 478-483, 2007.

PEREIRA, A. R.; MACHADO, P. F.; BARANCELLI, G.; SILVA, L. V. F. Contagem de células somáticas e qualidade do leite. **Revista Criadores**, v. 67, n. 807, p. 19-21, 1997.

PHILPOT, W. N. Economics of mastitis control. In: JARRET, J. A. **Veterinary Clinics of North America** – Symposium on Bovine Mastitis, v. 6, n. 2, p. 233-245, 1984.

PRESCOTT, S. C.; BREED, R. S. The determination of the number of body cells in milk by a direct method. **Journal of Infection Diseases**, v. 69, n. 6, p.632-640, 1910.

PRESTES, D. S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: Fatores que influenciam – Uma Revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v. 9, n. 1, p. 48-52, 2002.

PYÖRÄLA, S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. **Veterinary Research**, v. 34, p. 565-578, 2003.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD, D. C.; GAY, C. C. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.1737 p.

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, n. 6, p. 651-658, 2003.

RENEAU, J. K. Effective use of dairy herd improvement somatic cell counts in mastitis control. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 6, p. 1708-1720, 1986.

RIBEIRO, M. E. R.; PETRINI, L. A.; AITA, M. F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF JR. W.; GOMES, J. F.; SCHIRAMM, R. C.; MARTINS, P. R.; BARBOSA, R. S. Relação entre mastite clínica e subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n. 3, p. 287-290, 2003.

ROSENBERGER, G.; DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H.; STÖBER, M.; **Exame clínico dos bovinos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 419 p.

SÁ, M. E. P.; CUNHA, M. L. R. S.; ELIAS, A. O.; VICTORIA, C.; LANGONI, H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 5, p. 320-326, 2004.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experimental and observation leading to development of California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 139, p. 199-204, 1957.

SCHALM, O. W.; CARROLL, E. J.; JAIN, N. C. **Bovine mastitis**. Philadelphia : Lea & Febiger, 1971. 360 p.

SCHEPPERS, A. J.; LAM, T. J. G. M.; SCHUKKEN, Y. H.; WILMINK, J. B. M.; HANEKAMP, W. J. A. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1833-1840, 1997.

SMITH, B. P. **Tratado de medicina interna de grandes animais**. 1. ed. São Paulo: Manole, 1994.

SMITH, B. P. **Tratado de medicina interna de grandes animais**. 1. ed. São Paulo: Manole, 1994. SOUZA, H. M.; PINTO, C. L. O.; MEURER, C. B.; ALVES, B. M. R.; LEMOS, A. M.; REIS, C. G. Mastite bovina e seus reflexos na cadeia do leite. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.28, n. 38, p.44-50, 2007.

SORDILLO, L.M.; SHOFER-WEAVER, K.; DE ROSA, D. immunology changes in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis. **Animal Journal of Veterinary Research**, v.49, n.7, p.1112-1120, 1988.

SOUZA, H. M de; PINTO, C. L. O.; MEURER, C. B.; ALVES, B. M. R.; LEMOS, A. M.; REIS, C. G. Mastite bovina e seus reflexos na cadeia do leite. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 28, n. 228, p. 44-50, 2007.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS FOR PERSONAL COMPUTERS. GRAPHPAD

INSTAT software. 1992-1998.

THIERS F. O. **Análise do conteúdo de células somáticas de amostras de leite de bovinos leiteiros em diferentes fases de lactação e do tanque de expansão de propriedades produtoras de leite do Estado de São Paulo e Minas Gerais.** 1998. 129 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

THIERS, F. O.; BENITES, N. R.; RIBEIRO, A. R.; COSTA, E. O. da. Correlação entre contagem de células somáticas e o teste de “California Mastitis Test” (CMT) no leite de vacas. **NAPGAMA**, v. 2, n. 4, p. 9-12, 1999.

ZAFALON, L.F.; , DO AMARAL, L. A.; NADER FILHO, A.; DE OLIVEIRA, J. V.; DE RESENDE, F. D.; PEREIRA, G. T. Influência do tratamento da mastite subclínica bovina sobre a contagem de células somáticas do leite. **Brasil Indústria Animal**. Nova Odessa, v.59, n.1, p.53-59, 2002.

ZAFALON, L. F.; FILHO, A. N., OLIVEIRA, J. V. de; de RESENDE, F. D. Comportamento da condutividade elétrica e do conteúdo de cloretos do leite como métodos auxiliares de diagnóstico na mastite subclínica bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 159-163, 2005.

ZAFALON, L.F., NADER FILHO². DE CARVALHO, DE LIMA A M.R.B T.M.A . Mastite subclínica bovina: teores de proteína no leite após o tratamento durante a lactação. *Arquivo do Instituto Biológico*, v.76, n.2, p.149-155, abr./jun., 2009.