SIMONE SILVEIRA DA COSTA

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

São Paulo
2003

SIMONE SILVEIRA DA COSTA

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Nilson Roberti Benites

São Paulo
2003

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1516
FMVZ

Costa, Simone Silveira da

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 / Simone Silveira da Costa. -- São Paulo : S. S. Costa, 2003.

83 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2003.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Roberti Benites.

1. Mastite animal. 2. Bovinos. 3. Leite. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: COSTA, Simone Silveira da

Título: 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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho:

Aos meus pais, Antonio e Josefina,

Que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade.
À vocês, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer que não tenho palavras para agradecer tudo isso, mas é o que me acontece agora, quando procuro uma forma verbal que exprima uma emoção ímpar, uma emoção que palavras dificilmente traduziriam.

Aos meus irmãos, Arley e Emerson,

Por todo carinho e amizade, pelo incentivo e por todas as formas de apoio.

Às minhas cunhadas, Marinalva e Rosana,

Pela atenção, confiança e por fazerem a felicidade dos meus irmãos e sobrinhos.

Aos meus sobrinhos, Andrew, Andressa e Luiza,

Pelos momentos de descontração e alegria.

Ao Luiz Carlos,

Por ter me proporcionado momentos tão doces e especiais...
Por ter me apoiado nos momentos mais difíceis.
Obrigada por dividir sua vida comigo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sua infinita grandeza.

Aos animais, essenciais para a realização deste trabalho.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, pelo prazer de sua orientação e por toda confiança, paciência e dedicação. Obrigada por aceitar o desafio. Meus sinceros agradecimentos.

À Dra. Priscilla Anne Melville, Simone Salzgerber, Regina Santos e Marcos, pelos ensinamentos em microbiologia, pelo preparo de material para o processamento das amostras e pela grande amizade.

Aos funcionários do laboratório de histopatologia do VPT, Cláudio Arroyo e Luciano Bugalho, pela coloração das lâminas, tão indispensáveis para meus resultados.

À todos os professores do VPS, especialmente ao Prof. Dr. Silvio Vasconcellos por ter me dado o primeiro estágio na USP (em 1999), mostrando-me a beleza da Medicina Veterinária Preventiva.

Aos amigos da pós-graduação (Josana, Miriam, Rosana, Mônica, Jennifer, Anna Catharina, Leslie, Felício, Roberto, Luís Ivan), à residente Daniela, e aos estagiários (Silvio, Simone, Melissa, Danielle, Bruno, Andrezza, Letícia) pela troca de aprendizado e momentos de descontração. Adoro vocês!

Às secretárias do VPS e da pós-graduação pelas ajudas de última hora.

Às bibliotecárias da FMVZ pelas correções finais desta dissertação.

Aos colegas da USP pelo carinho e amizade.

A todos os meus amigos que em algum momento compartilharam comigo a realização deste trabalho.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro indispensável ao projeto (processo 01/07910-5).

RESUMO

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. [Comparison between the colonies forming units and somatic cell counts in milk samples from bovine infected mammary glands]. 2003. 83f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Os processos inflamatórios na glândula mamária são especialmente freqüentes e importantes em bovinos leiteiros, sendo responsáveis por grandes prejuízos à pecuária leiteira. A mastite infecciosa é a mais importante doença sob o ponto de vista econômico e de saúde pública. A contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de leite proveniente diretamente de uma glândula mamária permitiria avaliar o comportamento de cada um dos agentes etiológicos da mastite infecciosa. A comparação desta informação com a contagem de células somáticas (CCS/mL) na amostra de leite permitiria uma avaliação mais acurada do processo infeccioso e inflamatório na glândula mamária. O presente trabalho teve como objetivos: avaliar o “status” microbiológico de amostras de leite de vacas em lactação que apresentaram mastite e comparar a quantidade de UFC/mL de colônias dos diferentes microrganismos com as respectivas CCS/mL, levando em consideração a diferenciação de células polimorfonucleares (PMN/mL) e mononucleares (MN/mL) nas amostras. Quinhentas e seis amostras de 15 propriedades de exploração leiteira do Estado de São Paulo, Brasil, foram submetidas aos testes de Tamis e California Mastitis Test (CMT), e realizados os exames microbiológicos, contagem de UFC/mL e CCS/mL. Destas, 112 não apresentaram crescimento de microrganismos, e das amostras com crescimento foram isolados: 94 *Corynebacterium* spp., 104 *Staphylococcus* spp., 73 *Streptococcus* spp., 36 *Prototheca zopfii*, 08 *Candida* spp., 02 *Nocardia*

spp. e 77 associações entre os microrganismos. Houve correlação entre o número de UFC/mL com a CCS/mL, assim como entre PMN/mL e entre MN/mL. Concluiu-se que existe um aumento da CCS/mL, PMN/mL e MN/mL no leite quando há um aumento das contagens de UFC/mL. As quantidades de UFC/mL no leite com isolamento de *Streptococcus* spp. foram maiores estatisticamente ($P < 0,05$) que as quantidades de UFC/mL com isolamento de *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus* spp. Concluiu-se também que, em havendo necessidade de tratamento de mastite clínica e subclínica no rebanho devido às altas contagens de UFC/mL, deve-se tratar inicialmente os quartos nos quais foram isolados *Streptococcus* spp. e deixar para uma segunda etapa ou para o processo de secagem o tratamento das mastites associadas à *Staphylococcus* coagulase-positivo, *Staphylococcus* coagulase-negativo e *Corynebacterium* spp. nessa mesma ordem.

Palavras-chave: Mastite animal. Bovinos. Leite.

ABSTRACT

COSTA, S. S. **Comparison between the colonies forming units and somatic cell counts in milk samples from bovine infected mammary glands.** [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. 83f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Mastitis is a complex pathologic condition which may have different etiology and consequences. Mastitis usually starts with the penetration of microorganisms through the teat canal towards mammary parenchyma and secretory cells, and an inflammatory response occurs due to the products of the microbial growth. The aim of this work was to evaluate the microbial status of milk samples collected from lactating cows with mastitis and comparing the colonies forming units (CFU)/mL and the somatic cell counts (SCC)/mL, taking into consideration the differentiation of polymorphonuclear (PMN/mL) and mononuclear (MN/mL) cells. From primiparous and pluriparous dairy cows, 506 milk samples were collected from 15 dairy farms located in the State of São Paulo, Southeastern Brazil. Samples were submitted to strip cup test and California Mastitis Test (CMT) and evaluated for CFU and SCC procedures. For microbial examinations, 112 (22.13%) samples were found negative and from the other 394, the following microorganisms were isolated: 94 (18.58%) *Corynebacterium* spp., 104 (20.55%) *Staphylococcus* spp., 73 (14.42%) *Streptococcus* spp., 36 (7.11%) *Prototheca zopfii*, 8 (1.60%) *Candida* spp., 2 (0.39%) *Nocardia* spp., and 77 (15.21%) associations among distinct microorganisms. Significant correlations were found between the CFU/mL and SCC/mL, and also with the PMN and MN cell countings. With the increased CFU/mL countings, it was observed the increase in SCC, PMN, and MN countings. The CFU/mL counts in samples with *Streptococcus* spp were

statistically higher ($P < 0.05$) than the ones positive for *Staphylococcus* spp. and *Corynebacterium* spp. In case of treatments of mastitis, target must be primarily oriented to treat the mammary glands showing clinical or subclinical mastitis with *Streptococcus* spp. showing high CFU/mL, and at the second stage, in case of treatment or drying the cows, therapy must be directed against coagulase-positive *Staphylococcus*, coagulase-negative *Staphylococcus* and *Corynebacterium* spp.

Key words: Animal mastitis. Bovine. Milk.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados dos exames microbiológicos realizados a partir de 506 amostras de leite de glândulas mamárias de bovinos leiteiros apresentando mastite clínica ou subclínica - São Paulo – 2003.....	42
Tabela 2 - Comparação entre as unidades formadoras de colônias por mL e número total de células (CCS), polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN) entre as amostras negativas e positivas para crescimento de microrganismos – São Paulo – 2003.....	43
Tabela 3 - Comparação entre as contagens totais de células somáticas por mL no leite de bovinos leiteiros e os escores de “California Mastitis Test” em amostras negativas ao exame microbiológico e amostras positivas com presença de <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Streptococcus</i> spp. – São Paulo – 2003.....	47
Tabela 4 - Comparação entre as quantidades de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Streptococcus</i> spp. e os escores de “California Mastitis Test” (CMT) em amostras de leite colhidas de bovinos leiteiros – São Paulo – 2003.....	52
Tabela 5 - Comparação entre as contagens celulares totais (CCS) associadas às amostras negativas ao exame microbiológico e amostras nas quais foram isolados <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Prototheca zopfii</i> e <i>Candida</i> spp. em cultura pura ou em associação – São Paulo – 2003.....	53
Tabela 6 - Comparação entre as quantidades de unidades formadoras de colônias por mililitro de leite dos microrganismos isolados de leite em cultura pura ou em associações – São Paulo – 2003.....	55
Tabela 7 - Comparação entre os valores das contagens de células somáticas (CCS/mL) associadas à presença de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positivos e <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos e entre <i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>Streptococcus dysgalactiae</i> isolados de amostras de leite de bovinos leiteiros – São Paulo – 2003.....	57
Tabela 8 - Comparação entre os valores de UFC/mL em amostras nas quais foram isolados <i>Staphylococcus</i> coagulase-positivos e <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos e entre <i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>Streptococcus dysgalactiae</i> isolados de amostras de leite de bovinos leiteiros – São Paulo – 2003.....	59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Correlação entre as unidades formadoras de colônias (UFC/mL) das 506 amostras com e sem crescimento de microrganismos e as contagens celulares totais (CCS/mL) das amostras de leite – São Paulo – 2003.....	44
Gráfico 2-	Correlação entre as unidades formadoras de colônias (UFC/mL) das 506 amostras com e sem crescimento de microrganismos e as contagens de células polimorfonucleares (PMN/mL) das amostras de leite – São Paulo – 2003.....	45
Gráfico 3-	Correlação entre as unidades formadoras de colônias (UFC/mL) das 506 amostras com e sem crescimento de microrganismos e as contagens de células mononucleares (MN/mL) das amostras de leite – São Paulo – 2003....	46
Gráfico 4-	Contagem de células somáticas (CCS/mL) das amostras negativas para isolamento de microrganismos e amostras com isolamento de <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Streptococcus</i> spp. para resultado negativo do CMT – São Paulo – 2003.....	48
Gráfico 5-	Contagem de células somáticas (CCS/mL) das amostras negativas para isolamento de microrganismos e das amostras com isolamento de <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Streptococcus</i> spp. para resultado 1+ do CMT – São Paulo – 2003.....	49
Gráfico 6-	Contagem de células somáticas (CCS/mL) das amostras negativas para isolamento de microrganismos e das amostras com isolamento de <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Streptococcus</i> spp. para resultado 2+ do CMT – São Paulo – 2003.....	50
Gráfico 7-	Contagem de células somáticas (CCS/mL) das amostras negativas para isolamento de microrganismos e das amostras com isolamento de <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Streptococcus</i> spp. para resultado 3+ do CMT – São Paulo – 2003.....	51
Gráfico 8-	Contagens celulares totais (CCS/mL) associadas às amostras negativas para exame microbiológico e amostras nas quais foram isolados <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Prototheca zopfii</i> e leveduras em cultura pura e em associações – São Paulo – 2003.....	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 9-	Comparação entre as quantidades de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) de leite dos microrganismos isolados em cultura pura e em associações – São Paulo – 2003.....	56
Gráfico 10-	Contagens de células somáticas (CCS/mL) associados à presença de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positivos, <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos, <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> e <i>Streptococcus uberis</i> isolados das amostras de leite de bovinos de propriedades leiteiras – São Paulo – 2003.....	58
Gráfico 11-	Número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) associados à presença de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positivos, <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos, <i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>Streptococcus dysgalactiae</i> isolados das amostras de leite de bovinos de propriedades leiteiras – São Paulo – 2003.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCS	contagem de células somáticas
cm ²	centímetros quadrados
CMT	California Mastitis Test
DNA	ácido desoxirribonucleico
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
HE	coloração de hematoxilina e eosina
mL	mililitros
MN	células mononucleares
NAPGAMA	Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira
No	número
PMN	células polimorfonucleares
UFC	unidades formadoras de colônias
US\$	dólar

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
<	menor
>	maior
=	igual

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	Avaliação do “status” microbiológico de amostras de leite de vacas em lactação que apresentaram ou não mastite.....	30
3.2	Contagem de unidades formadoras de colônias de microrganismos em amostras de leite de vacas em lactação que apresentaram infecção intramamária.....	31
3.3	Contagem de células somáticas em amostras de leite de vacas em lactação que apresentaram ou não infecções intramamárias.....	32
3.4	Análise estatística.....	32
4	RESULTADOS	34
5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS	74

1 - INTRODUÇÃO

A mastite é uma doença complexa que pode ter diferentes causas, graus de intensidade e variações de duração e de conseqüências (SCHALM; CARROLL; JAIN, 1971). Consiste num processo inflamatório da glândula mamária que afeta a produção leiteira tanto em qualidade quanto em quantidade e tem como características, alterações físicas, químicas e geralmente bacteriológicas do leite e também alterações patológicas no tecido glandular (BLOOD; RADOSTITS, 1991).

Os processos inflamatórios na glândula mamária são especialmente freqüentes e importantes em bovinos leiteiros, sendo responsáveis por grandes prejuízos à pecuária leiteira, pois afetam sobremaneira a produção de leite, particularmente pela redução da capacidade produtiva dos rebanhos infectados, estando entre as doenças de maior importância nos sistemas de exploração pecuária (NIEBERLE; COHRS, 1970; PHILPOT, 1984; COSTA, 1991; BOOTH, 1992).

Araújo (1994) afirma que a mastite bovina 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 das suas características, tornando-o impróprio para o consumo e industrialização, e que em vista disso, a produção do 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.

A amplitude dos prejuízos econômicos representados pela mastite foi abordada por Blosser, em 1979, que referiu o montante despendido em diferentes países com o controle e tratamento da mastite bovina, incluindo desde gastos com medicamentos e desinfetantes até descarte de animais de alto potencial genético e outros.

Segundo Costa (1998a), 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, onde a média anual chega a US\$200/vaca. O custo com a prevenção da mastite subclínica é estimada 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, 1998a).

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.

A mastite pode ocorrer como consequência de alterações fisiológicas e/ou metabólicas, traumas, alergias ou, como ocorre mais freqüentemente, associada à ação de microrganismos (infeciosa), sendo esta última a mais importante sob os pontos de vista econômico e saúde pública (COSTA, 1991).

A patogênese dos diferentes tipos de mastite infecciosa levam à 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).

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 são pouco compreendidos. 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, etc 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).

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 e utilizadas em âmbito internacional. 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 sub-clínica 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 caracteriza-se somente por aumento da celularidade (BLOOD; RADOSTITS, 1991; ANDREWS, 1992; DU PREEZ; GIESECKE, 1994; SMITH, 1994; COSTA et al., 1995).

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 *Actinomyces 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 a 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 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).

A defesa da glândula mamária 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).

São diversos os microrganismos que podem estar implicados na etiologia das infecções intramamárias em bovinos leiteiros, agentes que podem ocorrer isoladamente ou em associações – bactérias, fungos, algas e vírus (WATTS, 1988; BLOOD; RADOSTITS, 1991).

Em levantamento realizado em 1988, Watts referiu um total de 137 espécies de microrganismos associados as infecções da glândula mamária de bovinos. Em levantamentos realizados nos últimos anos no Brasil (NADER FILHO et al., 1985; COSTA et al., 1986; LANGONI; DOMINGUES; PINTO, 1991; COSTA et al., 1993; COSTA et al., 2000), foram isolados os mesmos agentes e outros, como por exemplo, *Plesiomonas* sp., não referidos por Watts (1988), demonstrando a complexidade da etiologia do processo. Poder-se-ia afirmar que, na atualidade, mais de 137 espécies de diferentes microrganismos participam da etiologia da mastite infecciosa bovina.

Dentre este vasto universo de microrganismos responsáveis pelo desencadeamento da mastite, Leslie, Dohoo e Meek (1983) consideram a existência de patógenos menores e maiores, dependendo do grau de resposta celular. Os patógenos menores, que causam baixas médias de contagens de células somáticas (CCS), seriam *Corynebacterium bovis* e algumas espécies de *Staphylococcus* (coagulase-negativos) e os mais comuns patógenos maiores (altas médias de CCS) seriam *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus* e coliformes (LESLIE; DOHOO; MEEK, 1983; RENEAU, 1986).

Pankey et al. (1985) e Woodward et al. (1998) chegam a considerar que quando os patógenos menores estão presentes na glândula mamária, esta obteria resposta leucocitária baixa

e que atuaria como um controle biológico contra as infecções causadas pelos patógenos maiores. Entretanto, outros autores citam que a influência de *Corynebacterium bovis* e *Staphylococcus* coagulase-negativos na glândula mamária não a protegeria contra infecções causadas pelos patógenos maiores (BROOKS; BARNUM; MEEK, 1983; HONKANEN-BUZALSKI; GRIFFIN; DODD, 1984; HOGAN et al., 1988; DAVIDSON et al., 1992).

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 *Actinomyces pyogenes* (REBHUN, 1995; COSTA et al., 1998b).

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 31.625 amostras de leite de 11.805 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.

Em trabalho sobre mastite micótica no Estado de São Paulo, Costa et al. (1993), realizaram exames microbiológicos em 2.078 amostras de leite colhidos de vaca leiteiras com e sem mastite, tendo sido isolados 251 fungos a partir destas amostras, sendo 82,28% destas

leveduras (*Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp., *Candida* spp., *Trichosporum cutaneum*, *Aureobasidium pullulans* e *Pichia ohmeri*) e 11,95% fungos micelianos (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Phoma*, *Epicoccum* e *Geotrichum*).

Os resultados obtidos por levantamentos epidemiológicos recentemente realizados (COSTA et al., 2000), demonstram o aspecto dinâmico do problema, tendo em vista que certas espécies de agentes causais vêm aumentando em detrimento de outras, como é o caso de *Corynebacterium bovis* e de algas do gênero *Prototheca*.

Dentre os agentes ambientais deve-se destacar o crescente índice de isolamentos de algas do gênero *Prototheca* (COSTA et al., 1996a; COSTA et al., 2000), as quais são responsáveis por quadros severos de mastite, de tratamento ainda desconhecido e cuja orientação é o descarte do animal infectado devido à alta resistência da mesma aos antimicrobianos assim como à possibilidade de transmissão para outros animais do rebanho determinando a ocorrência de surtos (KIRK, 1991; COSTA et al., 1996b; COSTA et al., 1996c).

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).

Segundo Schalm, Carroll e Jain (1971), a contagem de células somáticas (leucócitos e células epiteliais) tem sido aceita como uma das ferramentas mais importantes para determinação da presença e intensidade do processo inflamatório na glândula mamária. A quantidade e os tipos de células presentes no leite variam sob condições fisiológicas e patológicas (SCHALM; CARROLL; JAIN, 1971).

O “California Mastitis Test” ou CMT (SCHALM; NOORLANDER, 1957), é um exame bastante utilizado a campo para diagnóstico de mastite a campo. Este exame é capaz de detectar a presença de processo inflamatório na glândula mamária através do aumento das células somáticas, principalmente polimorfonucleares (PMN). 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).

Em 1910, Prescott e Breed desenvolveram um método para determinação da quantidade de células no leite, baseando-se na microscopia óptica direta. 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).

Os tipos celulares variam no leite de glândula normal e com mastite. Certos autores afirmam que os PMN neutrófilos são os tipos celulares predominantes no leite bovino normal (ZINN, 1937 apud GIESECKE; VAN DEN HEEVER, 1967, p. 18; BLACKBURN;

MACADAM, 1954; SCHÖNBERG, 1956 apud GIESECKE; VAN DEN HEEVER, 1967, p. 196-208). Outros consideram que as células epiteliais predominam, sendo que a presença de PMN neutrófilos ou eosinófilos, bem como de monócitos, podem ser indicativos de distúrbios na glândula, como a mastite (ZLOTNIK, 1947). Um terceiro grupo concorda com a predominância de células epiteliais, mas também com a existência de leucócitos no leite normal (RACKOW, 1952 apud GIESECKE; VAN DEN HEEVER, 1967, p. 18; OBIGER, 1961 apud GIESECKE; VAN DEN HEEVER, 1967, p. 18).

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 uma 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). Smith e Schultze (1964), após avaliação de 1.450 amostras de leite propuseram que 765.000 células/mL seria a concentração celular representativa do leite normal. Em 1966, no encontro do International Dairy Federation (IDF) definiu-se que um valor acima de 500.000 células/mL seria indicativo de ocorrência de mastite (SCHALM; CARROLL; JAIN, 1971).

Segundo Scheppers et al. (1997), quando a contagem de células é inferior a 10.000 células/mL, considera-se ausência de processo inflamatório na glândula mamária. Quando este valor está entre 20.000 a 500.000 células/mL, é aconselhável 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 a 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, 40%) podem indicar uma lesão crônica (BLOOD; RADOSTITS, 1991).

A contagem de células somáticas 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). No entanto, outros fatores como hora de ordenha, fração do leite, estágio de lactação, idade do animal, tipo de ordenha, intervalo de ordenha, estresse, genética, etc., interferem em menor grau na resposta celular (SCHALM; CARROLL; JAIN, 1971; LESLIE; DOHOO; MEEK, 1983; RENEAU, 1986).

Baseado no “status” da infecção da glândula mamária, Reneau (1986) afirma que os patógenos maiores favorecem altas contagens de CCS do que os patógenos menores.

Por sua vez, 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 (COSTA et al., 1995; BADINI, 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.

Segundo relatos da Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (1990), em 1986, 41% do leite produzido no Brasil era destinado ora ao consumo humano na própria fazenda, ora era vendido diretamente ao consumidor, podendo ainda ser utilizado para preparo de produtos lácteos em pequena escala ou ainda ser destinado à alimentação de bezerros. Cabe salientar ainda que, segundo estimativas do Ministério da Agricultura, o consumo de leite não fiscalizado representa 40% do total de leite consumido, sendo ingerido “in natura” ou, às vezes, após ser submetido a tratamento térmico em âmbito domiciliar (fervura). O restante do leite consumido, por sua vez, é submetido a algum tipo de tratamento térmico.

A União Européia, a fim de evitar que os requisitos sanitários estabelecidos por cada Nação para os produtos alimentares fossem utilizados para fim de protecionismo, promulgou uma série de leis que estabelecessem os requisitos mínimos necessários para a produção de leite cru: número de células somáticas igual ou menor que 400.000/mL e de bactérias igual ou menor que 100.000/mL (EU, diretrizes 92/46 para leite cru; BARBERIO; RAVAROTTO; TURILLI, 1999).

De acordo com a instrução normativa do Ministério da Agricultura, datada de 18 de setembro de 2002, foram instituídos parâmetros para avaliação da qualidade do leite cru tipo A, leite cru tipo B e leite cru tipo C, com requisitos referentes à contagem de células somáticas e contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de microrganismos, índices estes determinados a partir de amostras obtidas no tanque de refrigeração do leite. Desta forma, foram considerados para estes dois parâmetros, os seguintes valores para leite cru tipo A, leite cru tipo B e leite cru tipo C, respectivamente: máximo de 6×10^5 células somáticas/mL e máximo de 1×10^4 UFC/mL; máximo de 6×10^5 células somáticas/mL e máximo de 5×10^5 UFC/mL; e máximo de

3×10^5 UFC/mL de leite. Embora estes parâmetros não tenham sido implantados na prática, demonstraram a preocupação do Ministério da Agricultura para com a avaliação da qualidade do leite cru, a qual estaria baseada fundamentalmente na contagem de células somáticas e contagem de unidades formadoras de colônias de microrganismos.

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 do processo inflamatório na glândula mamária pode ser indicativa de presença de microrganismo no leite.

A determinação de UFC/mL 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 do 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 mamária.

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 (FOX et al., 1987; 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 (DOHOO et al., 1981; McDERMOTT; ERB; NATZKE, 1982; DOHOO; LESLIE, 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).

Uma das limitações oferecidas pelo cultivo das amostras do tanque é que podem ser identificados microrganismos como coliformes e leveduras que podem não estar infectando os quartos mamários, mas sim o equipamento de ordenha, evidenciando a necessidade de maiores cuidados higiênicos durante o processo de ordenha. Em contrapartida, a limitação da cultura de amostras de leite de quartos mamários individuais se dá pelo grande número de amostras que precisam ser examinadas, principalmente quando se faz acompanhamento de rebanhos e quando é necessário avaliar amostras repetidas vezes (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.

Como 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, 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 em nível de 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 este presente trabalho com o intuito de investigar esta correlação entre quantidade de microrganismos presentes na glândula e intensidade do processo inflamatório a eles associado.

2 - OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- Avaliação do “status” microbiológico de amostras de leite de vacas em lactação, que apresentaram ou não mastite;
- Proceder a contagem de unidades formadoras de colônias de microrganismos em amostras de leite de vacas em lactação que apresentaram infecção intramamária;
- Proceder a contagem de células somáticas em amostras de leite de vacas em lactação que apresentaram ou não infecção intramamária;
- Comparar a contagem de células somáticas com a quantidade de unidades formadoras de colônias de microrganismos em amostras de leite de vacas em lactação que apresentaram infecção intramamária.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado utilizando-se as instalações do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira (NAPGAMA) nos *campi* de São Paulo e Pirassununga, Estado de São Paulo.

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

Foram examinadas vacas primíparas e pluríparas holandesas ou mestiças, em diferentes estágios de lactação, todas pertencentes a plantéis de 15 propriedades de exploração leiteira localizadas no Estado de São Paulo.

O 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.

As 506 amostras de leite foram obtidas imediatamente antes da ordenha após cuidadosa antissepsia dos tetos. As amostras foram provenientes de glândulas mamárias das vacas em lactação que apresentaram ou não resultado positivo aos testes para detecção de mastite clínica e subclínica. O volume de cada amostra (5mL de leite) foi colhido diretamente em tubos de vidro estéreis (16x160mm com rolha de borracha nº4).

As amostras de leite foram transportadas ao laboratório em condição de refrigeração (caixas de isopor com gelo), onde foram inicialmente submetidas aos exames microbiológicos, consistindo do cultivo das mesmas em ágar sangue de carneiro (5%)¹ e também em ágar Sabouraud-dextrose² com cloranfenicol³ (100mg/L) com incubação em aerobiose, respectivamente, a 37°C com leituras a 24-96 horas e 25°C por um período mínimo de 7 dias.

Os microrganismos isolados (bactérias, algas e fungos) foram identificados de acordo com Lennete et al. (1985) e classificados segundo Camargo e Fischman (1979), Kreeger-Van-Rig (1984), Pore (1985), Krieg e Holt (1994) e Murray et al. (1999).

3.2 - Contagem de unidades formadoras de colônias de microrganismos em amostras de leite de vacas em lactação que apresentaram infecção intramamária

Foram utilizadas as amostras de leite colhidas para a etapa anterior deste estudo. A partir das amostras de leite das quais foram isolados microrganismos, foram preparadas diluições da ordem de 1/10 até a diluição 10^{-4} das mesmas em solução salina 0,85% estéril.

De cada diluição foi colhida uma alíquota de 0,1mL para cultivo (utilizando-se a técnica de *spread plate* ou espalhamento em placas) em duplicata em ágar sangue de carneiro (no caso de isolamento de bactérias), com incubação a 37°C por um período de até 96 horas, bem como em duplicata em ágar Sabouraud-dextrose (no caso de isolamento de leveduras ou algas), com incubação a temperatura ambiente por um período mínimo de 7 dias, visando a contagem de unidades formadoras de colônias.

¹ (Blood agar base – Oxoid – Hampshire – U.K.)

² (Sabouraud-dextrose-agar – Oxoid – Hampshire – U.K.)

³ (Quemisetina – Farmitalia Carlo Erba – Brasil)

3.3 - Contagem de células somáticas em amostras de leite de vacas em lactação que apresentaram ou não infecções intramamárias

As amostras de leite colhidas de vacas em lactação que apresentaram infecções intramamárias ou não foram submetidas à contagem de células somáticas em microscópio óptico comum, segundo o método de Prescott e Breed (1910), modificado com a coloração de Hematoxilina-Eosina (HE). Assim sendo, um volume de 0,01mL de leite foi distribuído em uma área de 1cm² de lâmina e, após a secagem, foi fixado em álcool metílico e corado utilizando-se a técnica de coloração por HE modificado (BENITES; MELVILLE; COSTA, 2001).

3.4 – Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o “software” GRAPHPAD INSTAT 1990-1993 para realização da mesma.

A comparação entre a quantidade de unidades formadoras de colônias/mL e o número total de CCS, número total de células PMN e número total de células mononucleares (MN) foi feita através do teste estatístico não-paramétrico de Spearman.

A comparação entre as frequências de isolamento de microrganismos frente os diferentes escores do CMT foi realizada pelo teste estatístico de Fisher.

O acompanhamento das contagens celulares e das unidades formadoras de colônias frente aos diferentes escores do CMT para os microrganismos isolados foi realizado pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis.

As comparações das contagens de células somáticas e unidades formadoras de colônias entre os microrganismos foram feitas utilizando-se o teste estatístico de Kruskal-Wallis.

A comparação entre as contagens celulares e contagens de unidades formadoras de colônias entre os grupos de microrganismos foram feitas com o método estatístico de U-Mann-Whitney.

4 - RESULTADOS

Considerando-se as 506 amostras de leite analisadas, 112 não apresentaram crescimento de bactérias, algas e/ou fungos. Nas amostras nas quais houve crescimento de microrganismos, foram isolados 94 *Corynebacterium* spp. (*C. bovis*, *C. xerosis*, *C. striatum*, *C. urealyticum*, *C. imitans*); 104 *Staphylococcus* spp. (*S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. chromogenes*, *S. intermedius*, *S. warneri*, *S. cohnii*, *S. capitis*, *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. hyicus*, *S. hominis*, *S. sciuri*, *S. saprophyticus*); 73 *Streptococcus* spp. (*S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*); 36 *Prototheca zopfii*, 08 *Candida* spp. (*C. kefir*, *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*); 02 *Nocardia* sp.; 11 associações entre *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus* spp.; 13 associações entre *Corynebacterium* spp. e *Streptococcus* spp.; 22 associações entre *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.; 06 associações entre *Corynebacterium* spp. e *Prototheca zopfii*; 02 associações entre *Staphylococcus* spp. e *Prototheca zopfii*; 01 associação entre *Streptococcus dysgalactiae* e *Prototheca zopfii*; 02 associações entre *Staphylococcus* spp. e *Candida* spp.; 03 associações entre *Corynebacterium* spp. e *Candida* spp.; 01 associação entre *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus chromogenes*; 01 associação entre *Staphylococcus xylosus* e *Pseudomonas* sp.; 13 associações entre *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.; 01 associação entre *Corynebacterium* sp., *Streptococcus dysgalactiae* e *Prototheca zopfii*; e 01 associação entre *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus sciuri* e *Candida albicans* (Tabela 1).

A quantificação de unidades formadoras de colônias/mL nas 506 amostras de leite submetidas aos exames microbiológicos obteve uma mediana de valor 6.750 UFC/mL (valor mínimo 0, e valor máximo de 801.000.000). A mediana do número total de células somáticas foi de 583.872 células/mL (0 céls/mL como valor mínimo, e de 29.180.000 céls/mL como valor máximo). A mediana do número total de células PMN foi de 464.517 céls/mL (0-28.860.000). A mediana do número total de células MN foi de 54.839 céls/mL (0-2.196.777) (Tabela 2).

A comparação do número de UFC/mL com a CCS/mL resultou em um coeficiente de correlação de Spearman ($r=0,2494$ para $P<0,0001$ (Gráfico 1). Quando comparou-se a quantidade de UFC/mL com a quantidade de PMN/mL, obteve-se um coeficiente de correlação de Spearman ($r=0,3178$ para $P<0,0001$ (Gráfico 2) e a comparação do número de UFC/mL com a quantidade de MN/mL apresentou um coeficiente de correlação de Spearman ($r=0,1659$ para $P<0,0001$ (Tabela 2) (Gráfico 3).

As frequências das amostras negativas, com crescimento de *Corynebacterium* spp., de *Staphylococcus* spp. e de *Streptococcus* spp. foram estabelecidas de acordo com resultado do CMT: para CMT negativo (51,8%, 25,0%, 12,5% e 10,7%, respectivamente); para CMT 1+ foi respectivamente, 29,5%, 29,5%, 24,8% e 16,2%; para CMT 2+ (26,5%, 19,1%, 36,8% e 17,6%, respectivamente); e para CMT 3+ os valores foram, respectivamente, 22,0%, 23,4%, 29,9% e 24,7%. A frequência de amostras negativas ao exame microbiológico foi maior estatisticamente ($P<0,05$) do que a frequência de isolamento de *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. para CMT negativo (Tabela 3).

A comparação entre as CCS/mL nas amostras negativas ao exame microbiológico com o resultado do CMT obteve valor de mediana 19.355 (0-2.341.938) para CMT negativo, 122.581 (6.452-932.259) para CMT 1+, 558.065 (6.452-1.564.518) para CMT 2+ e para CMT 3+ o valor da mediana foi de 1.470.969 (6.452-15.670.985). As quantidades totais de células/mL para CMT

negativo foram estatisticamente menores ($P<0,05$) do que quando o CMT apresentou escores 1+, 2+ e 3+. Os valores de CCS totais/mL presentes quando CMT apresentou escores 1+ e 2+ foram estatisticamente menores ($P<0,05$) que quando o CMT apresentou escore 3+ (Tabela 3).

Considerando-se as amostras nas quais foram isolados *Corynebacterium* spp., as CCS associadas ao CMT negativo tiveram mediana de 48.387 (3.226-2.341.938), para CMT 1+ a mediana foi de 193.549 (54.839-2.441.938), para CMT 2+ o valor da mediana foi 351.613 (93.548-1.464.518) e para CMT 3+ foi de 622.581 (29.032-8.541.945) (Tabela 3).

A mediana da CCS das amostras em que foram isolados *Staphylococcus* spp. quando CMT foi negativo foi de 64.516 (6.452-2.712.906), quando CMT foi 1+ a mediana foi de 396.775 (64.516-14.277.435), quando CMT foi 2+ a mediana foi de 496.775 (16.129-2.138.712) e para CMT 3+ a mediana foi 1.212.904 (45.161-7.216.137) (Tabela 3).

Nas amostras nas quais foram isolados *Streptococcus* spp. a mediana das CCS referentes a CMT negativo foi de 148.387 (45.161-9.183.881), para CMT 1+, 496.778 (109.677-3.525.810), para CMT 2+, 893.549 (96.774-7.012.911) e para CMT 3+, 2.551.616 (293.549-29.180.677) (Tabela 3).

As CCS nas amostras negativas ao exame microbiológico foram estatisticamente menores ($P<0,05$) que as CCS associadas à presença de *Streptococcus* spp., considerando-se CMT negativo (Gráfico 4). As CCS das amostras sem isolamento de microrganismos foram estatisticamente menores ($P<0,0001$) que as CCS de amostras em que foram isolados *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. para CMT 1+ (Gráfico 5). Não houve diferença estatística entre as CCS nas amostras negativas e naquelas nas quais foram isolados *Corynebacterium* spp. ou *Staphylococcus* spp. ou *Streptococcus* spp., quando considerou-se CMT 2+ (Gráfico 6). As CCS associadas à presença de *Streptococcus* spp. foram estatisticamente

maiores ($P < 0,05$) que as CCS de amostras com isolamento de *Corynebacterium* spp. ou *Staphylococcus* spp. para CMT 3+ (Gráfico 7) (Tabela 3).

As amostras nas quais foram isolados *Corynebacterium* spp. apresentaram mediana de quantidade de UFC/mL para CMT negativo de 2.375 (150-825.000), para CMT 1+ de 4.250 (150-1.850.000), para CMT 2+ de 2.550 (350-14.050) e para CMT 3+, a mediana de UFC/mL foi 3.650 (100-30.000). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as quantidades de UFC/mL associadas à presença de *Corynebacterium* spp. quando comparadas aos escores do CMT (Tabela 4).

O valor da mediana das contagens de UFC/mL das amostras nas quais foram isolados *Staphylococcus* spp. para CMT negativo foi de 6.800 (700-19.500.000), para CMT 1+ de 73.500 (1.350-275.000.000), para CMT 2+ foi de 70.500 (150-87.000.000) e para CMT 3+, a mediana de UFC/mL foi de 8.062 (50-93.500.000). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de UFC/mL de *Staphylococcus* spp. quando comparados aos escores do CMT (Tabela 4).

As amostras associadas à presença de *Streptococcus* spp. apresentaram como mediana das UFC/mL os valores de 1.207.500 (9.450-89.500.000) para CMT negativo, para CMT 1+ 61.000 (1.400-113.500.000), para CMT 2+ 122.500 (4.350-40.000.000) e para CMT 3+ a mediana do número de UFC/mL foi 136.250 (300-34.400.000). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os números de UFC/mL nas amostras em que foram isolados *Streptococcus* spp. quando comparados aos escores do CMT (Tabela 4).

Os valores de UFC/mL de *Corynebacterium* spp. foram menores estatisticamente ($P < 0,05$) que os valores de UFC/mL de *Streptococcus* spp. para CMT negativo. As quantidades de UFC/mL de *Corynebacterium* spp. foram menores estatisticamente ($P < 0,05$) que os valores de UFC/mL de *Staphylococcus* spp. ou *Streptococcus* spp. para CMT 1+, 2+ e 3+. As quantidades

de UFC/mL de *Staphylococcus* spp. foram menores estatisticamente ($P < 0,05$) que os valores de UFC/mL de *Streptococcus* spp. para CMT 3+ (Tabela 4).

A mediana das CCS/mL no leite quando não houve isolamento de microrganismos foi de 170.968 céls/mL (0-15.670.985), associadas à presença de *Corynebacterium* spp. foi de 270.968 céls/mL (3.226-8.541.945), com isolamento de *Staphylococcus* spp. foi de 719.356 céls/mL (6.452-14.277.435), quando associadas à presença de *Streptococcus* spp. foi de 1.174.195 céls/mL (45.161-29.180.677), associadas à *Prototheca zopfii* foi de 3.990.327 céls/mL (158.065-23.012.928), com a presença de *Candida* spp. foi de 1.451.614 céls/mL (6.452-3.522.584), com *Corynebacterium* spp. associado a *Staphylococcus* spp. a mediana foi de 270.968 céls/mL (19.355-2.738.713), com *Corynebacterium* spp. associado a *Streptococcus* spp. a mediana obteve valor 274.194 céls/mL (6.452-6.212.910), com *Staphylococcus* spp. em associação com *Streptococcus* spp. a mediana foi de 474.194 céls/mL (100.000-5.303.232), e para a associação entre *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. a mediana foi de 1.203.227 céls/mL (38.710-12.206.465) (Tabela 5) (Gráfico 8).

Observou-se que as CCS em amostras de leite nas quais não houve isolamento de microrganismos e naquelas associadas à presença de *Corynebacterium* spp., foram estatisticamente menores ($P < 0,05$) do que quando houve isolamento de *Staphylococcus* spp. ou *Streptococcus* spp. ou *Prototheca zopfii*. As CCS totais nas amostras com isolamento de *Staphylococcus* spp. foram estatisticamente menores ($P < 0,05$) do que quando houve isolamento de *Prototheca zopfii* (Tabela 5).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as CCS nas amostras de leite quando *Corynebacterium* spp. estava associado com *Staphylococcus* spp., ou com *Streptococcus* spp. ou a *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. (Tabela 5).

Não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre as CCS totais nas amostras de leite nas quais foram isoladas associações entre *Staphylococcus* spp. e *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. associado com *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. associado com *Corynebacterium* spp. e *Streptococcus* spp. (Tabela 5).

As CCS associadas à presença de *Streptococcus* spp. foram estatisticamente maiores ($P<0,05$) que quando *Streptococcus* spp. estava associado a *Corynebacterium* spp. (Tabela 5).

Os valores de UFC/mL associados à presença de *Corynebacterium* spp. apresentaram como mediana o valor de 3.225 (100-1.850.000), para *Staphylococcus* spp. o valor de 25.750 (50-275.000.000), para *Streptococcus* spp. o valor de 128.000 (300-113.500.000), *Prototheca zopfii* o valor de 69.125 (150-7.150.000) e para *Candida* spp. valor de 35.700 (350-1.020.000) (Tabela 6) (Gráfico 9). Os números de UFC/mL nas amostras em que foram isolados *Corynebacterium* spp. foram estatisticamente menores ($P<0,05$) quando comparados com as quantidades de UFC/mL nas amostras nas quais foram isolados *Staphylococcus* spp. ou *Streptococcus* spp. ou *Prototheca zopfii*. As quantidades de UFC/mL associadas à *Streptococcus* spp. foram estatisticamente maiores ($P<0,0001$) que as associadas a *Staphylococcus* spp. (Tabela 6).

As quantidades de UFC/mL de *Corynebacterium* spp. associados a *Staphylococcus* spp. foram de 4.950 (150-3.000.000); de *Corynebacterium* spp. associado a *Streptococcus* spp. foram de 1.900 (100-5.950); e de *Corynebacterium* spp. em associação com *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. foram de 950 (200-3.100) (Gráfico 9). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as quantidades de UFC/mL de *Corynebacterium* spp. quando associado à *Staphylococcus* spp. ou *Streptococcus* spp. e entre *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. (Tabela 6).

Os valores de UFC/mL de *Staphylococcus* spp. quando associado a *Corynebacterium* spp. apresentaram mediana de 3.000 (250-14.500.000); quando associado a *Streptococcus* spp.

obtiveram valor de 61.500 (850-1.500.000), e *Staphylococcus* spp. associado a *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. obtiveram mediana para UFC/mL de 5.400 (500-55.500) (Tabela 6) (Gráfico 9). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as UFC/mL de *Staphylococcus* spp. quando associado à *Corynebacterium* spp., também quando associado a *Streptococcus* spp. e quando associado a *Corynebacterium* spp. e *Streptococcus* spp. (Tabela 6).

As quantidades de UFC/mL de *Streptococcus* spp. quando associado com *Corynebacterium* spp. apresentaram mediana de 10.500 (200-8.100.000); quando associado com *Staphylococcus* spp. obtiveram valor de mediana igual a 182.000 (1.850-39.000.000); e *Streptococcus* spp. associado a *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus* spp. obteve mediana de UFC/mL de 18.500 (800-100.000) (Tabela 6) (Gráfico 9). Os valores de UFC/mL de *Streptococcus* spp. foram maiores estatisticamente ($P < 0,05$) que os valores de UFC/mL de *Streptococcus* spp. quando associado a *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus* spp. Os valores de UFC/mL de *Streptococcus* spp. quando associado a *Staphylococcus* spp. foram estatisticamente maiores ($P < 0,05$) que os de *Streptococcus* spp. em associação com *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus* spp. (Tabela 6).

Os valores de CCS/mL quando associados a *Staphylococcus* coagulase-positivos foi de 767.743 céls/mL (16.129-7.167.750) e quando associados a *Staphylococcus* coagulase-negativos foi de 538.710 céls/mL (6.452-14.277.435) (Tabela 7) (Gráfico 10). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as CCS associadas a *Staphylococcus* coagulase-positivos e *Staphylococcus* coagulase-negativos (Tabela 7).

A mediana das CCS/mL de leite associadas a presença de *Streptococcus agalactiae* foi de 1.322.582 (96.774-14.864.532) e para *Streptococcus dysgalactiae* foi de 1.138.711 (45.161-

29.180.677) (Tabela 7) (Gráfico 10). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as CCS associadas a presença de *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae* (Tabela 7).

A mediana dos valores de UFC/mL em amostras nas quais foram isolados *Staphylococcus* coagulase-positivos foi de 70.500 (750-18.350.000) e naquelas na quais foram isolados *Staphylococcus* coagulase-negativos foi de 6.800 (50-275.000.000) (Tabela 8) (Gráfico 11). Os valores de UFC/mL em amostras com isolamento de *Staphylococcus* coagulase-positivos foi maior estatisticamente ($P < 0,05$) que o valor de UFC/mL nas amostras com isolamento de *Staphylococcus* coagulase-negativos (Tabela 8).

Os valores de UFC/mL associados a presença de *Streptococcus agalactiae* tiveram mediana igual a 221.750 (4.350-35.500.000) e associados a presença de *Streptococcus dysgalactiae* a mediana foi de 68.500 (300-113.500.000). Não houve diferença estatística entre os valores de UFC/mL em amostras nas quais foram isolados *Streptococcus agalactiae* quando comparados com *Streptococcus dysgalactiae* (Tabela 8).

Tabela 1 - Resultados dos exames microbiológicos realizados a partir de 506 amostras de leite de glândulas mamárias de bovinos leiteiros apresentando mastite clínica ou subclínica - São Paulo – 2003

Resultado do exame microbiológico	No	%
Negativo	112	22,13
<i>Corynebacterium</i> spp.	94	18,58
<i>Staphylococcus</i> spp.	104	20,55
<i>Streptococcus</i> spp.	73	14,42
<i>Prototheca zopfii</i>	36	7,11
<i>Candida</i> spp.	8	1,60
<i>Nocardia</i> spp.	2	0,39
<i>Corynebacterium</i> spp. e <i>Staphylococcus</i> spp.	11	2,17
<i>Corynebacterium</i> spp. e <i>Streptococcus</i> spp.	13	2,57
<i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Streptococcus</i> spp.	22	4,34
<i>Corynebacterium</i> spp. e <i>Prototheca zopfii</i>	6	1,20
<i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Prototheca zopfii</i>	2	0,39
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> e <i>Prototheca zopfii</i>	1	0,20
<i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Candida</i> spp.	2	0,39
<i>Corynebacterium</i> spp. e <i>Candida</i> spp.	3	0,60
<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus chromogenes</i>	1	0,20
<i>Staphylococcus xylosus</i> e <i>Pseudomonas</i> sp.	1	0,20
<i>Corynebacterium</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Streptococcus</i> spp.	13	2,57
<i>Corynebacterium</i> sp., <i>Streptococcus dysgalactiae</i> e <i>Prototheca zopfii</i>	1	0,20
<i>Corynebacterium bovis</i> , <i>Staphylococcus sciuri</i> e <i>Candida albicans</i>	1	0,20
Total	506	100,00

Tabela 2 - Comparação entre as unidades formadoras de colônias por mL e número total de células (CCS), polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN) entre as amostras negativas e positivas para crescimento de microrganismos – São Paulo - 2003

	No	Mediana	Mínimo	Máximo
UFC/mL	506	6.750	0	801.000.000
Total de células	506	583.872 ^a	0	29.180.000
Total PMN	506	464.517 ^b	0	28.860.000
Total MN	506	54.839 ^c	0	2.196.777

a = coeficiente de correlação (r)=0,2494 para P<0,0001

b = coeficiente de correlação (r)=0,3178 para P<0,0001

c = coeficiente de correlação (r)=0,1659 para P<0,0001

Gráfico 1 - Correlação entre as unidades formadoras de colônias (UFC/mL) das 506 amostras com e sem crescimento de microrganismos e as contagens celulares totais (CCS/mL) das amostras de leite – São Paulo - 2003

Gráfico 2- Correlação entre as unidades formadoras de colônias (UFC/mL) das 506 amostras com e sem crescimento de microrganismos e as contagens de células polimorfonucleares (PMN/mL) das amostras de leite – São Paulo - 2003

Gráfico 3 - Correlação entre as unidades formadoras de colônias (UFC/mL) das 506 amostras com e sem crescimento de microrganismos e as contagens de células mononucleares (MN/mL) das amostras de leite – São Paulo - 2003

Tabela 3 - Comparação entre as contagens totais de células somáticas por mL no leite de bovinos leiteiros e os escores de “California Mastitis Test” em amostras negativas ao exame microbiológico e amostras positivas com presença de *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. – São Paulo – 2003

<div> <div>Escore de CMT</div> <div>Resultado microbiológico</div> </div>		Negativo	1+	2+	3+
Negativo	No	29 (51,8%) ^a	31 (29,5%)	18 (26,5%)	34 (22,0%)
	Mediana	19.355 ^b	122.581 ^c	558.065 ^d	1.470.969
	Mínimo	0	6.452	6.452	6.452
	Máximo	2.341.938	932.259	1.564.518	15.670.985
<i>Corynebacterium</i> spp.	No	14 (25,0%)	31 (29,5%)	13 (19,1%)	36 (23,4%)
	Mediana	48.387	193.549	351.613	622.581
	Mínimo	3.226	54.839	93.548	29.032
	Máximo	2.341.938	2.441.938	1.464.518	8.541.945
<i>Staphylococcus</i> spp.	No	7 (12,5%)	26 (24,8%)	25 (36,8%)	46 (29,9%)
	Mediana	64.516	396.775	496.775	1.212.904
	Mínimo	6.452	64.516	16.129	45.161
	Máximo	2.712.906	14.277.435	2.138.712	7.216.137
<i>Streptococcus</i> spp.	No	6 (10,7%)	17 (16,2%)	12 (17,6%)	38 (24,7%)
	Mediana	148.387	496.778	893.549	2.551.616 ^e
	Mínimo	45.161	109.677	96.774	293.549
	Máximo	9.183.881	3.525.810	7.012.911	29.180.677

a = a frequência de amostras negativas para crescimento microbiano foi maior estatisticamente ($P < 0,05$) do que a frequência de isolamento de *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. para CMT negativo

b = as CCS nas amostras negativas ao exame microbiológico foram estatisticamente menores ($P < 0,05$) que as CCS nas amostras nas quais foram isolados *Streptococcus* spp. para CMT negativo

c = as CCS nas amostras negativas ao exame microbiológico foram estatisticamente menores ($P < 0,0001$) que as CCS de amostras em que foram isolados *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. para CMT 1+

d = não houve diferença estatística entre as CCS nas amostras negativas e naquelas nas quais foram isolados *Corynebacterium* spp. ou *Staphylococcus* spp. ou *Streptococcus* spp., quando considerou-se CMT 2+

e = as CCS associadas à presença de *Streptococcus* spp. foram estatisticamente maiores ($P < 0,05$) que as CCS de amostras com isolamento de *Corynebacterium* spp. ou *Staphylococcus* spp. para CMT 3+

Gráfico 4 – Contagem de células somáticas (CCS/mL) das amostras negativas para isolamento de microrganismos e amostras com isolamento de *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. para resultado negativo do CMT – São Paulo - 2003

Gráfico 5 - Contagem de células somáticas (CCS/mL) das amostras negativas para isolamento de microrganismos e das amostras com isolamento de *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. para resultado 1+ do CMT – São Paulo - 2003

Gráfico 6 - Contagem de células somáticas (CCS/mL) das amostras negativas para isolamento de microrganismos e das amostras com isolamento de *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. para resultado 2+ do CMT – São Paulo - 2003

Gráfico 7 - Contagem de células somáticas (CCS/mL) das amostras negativas para isolamento de microrganismos e das amostras com isolamento de *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. para resultado 3+ do CMT – São Paulo - 2003

Tabela 4 - Comparação entre as quantidades de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. e os escores de “California Mastitis Test” (CMT) em amostras de leite colhidas de bovinos leiteiros – São Paulo – 2003

<div> <div>Escore de CMT</div> <div></div> </div>		0	1+	2+	3+
Resultado microbiológico					
<i>Corynebacterium</i> spp.	No	14	31	13	36
	Mediana	2.375 ^{a,d}	4.250 ^e	2.550	3.650
	Mínimo	150	150	350	100
	Máximo	825.000	1.850.000	14.050	30.000
<i>Staphylococcus</i> spp.	No	7	26	25	46
	Mediana	6.800 ^b	73.500	70.500	8.062 ^f
	Mínimo	700	1.350	150	50
	Máximo	19.500.000	275.000.000	87.000.000	93.500.000
<i>Streptococcus</i> spp.	No	6	17	12	38
	Mediana	1.207.500 ^c	61.000	122.500	136.250
	Mínimo	9.450	1.400	4.350	300
	Máximo	89.500.000	113.500.000	40.000.000	34.400.000

a = não houve diferença estatisticamente significativa entre as quantidades de UFC/mL associadas à presença de *Corynebacterium* spp. quando comparadas aos escores do CMT

b = não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de UFC/mL de *Staphylococcus* spp. quando comparados aos escores do CMT

c = não houve diferença estatisticamente significativa entre os números de UFC/mL nas amostras em que foram isolados *Streptococcus* spp. quando comparados aos escores do CMT

d = os números de UFC/mL de *Corynebacterium* spp. foram menores estatisticamente ($P < 0,05$) que os valores de UFC/mL de *Streptococcus* spp. para CMT negativo

e = as quantidades de UFC/mL de *Corynebacterium* spp. foram menores estatisticamente ($P < 0,05$) que os valores de UFC/mL de *Staphylococcus* spp. ou *Streptococcus* spp. para CMT 1+, 2+ e 3+

f = as quantidades de UFC/mL de *Staphylococcus* spp. foram menores estatisticamente ($P < 0,05$) que os valores de UFC/mL de *Streptococcus* spp. para CMT 3+

Tabela 5 - Comparação entre as contagens celulares totais (CCS) associadas às amostras negativas ao exame microbiológico e amostras nas quais foram isolados *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Prototheca zopfii* e *Candida* spp. em cultura pura ou em associação – São Paulo – 2003

Contagem de células somáticas				
Resultado do exame microbiológico	No	Mediana	Mínimo	Máximo
Negativo	112	170.968 ^a	0	15.670.985
<i>Corynebacterium</i> spp.	94	270.968 ^{b,d}	3.226	8.541.945
<i>Staphylococcus</i> spp.	104	719.356 ^{c,e}	6.452	14.277.435
<i>Streptococcus</i> spp.	73	1.174.195 ^f	45.161	29.180.677
<i>Prototheca zopfii</i>	36	3.990.327	158.065	23.012.928
<i>Candida</i> spp.	8	1.451.614	6.452	3.522.584
<i>Coryne</i> spp./ <i>Staphylo</i> spp.	11	270.968	19.355	2.738.713
<i>Coryne</i> spp./ <i>Strepto</i> spp.	13	274.194	6.452	6.212.910
<i>Staphylo</i> spp./ <i>Strepto</i> spp.	21	474.194	100.000	5.303.232
<i>Strepto</i> spp./ <i>Staphylo</i> spp./ <i>Coryne</i> spp.	13	1.203.227	38.710	12.206.465

Strepto = *Streptococcus*; *Coryne* = *Corynebacterium*; *Staphylo* = *Staphylococcus*

a = na ausência de crescimento de microrganismos, as quantidades totais de células somáticas foram estatisticamente menores ($P < 0,05$) do que quando houve isolamento de *Staphylococcus* spp. ou *Streptococcus* spp. ou *Prototheca zopfii*

b = as quantidades totais de células somáticas em amostras nas quais foram isolados *Corynebacterium* spp. foram estatisticamente menores ($P < 0,05$) do que quando houve isolamento de *Staphylococcus* spp. ou *Streptococcus* spp. ou *Prototheca zopfii*

c = as quantidades totais de células somáticas em amostras de leite com presença de *Staphylococcus* spp. foram estatisticamente menores ($P < 0,05$) do que quando houve isolamento de *Prototheca zopfii*.

d = não houve diferença estatisticamente significante entre as contagens celulares do leite quando *Corynebacterium* spp. estava associado com *Staphylococcus* spp., ou com *Streptococcus* spp. ou a *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

e = não houve diferença estatisticamente significante entre as contagens de células somáticas totais nas amostras de leite nas quais foram isoladas associações entre *Staphylococcus* spp. e *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. associados com *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. associado com *Corynebacterium* spp. e *Streptococcus* spp.

f = as CCS em amostras com presença de *Streptococcus* spp. foram estatisticamente maiores ($P < 0,05$) que quando estes agentes estavam associados a *Corynebacterium* spp.

Gráfico 8 – Contagens celulares totais (CCS/mL) associadas às amostras negativas para exame microbiológico e amostras nas quais foram isolados *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Prototheca zopfii* e *Candida* spp. em cultura pura e em associações – São Paulo - 2003

Coryne = *Corynebacterium*; Staphylo = *Staphylococcus*; Strepto = *Streptococcus*

Tabela 6 - Comparação entre as quantidades de unidades formadoras de colônias por mililitro de leite dos microrganismos isolados de leite em cultura pura ou em associações – São Paulo – 2003

Quantidade de UFC/mL de leite				
Microrganismos isolados	No	Mediana	Mínimo	Máximo
<i>Corynebacterium</i> spp.	94	3.225 ^{a,c}	100	1.850.000
<i>Staphylococcus</i> spp.	104	25.750 ^{b,d}	50	275.000.000
<i>Streptococcus</i> spp.	73	128.000 ^e	300	113.500.000
<i>Prototheca zopfii</i>	36	69.125	150	7.150.000
<i>Candida</i> spp.	8	35.700	350	1.020.000
<i>Coryne</i> spp./ <i>Staphylo</i> spp.	11	4.950	150	3.000.000
<i>Coryne</i> spp./ <i>Strepto</i> spp.	13	1.900	100	5.950
<i>Coryne</i> spp./ <i>Staphylo</i> spp./ <i>Strepto</i> spp.	13	950	200	3.100
<i>Staphylo</i> spp./ <i>Coryne</i> spp.	11	3.000	250	14.500.000
<i>Staphylo</i> spp. / <i>Strepto</i> spp.	21	61.500	850	1.500.000
<i>Staphylo</i> spp./ <i>Coryne</i> spp./ <i>Strepto</i> spp.	13	5.400	500	55.500
<i>Strepto</i> spp./ <i>Coryne</i> spp.	13	10.500	200	8.100.000
<i>Strepto</i> spp./ <i>Staphylo</i> spp.	21	182.000 ^f	1.850	39.000.000
<i>Strepto</i> spp./ <i>Staphylo</i> spp./ <i>Coryne</i> spp.	13	18.500	800	100.000

Strepto = *Streptococcus*; *Staphylo* = *Staphylococcus*; *Coryne* = *Corynebacterium*

a = os valores de UFC/mL associados a presença de *Corynebacterium* spp. foram estatisticamente menores ($P < 0,05$) quando comparados com *Staphylococcus* spp. ou *Streptococcus* spp. ou *Prototheca zopfii*

b = os valores de UFC/mL associados a presença de *Streptococcus* spp. foram estatisticamente maiores ($P < 0,0001$) que aqueles associados a presença de *Staphylococcus* spp.

c = não houve diferença estatisticamente significativa entre as quantidades de UFC/mL de *Corynebacterium* spp. quando em associação com *Staphylococcus* spp. ou *Streptococcus* spp. e quando em associação com *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

d = não houve diferença estatisticamente significativa entre as quantidades de UFC/mL de *Staphylococcus* spp. quando em associação com *Corynebacterium* spp., quando em associação com *Streptococcus* spp. e quando associado com *Corynebacterium* spp. e *Streptococcus* spp.

e = as quantidades de UFC/mL de *Streptococcus* spp. foram estatisticamente maiores ($P < 0,05$) que os valores de UFC/mL de *Streptococcus* spp. quando associados a *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus* spp.

f = os valores de UFC/mL de *Streptococcus* spp. associados a *Staphylococcus* spp. foram maiores estatisticamente ($P < 0,05$) que os valores de UFC/mL de *Streptococcus* spp. quando associados a *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus* spp.

Gráfico 9 - Comparação entre as quantidades de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) de leite dos microrganismos isolados em cultura pura e em associações – São Paulo - 2003

Coryne = *Corynebacterium*; Staphylo = *Staphylococcus*; Strepto = *Streptococcus*

Tabela 7 - Comparação entre os valores das contagens de células somáticas (CCS/mL) associadas à presença de *Staphylococcus* coagulase-positivos e *Staphylococcus* coagulase-negativos e entre *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae* isolados de amostras de leite de bovinos leiteiros – São Paulo – 2003

Contagem de células somáticas				
Microrganismos isolados	No	Mediana	Mínimo	Máximo
<i>Staphylococcus</i> coagulase-positivo	51	767.743 ^a	16.129	7.167.750
<i>Staphylococcus</i> coagulase-negativo	53	538.710	6.452	14.277.435
<i>Streptococcus agalactiae</i>	32	1.322.582 ^b	96.774	14.864.532
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	40	1.138.711	45.161	29.180.677
<i>Streptococcus uberis</i>	1	341.936	341.936	341.936

a = não houve diferença estatística entre os valores de CCS associados às amostras nas quais foram isolados *Staphylococcus* coagulase-positivos quando comparadas com aquelas nas quais foram associados a *Staphylococcus* coagulase-negativos

b = não houve diferença estatística entre os valores de CCS associados às amostras nas quais foram isolados *Streptococcus agalactiae* com as amostras associadas a *Streptococcus dysgalactiae*

Gráfico 10 - Contagens de células somáticas (CCS/mL) associados à presença de *Staphylococcus* coagulase-positivos, *Staphylococcus* coagulase-negativos, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis* isolados das amostras de leite de bovinos de propriedades leiteiras – São Paulo - 2003

Staphylo = *Staphylococcus*; Strepto = *Streptococcus*

Tabela 8 - Comparação entre os valores de UFC/mL em amostras nas quais foram isolados *Staphylococcus* coagulase-positivos e *Staphylococcus* coagulase-negativos e entre *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae* isolados de amostras de leite de bovinos leiteiros – São Paulo – 2003

Quantidade de UFC/mL de leite Microorganismos isolados	No	Mediana	Mínimo	Máximo
<i>Staphylococcus</i> coagulase-positivo	51	70.500 ^a	750	18.350.000
<i>Staphylococcus</i> coagulase-negativo	53	6.800	50	275.000.000
<i>Streptococcus agalactiae</i>	32	221.750 ^b	4.350	35.500.000
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	40	68.500	300	113.500.000
<i>Streptococcus uberis</i>	1	3.350.000	3.350.000	3.350.000

a = os valores de UFC/mL em amostras nas quais foram isolados *Staphylococcus* coagulase-positivos foram estatisticamente maiores ($P < 0,0052$) que os valores de UFC/mL em amostras nas quais foram isolados *Staphylococcus* coagulase-negativo

b = não houve diferença estatística entre os valores de UFC/mL em amostras nas quais foram isolados *Streptococcus agalactiae* quando comparados com *Streptococcus dysgalactiae*

Staphylo = *Staphylococcus*; Strepto = *Streptococcus*

Gráfico 11 – Número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) associados à presença de *Staphylococcus* coagulase-positivos, *Staphylococcus* coagulase-negativos, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae* isolados das amostras de leite de bovinos de propriedades leiteiras – São Paulo - 2003

Staphylo = *Staphylococcus*; Strepto = *Streptococcus*

5 - DISCUSSÃO

A mastite tem sido investigada há mais de 100 anos, mas o progresso para seu controle tem sido lento (DODD, 1983). Isto se dá porque a mastite é causada por mais de 137 diferentes espécies de microrganismos (bactérias, fungos, vírus e algas) (LANGONI; DOMINGUES; PINTO, 1981; NADER FILHO et al., 1985; COSTA et al., 1986; WATTS, 1988; COSTA et al., 1993; COSTA et al., 2000) que apresentam patogenicidade diversificada interferindo no tipo de sintomatologia de mastite infecciosa (BLOOD; RADOSTITS, 1991).

No geral, elevadas contagens de células somáticas resultam em baixas produções leiteiras por unidade animal, por volta de 20% em decorrência da mastite (LESLIE; DOHOO; MEEK, 1983). A redução na produção leiteira é apenas uma das muitas perdas associadas com a mastite, pois o descarte de leite, custo com medicamentos, visita de veterinários, análises laboratoriais, reposição de plantel e perda de potencial genético também podem ser considerados (DOBBINS, 1977).

Um estudo em 92 rebanhos no Sudoeste da França revelou que de um total de 151 amostras de mastite clínica, 48 eram estéreis e *Escherichia coli* (29%) e *Streptococcus uberis* (23%) foram os agentes mais isolados em culturas puras, e que entre 326 amostras de mastite subclínica, as espécies mais freqüentes foram *Staphylococcus aureus* (15%), *Streptococcus uberis* (17%), *Staphylococcus* coagulase-negativos (15%) e *Streptococcus agalactiae* (13%) (FABRE et al., 1991).

Costa et al. (1996d) estudando 19.912 glândulas mamárias de 33 cidades dos Estados de São Paulo e Minas Gerais, verificaram a alta ocorrência de *Streptococcus* spp. (41,44%), *Staphylococcus* spp. (38,87%) e *Corynebacterium* spp. (25,71%), e em menor ocorrência os fungos (4,64%), algas do gênero *Prototheca* (5,63%), Enterobacteriaceae (1,68%), *Nocardia* spp. (1,48%) e *Plesiomonas* spp. (0,09%).

Em Minas Gerais, a análise microbiológica de 6.315 amostras de leite originárias de 48 rebanhos, permitiram o isolamento dos seguintes agentes: *Staphylococcus aureus* (19,2%), *Staphylococcus* coagulase-negativos (12,4%), *Streptococcus agalactiae* (6,9%), *Streptococcus* esculina-positivos (4,0%), *Streptococcus* esculina-negativos (2,1%), *Corynebacterium* sp. (55,2%), leveduras (0,1%) e *Pseudomonas* sp. (0,1%) (BRITO et al., 1999).

O presente estudo revelou a elevada ocorrência de *Corynebacterium* spp. (18,58%), *Staphylococcus* spp. (20,55%) e *Streptococcus* spp. (14,42%), e com menor frequência de isolamento *Prototheca* (7,11%), *Candida* spp. (1,60%) e *Nocardia* spp. (0,39%) (Tabela 1).

O padrão de infecção deste trabalho está de acordo com os resultados das pesquisas realizadas no Brasil (ARAÚJO, 1994; COSTA et al., 1996d; BRITO et al., 1999), diferente do trabalho de Fabre et al. (1991) que não houve isolamento de *Corynebacterium* sp.

A patogenia de *Corynebacterium* spp. não está totalmente esclarecida. Sua importância se dá pela moderada resposta celular e pela pouca perda de produtividade leiteira (BROOKS; BARNUM; MEEK, 1983; NGATIA; JENSEN; BERG, 1991; THIERS, 1998). Alguns autores (PANKEY et al., 1985; WOODWARD et al., 1998) consideraram que quando *Corynebacterium* spp. está presente na glândula mamária atua de forma a protegê-la contra bactérias patogênicas. No entanto, outros autores consideram esta afirmação incorreta (HONKANEN-BUZALSKI; GRIFFIN; DODD, 1984; DAVIDSON et al., 1992).

A taxa de infecção de *Corynebacterium* spp. foi de 18,58% (Tabela 1) e ficou próxima ao resultado de Brooks, Barnun e Meek (1983) que obtiveram uma taxa de infecção de 19,9% para *Corynebacterium bovis* no rebanho leiteiro de Ontario.

Muitos trabalhos enfocam a importância da *Prototheca* spp. como agente associado à mastite no rebanho por aumentar a resposta celular e ser responsável por quadros severos de mastite, de tratamento ainda desconhecido e cuja orientação é o descarte do animal infectado devido à alta resistência do mesmo aos antimicrobianos, assim como à possibilidade de transmissão para outros animais do rebanho determinando a ocorrência de surtos (KIRK, 1991; COSTA et al., 1996b; COSTA et al., 1996c).

Costa et al. (1996e) constatou a incidência de 14,55% de *Prototheca* sp. em 107 amostras dos animais em lactação de uma fazenda do Estado de São Paulo.

Em outro estudo, Costa et al. (1996f), constatou a presença de *Prototheca* sp. em 5,95% das 21 amostras de secreção dos quartos mamários dos animais de uma fazenda de leite B do Estado de Minas Gerais.

O agente ambiental, a alga *Prototheca* sp. apresentou frequência de 7,30% em algumas das amostras de leite de rebanhos leiteiros no Estado de São Paulo (Tabela 1). Apesar da incidência baixa quando comparado com o trabalho de Costa et al. (1996e), a presença deste agente ambiental vem aumentando nos rebanhos nacionais em decorrência de má higienização das instalações e defeitos na higiene das tetas no momento da ordenha (COSTA et al., 1996e).

Freqüentemente observa-se presença de mastites relacionadas a associações entre microrganismos, porém com frequência de isolamento menor do que as mastites associadas à cultura pura de microrganismos (BALDASSI et al., 1991; COSTA, 1991; LANGONI; DOMINGUES; PINTO, 1991; ARAÚJO, 1994; COSTA et al., 1995; THIERS, 1998; BENITES et al., 2002).

O presente estudo está de acordo com os autores acima citados verificando que entre as associações de microrganismos estudadas obteve-se: *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus* spp. (2,17%); *Corynebacterium* spp. e *Streptococcus* spp. (2,57%); *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. (4,34%); *Corynebacterium* spp. e *Prototheca* sp. (1,20%); *Staphylococcus* sp. e *Prototheca* sp. (0,39%); *Streptococcus dysgalactiae* e *Prototheca zopfii* (0,20%); *Staphylococcus* spp. e *Candida* spp. (0,39%); *Corynebacterium* spp. e *Candida* spp. (0,60%); *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus chromogenes* (0,20%); *Staphylococcus xylosus* e *Pseudomonas* sp. (0,20%); *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. (2,57%); *Corynebacterium* sp., *Streptococcus dysgalactiae* e *Prototheca zopfii* (0,20%); e *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus sciuri* e *Candida albicans* (0,20%) (Tabela 1).

No passado, pouco se sabia à respeito da epidemiologia e patogenia das infecções intramamárias por *Staphylococcus* coagulase-negativos, por serem considerados patógenos secundários ou menores e, portanto, de pouca importância para o controle da mastite (HOGAN; WHITE; PANJEY, 1987; WARD; SCHULTZ, 1972).

Ward e Schultz (1972) colocam grupo de *Staphylococcus* coagulase-negativos em importância na mastite uma vez que origina lesão extensa no úbere.

Atualmente, os estudos com tais agentes têm sido relevantes pela frequência em rebanhos mundiais onde se pratica o “dipping” e o tratamento da vaca seca (HOLMBERG, 1973; BRAMLEY, 1975; TIMMS; SCHULTZ, 1987; WATTS, 1988; NICKERSON; BODDIE, 1994; THIERS, 1998; BRABES et al., 1999; ZAFALON et al., 1999; BENITES et al., 2002).

Benites et al. (2002) verificaram, em estudo histopatológico e microbiológico de processos inflamatórios de 184 glândulas mamárias de animais enviados ao abate, 99 espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos (53,8%) e 14 espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivos (7,6%).

Thiers (1998) identificou 28 espécies de *Staphylococcus* spp. pertencentes ao grupo dos *Staphylococcus* coagulase-positivos e 73 espécies pertencentes ao grupo dos *Staphylococcus* coagulase-negativos.

No presente estudo, a presença de *Staphylococcus* coagulase-positivos (10,97%) na glândula mamária ficou muito próxima dos *Staphylococcus* coagulase-negativos (10,47%) (Tabelas 7 e 8).

Deve-se destacar a importância de *Staphylococcus* coagulase-positivos como um grupo de microrganismos que pode causar danos à saúde humana e animal e que, através dos alimentos pode ser responsabilizado por casos de intoxicação alimentar pela eliminação de enterotoxinas (ARAÚJO, 1984).

Thiers (1998) estudando a contagem de células somáticas dos animais de 10 propriedades leiteiras de São Paulo, verificou que a contagem de células somáticas das amostras com isolamento de microrganismos (mediana, 290.323 céls/mL) foi maior quando comparada com as negativas (mediana igual a 25.807 céls/mL).

Araújo (1994) quando avaliou 144 amostras de leite de fazendas do Estado de São Paulo obteve como valores médios da contagem de células somáticas, $319.833/\text{mL} \pm 22.042$ em amostras de leite tipo B e $316.750/\text{mL} \pm 57.998$, em amostras de leite especial, sendo estes significativamente maiores quando comparados com os valores obtidos para amostras do leite tipo A ($114.375/\text{mL} \pm 22.042$). Nesse mesmo trabalho, observou-se que 31 (64,6%), 11 (22,9%) e 17 (35,5%) dos animais examinados, pertencentes às fazendas produtoras dos leites tipo A, B e especial, apresentavam contagens de células somáticas inferiores a 100.000/mL e, ainda que, respectivamente, 2 (4,2%), 10 (20,8%) e 8 (16,7%), revelavam contagens superiores a 500.000 células por mililitro de leite (ARAÚJO, 1994).

Diversos pesquisadores propuseram uma quantidade máxima de céls/mL no leite de glândulas normais, que varia de 50.000 a 1.500.000/mL (SCHALM; CARROLL; JAIN, 1971; WARD; SCHULTZ., 1972; ÖSTENSSON; HAGELTORN; ÅSTRÖM, 1988; SCHEPPERS et al., 1997).

Neste trabalho, a CCS/mL para as amostras negativas foi 170.968 céls/mL (Tabela 5), estando tal valor compreendido entre os limites descritos pelos autores supracitados.

Thiers (1998) referiu que a mediana das CCS/mL associada a *Staphylococcus* coagulase-negativo foi de 703.227 céls/mL, não sendo significativo com o número de células associadas à *Staphylococcus* coagulase-positivo (mediana, 617.743 céls/mL). Esta referência confirma o resultado deste trabalho em que não houve significância entre os grupos destes microrganismos (mediana de 757.743 céls/mL associadas a *Staphylococcus* coagulase-positivo e mediana de 538.710 céls/mL associadas a *Staphylococcus* coagulase-negativo) (Tabela 7).

Thiers (1998) concluiu que não houve diferença estatística entre os valores de CCS/mL associados a *Streptococcus agalactiae* (2.293.551) e *Streptococcus dysgalactiae* (3.448.391).

No presente trabalho, os valores de CCS associados a *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae* também não tiveram diferença estatística (mediana de 1.322.582 para o primeiro, e 1.138.711 para o segundo) (Tabela 7).

No estudo de Brito et al. (1999) em 6.315 amostras de leite de 48 rebanhos bovinos de Minas Gerais, o isolamento de *Staphylococcus aureus* ocorreu após resultado de CMT negativo, traço, 1+, 2+ e 3+ das amostras. O mesmo ocorreu com *Staphylococcus* coagulase-negativo, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus* esculina-positivos, *Streptococcus* esculina-negativos e *Corynebacterium* sp. No presente estudo, as amostras negativas para isolamento de microrganismos e as amostras com isolamento de *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. e

Streptococcus spp. também cresceram em amostras que obtiveram os diferentes escores do CMT (Tabela 3) (Gráficos 4, 5, 6 e 7).

Em 10 propriedades leiteiras, Thiers (1998) concluiu que o número de células somáticas no leite das amostras em que foram isolados os microrganismos *Staphylococcus* coagulase-negativo, *Staphylococcus* coagulase-positivo, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus* coagulase-positivo associado a *Corynebacterium* spp. foi maior em relação as amostras negativas para isolamento microbiológico.

Neste trabalho, na ausência de crescimento de microrganismos e quando houve isolamento de *Corynebacterium* spp., as quantidades totais de células somáticas foram estatisticamente menores ($P < 0,05$) do que quando houve isolamento de *Staphylococcus* spp. ou *Streptococcus* spp. ou *Prototheca zopfii*; as quantidades totais de células somáticas em amostras de leite com presença de *Staphylococcus* spp. foram estatisticamente menores ($P < 0,05$) do que quando houve isolamento de *Prototheca zopfii*; não houve diferença estatisticamente significativa entre as contagens celulares do leite quando *Corynebacterium* spp. estava associado com *Staphylococcus* spp., ou com *Streptococcus* spp. ou a *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. Também não houve diferença estatisticamente significativa entre as contagens de células somáticas totais nas amostras de leite nas quais foram isoladas associações entre *Staphylococcus* spp. e *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. associados com *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. associados com *Corynebacterium* spp. e *Streptococcus* spp. E finalmente, as CCS/mL em amostras com presença de *Streptococcus* spp. foram estatisticamente maiores ($P < 0,05$) que quando estes agentes estavam associados a *Corynebacterium* spp. (Tabela 5).

Thiers (1998), ao acompanhar o nível de células somáticas de 14 animais em lactação, identificou que os resultados de CMT negativo, 1+, 2+ e 3+ das amostras de leite correspondiam a medianas de CCS/mL, respectivamente, a 40.323, 219.355, 769.356 e 1.661.292.

No presente estudo, além de associar os agentes ao resultado do CMT, avaliou-se a intensidade do processo inflamatório através da CCS, verificando-se que: as CCS nas amostras negativas ao exame microbiológico foram estatisticamente menores ($P < 0,05$) que as CCS nas amostras em que foram isolados *Streptococcus* spp. para CMT negativo; as CCS nas amostras negativas ao exame microbiológico foram estatisticamente menores ($P < 0,0001$) que as CCS de amostras em que foram isolados *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. para CMT 1+; não houve diferença estatística entre as CCS nas amostras negativas e naquelas nas quais foram isolados *Corynebacterium* spp. ou *Staphylococcus* spp. ou *Streptococcus* spp., quando considerou-se CMT 2+; e que as CCS associadas à presença de *Streptococcus* spp. foram estatisticamente maiores ($P < 0,05$) que as CCS de amostras com isolamento de *Corynebacterium* spp. ou *Staphylococcus* spp. para CMT 3+ (Tabela 3).

A frequência de amostras negativas para crescimento microbiano foi maior estatisticamente ($P < 0,05$) do que a frequência de isolamento de *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. para CMT negativo (Tabela 3).

Alguns estudos referem a utilização de diferentes critérios para determinação de infecção intramamária natural baseados em contagem de unidades formadoras de colônias de microrganismos no leite sem, entretanto, descrever o modo como foram estabelecidos ou definidos estes critérios (BROOKS; BARNUM; MEEK, 1983; MATTILA; PYÖRÄLÄ; SANDHOLM, 1986; DAVIDSON et al., 1992; DETILLEUX et al., 1999). Outros estudos estipularam valores de UFC para infecção experimental dos tetos (BUELOW et al., 1996; FOX; CUMMING; 1996; SHOSHANI et al., 2000) visando estudar o dano tissular, mudanças dermatológicas nos tetos, resistência dos agentes e tempo de produção de células somáticas.

Shoshani et al. (2000) avaliaram a resposta da glândula mamária no que se refere ao dano tissular e o tempo de produção de células somáticas quando inocularam duas cepas de

Staphylococcus aureus com diferentes concentrações de número de unidades formadoras de colônias. Obtiveram uma leve mastite clínica quando inocularam 5.000 UFC/mL de *Staphylococcus aureus* Newbould 305 e 1.000 UFC/mL de *Staphylococcus aureus* 0053, concluindo que é provável que determinadas cepas e o número de UFC presentes na glândula mamária possam não provocar danos tissulares na mesma dependendo do estágio de lactação.

Um estudo realizado em três rebanhos leiteiros em Minas Gerais demonstrou que as médias das contagens totais de bactérias variaram entre 10.000 e 40.000 UFC/mL, sendo considerados baixos em comparação às exigências para o leite cru no Brasil, que estabelece atualmente, 500.000 UFC/mL para leite tipo B (BRITO, 2001).

Os valores médios obtidos por Araújo (1994) para a contagem padrão em placa para crescimento de bactérias mesófilas (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp.) de 144 amostras colhidas no Estado de São Paulo foram 4.593 UFC/mL $\pm$ 2.872, 2.503 UFC/mL $\pm$ 431 e 1.780 UFC/mL $\pm$ 467, respectivamente, para os tipos A, B e especial, não sendo detectado diferenças estatisticamente significantes entre esses valores.

Sears et al. (1990) inocularam experimentalmente 20 a 200 UFC/mL da cepa ATCC 29740 de *Staphylococcus aureus* em 21 quartos mamários. Consideraram que o padrão da difusão da contaminação com contagens menores ou iguais a 1.000 UFC/mL era baixa e que o padrão da difusão com contagens maiores ou iguais a 2.000 UFC/mL era alta, mas não compararam as UFC com os valores registrados de CCS/mL que indicavam a intensidade do processo inflamatório.

Prototheca sp. obteve mediana de 69.125 UFC/mL (150-7.150.000) elevada e foi maior que a mediana das UFC de *Corynebacterium* spp. (Tabela 6).

A comparação entre os valores de UFC/mL de *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae* isolados de amostras de leite de bovinos leiteiros mostraram que não houve

diferença estatística entre estes grupos de microrganismos (valor de mediana igual a 221.750 para o primeiro, e 68.500 para o segundo) (Tabela 8). No entanto, as UFC/mL em amostras nas quais foram isolados *Staphylococcus* coagulase-positivos (70.500) foram estatisticamente maiores ($P<0,0052$) que os valores de UFC/mL em amostras nas quais foram isolados *Staphylococcus* coagulase-negativos (6.800) (Tabela 8) (Gráfico 11).

Pela inexistência de trabalhos que comparem a intensidade do processo inflamatório com a quantidade de unidades formadoras de colônias dos agentes presentes na glândula mamária, os dados do presente estudo demonstram que há um aumento da CCS/mL, PMN/mL e MN/mL do leite quando há um aumento das UFC/mL, porém, devido ao coeficiente de correlação baixo (0,2494 para CCS; 0,3178 para PMN e 0,1659 para MN), entende-se que outros fatores estariam interferindo simultaneamente nas quantidades de UFC/mL de leite e nas contagens celulares de leite de glândulas mamárias com mastite (Tabela 2) (Gráficos 1, 2 e 3).

Os resultados do presente trabalho apóiam a assertiva de Leslie, Dohoo e Meek (1983) em que o principal fator que influencia o nível de células somáticas no leite é a infecção. Outros fatores tais como: idade, estágio da lactação, estação do ano, estresse, são de menor importância se a glândula estiver infectada.

Outros dados não citados em literaturas anteriores são com relação a comparação entre as quantidades de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) dos microrganismos *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. e os escores de CMT em amostras de leite. No presente estudo tal comparação mostrou que: não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de UFC/mL de *Corynebacterium* spp. ou *Staphylococcus* spp. ou *Streptococcus* spp. quando comparadas aos escores do CMT; os números de UFC/mL de *Corynebacterium* spp. foram menores estatisticamente ($P<0,05$) que os valores de UFC/mL de *Streptococcus* spp. para CMT negativo; as quantidades de UFC/mL de

Corynebacterium spp. foram menores estatisticamente ($P<0,05$) que os valores de UFC/mL de *Staphylococcus* spp. ou *Streptococcus* spp. para CMT 1+, 2+ e 3+; e as quantidades de UFC/mL de *Staphylococcus* spp. foram menores estatisticamente ($P<0,05$) que os valores de UFC/mL de *Streptococcus* spp. para CMT 3+ (Tabela 4).

Pela inexistência de referências bibliográficas com relação às quantidades de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) para os microrganismos isolados puros, e como não foram encontradas citações quando estes estão associados a outros agentes na glândula mamária, concluiu-se que: os valores de UFC/mL associados a presença de *Corynebacterium* spp. foram estatisticamente menores ($P<0,05$) quando comparados com *Staphylococcus* spp. ou *Streptococcus* spp. ou *Prototheca zopfii*; os valores de UFC/mL associados a presença de *Streptococcus* spp. foram estatisticamente maiores ($P<0,0001$) que aqueles associados a presença de *Staphylococcus* spp.; não houve diferença estatisticamente significativa entre as quantidades de UFC/mL de *Corynebacterium* spp. quando em associação com *Staphylococcus* spp. ou a *Streptococcus* spp. e quando em associação com *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.; não houve diferença estatisticamente significativa entre as quantidades de UFC/mL de *Staphylococcus* spp. quando em associação com *Corynebacterium* spp., quando em associação com *Streptococcus* spp. e quando associado com *Corynebacterium* spp. e *Streptococcus* spp.; as quantidades de UFC/mL de *Streptococcus* spp. foram estatisticamente maiores ($P<0,05$) que os valores de UFC/mL de *Streptococcus* spp. quando associados a *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus* spp. E por fim, os valores de UFC/mL de *Streptococcus* spp. associados a *Staphylococcus* spp. foram maiores estatisticamente ($P<0,05$) que os valores de UFC/mL de *Streptococcus* spp. quando associado a *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus* spp. (Tabela 6) (Gráfico 9).

Os valores de contagens de unidades formadoras de colônias obtidos nesta pesquisa foram apresentados na Tabela 6. Todavia, deve-se salientar que o número de bactérias nos leites que são transportados para a usina, onde serão submetidos ao processo de esterilização, podem aumentar consideravelmente, caso não haja condições ideais de conservação, pois o binômio tempo x temperatura no momento do transporte pode favorecer a multiplicação dos microrganismos, tornando o produto impróprio para industrialização.

Os programas de controle de mastite nos rebanhos leiteiros podem se constituir em referências para medida de desclassificação do leite, e podem se basear na contagem total de células/mL e/ou na quantidade de unidades formadoras de colônias de microrganismos/mL de leite. Ao se considerar a contagem de células totais, o tratamento da mastite infecciosa deve iniciar-se no quarto onde há isolamento de *Streptococcus* spp., seguido de *Staphylococcus* spp. e por último *Corynebacterium* spp. Nos quartos em que forem isoladas *Prototheca* spp. a indicação é o descarte do animal ou a cauterização do teto afetado.

Entretanto, se for escolhida a medida de desclassificação pela contagem de unidades formadoras de colônias, deve-se tratar inicialmente os quartos com isolamento de *Streptococcus* spp., depois os quartos com isolamento de *Staphylococcus* coagulase-positivo, *Staphylococcus* coagulase-negativo, e por fim, *Corynebacterium* spp. Havendo isolamento de *Prototheca* spp. a indicação é a mesma sugerida no parágrafo anterior.

6 - CONCLUSÕES

- Em relação à influência dos gêneros dos microrganismos responsáveis pela etiologia da mastite nas propriedades leiteiras estudadas, os resultados da presente pesquisa permitiram detectar diferenças significantes ($P < 0,05$) entre os níveis de células/mL por leite e o número de UFC/mL nas amostras com isolamento puro e associações de microrganismos.
- Conclui-se que há um aumento da CCS, PMN e MN do leite quando há um aumento das UFC/mL, porém, devido ao coeficiente de correlação baixo (0,2494 para CCS; 0,3178 para PMN e 0,1659 para MN), entende-se que outros fatores relacionados ao próprio animal (idade, estágio da lactação, genética, etc.) e ao ambiente externo (estresse, variações diurnas, manejo, etc.) estão interferindo simultaneamente nas UFC/mL de leite e conseqüentemente nas contagens celulares de leite de glândulas mamárias com mastite.
- As UFC/mL de *Streptococcus* spp. foram maiores estatisticamente ($P < 0,05$) que as UFC de *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus* spp. Baseado nesse resultado, o presente estudo permite concluir que se houver necessidade de tratamento de mastite clínica e subclínica no rebanho devido às altas contagens de UFC/mL, deve-se tratar inicialmente os quartos nos quais foram isolados *Streptococcus* spp. e deixar para uma segunda etapa ou para o processo de secagem o tratamento das mastites associadas à *Staphylococcus* coagulase-positivo, *Staphylococcus* coagulase-negativo e *Corynebacterium* spp. nessa mesma ordem.

REFERÊNCIAS*

ANDREWS, A. H. (Ed.). **Bovine medicine**. Great Britain: Blackwell. 1. ed. 1992. 922p.

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. 55f. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

ARAÚJO, W. P. ***Staphylococcus aureus* em leite cru. Produção de enterotoxina e caracterização da origem provável, humana ou bovina, a partir de cepas isoladas**. 1984. 127f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1984.

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. 124p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1995.

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

BARBERIO, A.; RAVAROTTO, L.; TURILLI, C. Programa de luta contra a mastite bovina realizado no nordeste da Itália (região do Veneto). **Napgama**, v. 2, n. 6, p. 7-11, 1999.

BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; COSTA, E. O. Modificação da técnica de contagem de células somáticas de Prescott e Breed utilizando-se a coloração de Hematoxilina e Eosina. **Napgama**, v. 4, n. 3, p. 6-9.

BENITES, N. R.; GUERRA, J. L.; MELVILLE, P. A.; COSTA, E. O. Aetiology and histopathology of bovine mastitis of spontaneous occurrence. **Journal of Veterinary Medicine**, B 49, p. 366-370, 2002.

BERNING, L. M.; SHOOK, G. E. Prediction of mastitis using milk somatic cell count, N-acetyl- β -D-glucosaminidase, and lactose. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 7, p. 1840-1846, 1992.

* Conforme as diretrizes para apresentação de dissertações e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 4. ed. São Paulo: FMVZ-USP, 2003. 84p.

BLACKBURN, P. S.; MACADAM, I. The cells in bovine milk. **Journal of Dairy Research**, v. 21, n. 1, p. 31-36, 1954.

BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M. Mastitis. In: _____. **Veterinary Medicine**. 7. ed. London: Baillière Tindall, 1991. p.501-559.

BLOSSER, T. H. Economic losses from and the National Research Program on Mastitis in the United States. **Journal of Dairy Science**, v. 62, n. 1, p. 119-127, 1979.

BOOTH, J. M. The importance and costs of mastitis in Europe. In: ATTI INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BOVINE MASTITIS, Milão, 1992. p.8-11.

BRABES, K. C. S.; CARVALHO, E. P.; DIONÍSIO, F. L.; PEREIRA, M. L.; GARINO Jr, F.; COSTA, E. O. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas do gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos Estados de São Paulo e Minas Gerais, **Napgama**, v. 2, n. 3, p. 4-11, 1999.

BRAMLEY, A. J. Infection of the udder with coagulase-negative micrococci and *Corynebacterium bovis*. Proceedings. Seminar on mastitis Control, Doc. 85, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, p. 377-381, 1975.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002. Aprovar os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos a esta Instrução Normativa. Publicado no **Diário Oficial da União** de 20/09/2002. Disponível em: <http://200.252.165.21/das/dipoa/in_51b_2002.htm> Acesso em: 11 de set. 2003.

BRITO, J. R. F. Diagnóstico e gestão da qualidade na produção de leite. **Relatório Técnico da Embrapa Gado de Leite**, Juiz de Fora-MG, nov. 1999/2000. Embrapa-Gado de leite, n. 81, 2001.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V. M. O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 2, p. 129-135, 1999.

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, jan/mar, 1998.

BROOKS, B. W.; BARNUM, D. A.; MEEK, A. H. An observational study of *Corynebacterium bovis* in selected Ontario dairy herds. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 47, n. 1, p. 73-78. 1983.

BUELOW, K. L.; THOMAS, C. B.; GOODGER, W. J.; NORLUND, K. V.; COLLINS, M. T. Effect of milk sample collection strategy on the sensitivity and specificity of bacteriologic culture and somatic cell count for detection of *Staphylococcus aureus* intramammary infection on dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 26, n. 1, p. 1-8, feb, 1996.

CAMARGO, Z. P.; FISCHMAN, O. Use of morpho-physiological characteristics for differentiation of the species of *Prototheca*. **Sabouraudia**, v. 17, n. 3; p. 275-278, 1979.

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

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.; CARCIOFI, A. C.; MELVILLE, P. A.; PRADA, M. S.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T. Bovine mastitis due to algae of the genus *Prototheca* sp. **Mycopathologia**, v. 133, p. 85-88, 1996a.

COSTA, E. O.; CARCIOFI, A. C.; MELVILLE, P. A.; PRADA, M. S.; SCHALCH, U. *Prototheca* sp. Outbreak of bovine mastitis. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 43, n. 6, p. 321-324, 1996b.

COSTA, E. O.; COUTINHO, S. D.; CASTILHO, W.; TEIXEIRA, C. M.; GANDRA, C. R. P.; GAMBALE, W. Etiologia bacteriana de mastite bovina no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Microbiologia**, v. 17, n. 2, p. 107-112, 1986.

COSTA, E. O.; GANDRA, C. R.; PIRES, M. F.; COUTINHO, S. D.; CASTILHO, W.; TEIXEIRA, C. M. Survey on bovine mycotic mastitis in dairy herds in the State of São Paulo, Brasil. **Mycopathologia**, v. 124, p. 13-17, 1993.

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, E. O.; MELVILLE, P. A.; BENITES, N. R.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T.; SILVA, J. A. B.; GARINO JR, F. *Prototheca zopfii*: sensibilidade “in vitro”. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 24., 1996, Goiânia, Brasil, **Anais**. 1996c. p. 124.

COSTA, E. O.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T. Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 45, n. 2, p. 65-71, 1998b.

COSTA, E. O.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T.; SILVA, J. A. B., GARINO Jr, F.; BENITES, N. R.; VENZON, P. Bovine clinical mastitis aetiological. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 19., Edinburg, Escócia, 08 a 12 de julho de 1996d. **Proceedings**. p.203-205.

COSTA, E. O.; RIBEIRO, A. R.; GARINO Jr, F.; SILVA, J. A. B.; PARDO, R. B. Mastite bovina por agentes ambientais: *Pseudomonas* sp., *Plesiomonas* sp. e *Prototheca* sp. **Semina: Ci. Agri.**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 22-25, mar, 1996f.

COSTA, E. O.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T.; PARDO, R. B.; SILVA, J. B.; SANCHES, R. B. An increased incidence of mastitis caused by *Prototheca* species and *Nocardia* species on a farm in São Paulo, Brazil. **Veterinary Research Communications**, v. 20, p. 237-241, 1996e.

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

DAVIDSON, T. J.; DOHOO, I. A.; DONALD, A. W.; HARIHARAN, H.; COLLINS, K. A cohort study of coagulase negative staphylococcal mastitis in selected dairy herds in Prince Edward Island. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 56, n. 4, p. 275-280, 1992.

DETILLEUX, J.; ARENDT, J.; LOMBA, F.; LEROY, P. Methods for estimating areas under receiver-operating characteristic curves: illustration with somatic-cell scores in subclinical intramammary infections. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 41, n. 2/3, p. 75-88, 1999.

Direttiva 92/46/CEE del Consiglio delle Comunità Europee del 16 giugno 1992 che stabilisce le norme sanitarie per la produzione e la commercializzazione di latte crudo, di latte trattato termicamente e di prodotti a base di latte. **Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee** N.L 268 del 14.9.92, p.1-32, 1992.

DOBBINS, C. N. Jr. Mastitis losses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 170, n. 10, p. 1129-1132, 1977.

DODD, F. H. Mastitis – progress on control. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 8, p. 1773-1780, 1983.

DOHOO, I. R.; LESLIE, K. E. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 10, n. 3, p. 225-237, 1991.

DOHOO, I. R.; MEEK, A. H.; MARTIN, S. W.; BARNUM, D. A. Use of total and differential somatic cell counts from composite milk samples to detect mastitis in individual cows. **Canadian Journal Comparative Medicine**, v. 45, n. 1, p. 8-14, 1981.

DU PREEZ, J. H.; GIESECKE, W. H. Mastitis. In: COETZER, J. A. W.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. **Infectious diseases of livestock**. London: Oxford University Press, 1994. v. 2, p. 1564-1595.

FABRE, J. M.; BERTHELOT, X.; LEBRET, P.; BLANC, M. F.; BLANC, M. C. Estimation de la fréquence des différents germes responsables d'infections mammaires en élevage bovin laitier dans le Sud-ouest de la France. **Revue Méd. Vét.**, v. 142, n. 11, p. 823-829, 1991.

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.

FOX, L.K.; CUMMING, M.S. Relationship between thickness, chapping and *Staphylococcus aureus* colonization of bovine teat tissue. **Journal of Dairy Research**. v. 63, n. 3. p. 369-375, 1996.

FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; WEENS, C. W.; TOMA, W.; CHANG, E. The effect of intramammary antibiotic therapy at calving on udder health traits. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 8, p. 1696-1700, 1987.

GIESECKE, W. H.; VAN DEN HEEVER, L. W. The diagnosis of mastitis by direct and indirect cytological methods. **Journal of South African Veterinary Medical Association**, v. 38, n. 1, p. 16-21, 1967.⁴

GRAPHPAD INSTAT software. Statistical analysis systems for personal computers, 1990-1993.

HOGAN, J. S.; SMITH, K. L.; TODHUNTER, D. A.; SCHOENBERGER, P. S. Rate of environmental mastitis in quarters infected with *Corynebacterium bovis* and *Staphylococcus* species. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 9, p. 2520-2525, 1988.

HOGAN, J. S.; WHITE, D. G.; PANJEY, J. W. Effects of teat dipping on intramammary infections by staphylococci other than *Staphylococcus aureus*. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 4, p. 873-879, 1987.

HOLMBERG, O. *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Stockholm, Sweden, p. 10-144, 1973. suppl. 45.

HONKANEN-BUZALSKI, T.; GRIFFIN, T. K.; DODD, F. H. Observations on *Corynebacterium bovis* infection of the bovine mammary gland. I. Natural infection. **Journal of Dairy Research**, v. 51, n. 3, p. 371-378, 1984.

JAIN, N. C. Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 62, n. 1, p. 128-134, 1979.

KIRK, J. H. Diagnosis and treatment of difficult mastitis cases. **Agri-practice**, v. 12, n. 1, p. 5-8, 1991.

KREEGER-VAN-RIG, N. J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1984.

⁴ OBIGER, G. Kieler Milchw. Forsch.-Ber., v. 13, p. 293, 1961.

RACKOW, H. G. Kieler Milchw. Forsch.-Ber., v. 4, p. 595, 1952.

SCHÖNBERG, F. Milchkunde und Milchhygiene. 7. Aufl. Hannover, M. & H. Schaper.

ZINN, E. Vet.-Diss. Berlin, 1937.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. C. **Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1994. 2298p.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; PINTO, M. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 43, n. 6, p. 507-515, 1991.

LENNETE, E. H.; BALOWS, A.; HANSLER JR, W. J.; SHADOMY, H. J. **Manual of Clinical Microbiology**. 4. ed. Washington: American Society for Microbiology Press, 1985. 1149p.

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.

MATTILA, T.; PYÖRÄLÄ, S.; SANDHOLM, M. Comparison of milk antitrypsin, albumin, n-acetyl- β -D-glucosaminidase, somatic cells and bacteriological analysis as indicators of bovine subclinical mastitis. **Veterinary Research Communications**. v. 10, n. 2, p. 113-124, 1986.

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, n. 8, p.1535-1539, 1982.

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 zopfii* 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.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7. ed. Washigton: American Society for Microbiology. 1999. 1773p.

NADER FILHO, A.; SCHOKEN-ITURRINO, R. P.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; CEMBRANELLI, E. M. Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Ribeirão Preto, São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 5, n. 4, p. 3-6, 1985.

NGATIA, T. A.; JENSEN, N. E.; BERG, B. B. Changes in the bovine udder quarters naturally infected by *Corynebacterium bovis*. **British Vet. Journal**, v. 147, n. 5, p. 463-468, 1991.

NICKERSON, S. C.; BODDIE, R. L. Effect of naturally occurring coagulase-negative staphylococcal infections on experimental challenge with major mastitis pathogens. **Journal of the Dairy Science**, v. 77, n. 9, p. 2526-2536, 1994.

NIEBERLE, K.; COHRS, P. **Anatomia patológica especial dos animais domésticos**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1970. p.257-283.

OLIVER, S. P.; KING, S. H.; LEWIS, M. J.; TORRE, P. M.; MATTHEWS, K. R.; DOWLES, H. H. Efficacy of chlorhexidine as a postmilking teat disinfection for the prevention of bovine mastitis during lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 8, p. 2230-2235, 1990.

ÖSTENSSON, K.; HAGELTORN, M.; ÅSTRÖM, G. Differential cell counting in fraction-collected milk from dairy cows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 29, p. 493-500, 1988.

PANKEY, J. W.; NICKERSON, S. C.; BODDIE, R. L.; HOGAN, J. S. Effects of *Corynebacterium bovis* infections on susceptibility to major mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 2684-2693, 1985.

PATTISON, I. H. The progressive pathology of bacterial mastitis. **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.

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.

PORE, R. S. Prototheca taxonomy. **Mycopathologia**, v. 90, p. 129-139, 1985.

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

REBHUN, W. C. Diseases of the teats and udder. In: **Diseases of dairy cattle**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1995. p. 253-308.

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.

ROBERSON, J. R.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; GAY, C. C.; BESSER, T. E. Coagulase-positive *Staphylococcus* intramammary infections in primiparous dairy cows. **Journal of dairy Science**, v. 77, n. 4, p. 958-969, 1994.

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

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

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 130, n. 5, p. 199-207, 1957.

SCHEPERS, A. J.; LAM, T. J. G. M.; SCHUKKEN, Y. H.; WILMINK, J. B. M.; HANEKAMP, J. W. A. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 1833-1840, 1997.

SEARS, P. M.; SMITH, B. S.; ENGLISH, P. B.; HERER, P. S.; GONZALEZ, R. N. Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 10, p. 2785-2789, 1990.

SHOSHANI, E.; LEITNER, G.; HANOCHI, B.; SARAN, A.; SHPIGEL, N. Y.; BERMAN, A. Mammary infection with *Staphylococcus aureus* in cows: progress from inoculation to chronic infection and its detection. **Journal of Dairy Research**, v. 67, n. 2, p. 155-169, 2000.

SMITH, B. P. **Tratado de medicina interna de grandes animais**. 1. ed. São Paulo: Manole, 1994. 1738 p.

SMITH, J. W.; SCHULTZE, W. D. Cell count variations in milk from bacteria-free and clinically normal individual quarters. **Journal of Dairy Science**, v. 47, n. 6, p. 696, 1964.

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. 129f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1998.

TIMMS, L. L.; SCHULTZ, L. H. Dynamics and significance of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections. **Journal of Dairy Science**. v. 70, n. 12, p. 2648-2657, 1987. Suplemento 1.

WARD, G. E.; SCHULTZ, L. H. Relationship of somatic cells in quarter milk to type of bacteria and production. **Journal of Dairy Science**. v. 55, n. 10, p. 1428-1431, 1972.

WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 41-66, 1988.

WOODWARD, W. D.; WARD, A. C. S.; FOX, L. K.; CORBEIL, L. A. Teat skin normal flora and colonization with mastitis pathogen inhibitors. **Veterinary Microbiology**, v. 17, p. 357-365, 1988.

ZAFALON, L. F.; AMARAL, L. A.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J. V.; RESENDE, F. D.; OLIVEIRA, J. A. Influência de bactérias do gênero *Corynebacterium* e estafilococos coagulase positivos e negativos sobre a contagem de células somáticas e a produção láctea de quartos mamários com mastite subclínica. **Napgama**, v. 2, n. 6, p. 4-6, 1999.

ZLOTNIK, I. Types of cells present in cow's milk. **Journal of Comparative Pathology**, v. 57, p. 196-208, 1947.