CAROLINA BARBOSA MALEK DOS REIS

Avaliação da contagem de células somáticas do leite como indicador da ocorrência de mastite em vacas Gir

Pirassununga – SP

2010

CAROLINA BARBOSA MALEK DOS REIS

Avaliação da contagem de células somáticas do leite como indicador da ocorrência de mastite em vacas Gir

Dissertação apresentada no programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos

Pirassununga – SP

2010

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2256
FMVZ

Malek dos Reis, Carolina Barbosa
Avaliação da contagem de células somáticas do leite como indicador da ocorrência de mastite em vacas Gir / Carolina Barbosa Malek dos Reis. – 2010.
122 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.
Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos.

1. Contagem de células somáticas. 2. Vacas Gir. 3. Mastite. 5. Composição do leite. 6. Limiar da CCS. I. Título.

ERRATA

MALEK DOS REIS, C. B. **Avaliação da contagem de células somáticas do leite como indicador da ocorrência de mastite em vacas Gir.**[Evaluation of milk somatic cell count as an indicator of mastitis occurence in Gyr cows]. 2010.122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Folha	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	3	1	122 f.	121 f.
Resumo	1	3	122 f.	121 f.
Abstract	1	3	122 f.	121 f.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Contagem de células somáticas (CCS) como indicador de mastite subclínica em vacas da raça Gir", protocolado sob o nº1400/2008, utilizando 100 (cem) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Somatic cell count (SCC) as an indicator of subclinical mastitis in cows of race Gir", protocol number 1400/2008, utilizing 100 (one hundred) bovines, under the responsibility Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum" meeting).

São Paulo, 29 de julho de 2008

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone / Fax: +55 11 3091-7672
+55 11 3091-7678
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MALEK DOS REIS, Carolina Barbosa

Título: Avaliação da contagem de células somáticas do leite como indicador da ocorrência de mastite em vacas Gir

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data:___/___/___

Banca Examinadora

Prof.Dr._____ Instituição:_____

Assinatura:_____ Julgamento_____

Prof.Dr._____ Instituição:_____

Assinatura:_____ Julgamento_____

Prof.Dr._____ Instituição:_____

Assinatura:_____ Julgamento_____

DEDICATÓRIA

Dedico com imenso carinho esta dissertação a minha família, em especial, aos meus pais Jayme Malek Júnior e Denise Barbosa pelo amor, dedicação e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser sempre a minha esperança e refúgio. Pelos dias abençoados e por ter me dado forças para superar as adversidades.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, pela dedicação. Obrigada por esta oportunidade de trabalho a qual me agregou muitos conhecimentos e experiências que foram essenciais para minha formação profissional.

Ao pesquisador, Dr. Marco Aurélio de Felício Porcionato, pelo seu gesto grandioso em me ajudar nas coletas das amostras e pela colaboração no desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos, Juliana Barreiro, Juliane Naves, Cristina Cortinha, Bruno Botaro, Juliana Casals e Elmerson que compartilharam comigo as aflições e os bons momentos, e que nunca pouparam esforços em colaborar com este trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Tecnologia dos Produtos de Origem Animal do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP, José Francisco Garcia Moreno e Lucinéia Mestieri, que contribuíram nas análises laboratoriais. Obrigada pela paciência e pelo laço de amizade.

Ao Sr. Joaquim José Noronha e Sra. Marta Bernardes, por permitirem que meu trabalho fosse desenvolvido em sua propriedade. Agradeço por fazerem parte desta caminhada.

Aos funcionários da fazenda Terra Vermelha e Emerson pela paciência e ajuda nas coletas das amostras.

Aos pesquisadores, Dr. Weber Soares e Dr. Enilson Ribeiro da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) e ao Dr. Sandro Ribeiro da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) pela parceria e, especialmente, pela dedicação em me ajudar.

Ao Laboratório Clínica do Leite do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP pela parceria e realização das análises laboratoriais.

Aos professores e funcionários do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP por colaborarem com a minha formação acadêmica.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo reconhecimento e incentivo aos pesquisadores e, em particular, pela minha bolsa de mestrado.

Ao meu pai, Jayme Malek Júnior e minha mãe, Denise Barbosa, pela torcida e dedicação sem fim.

Ao meu marido, Vanderlei dos Reis Júnior, pela compreensão. Por me fazer perceber que as diferenças são motivações para seguir em frente.

Ao meu avô, Dionísio Barbosa (em memória), que foi como um pai, capaz de ensinar com palavras e gestos simples sobre dignidade, honestidade e justiça. Agradeço pelos maravilhosos momentos de felicidade e amor. Por ter sido exemplo de crença, respeito a Deus e de luta pela vida. Saudades!

Aos meus irmãos, Priscila e Lucas, pelo carinho; e por serem sempre meus companheiros, nos momentos de alegrias e de dificuldades.

A todos meus familiares, em especial, minhas avós Vanda e Anna Maria, pelas orações encaminhadas. Obrigada pelo amor e por acreditarem em mim.

A todos que aqui não citei, mas que de alguma forma especial contribuíram para a realização deste trabalho e que fazem parte da minha vida.

RESUMO

MALEK DOS REIS, C. B. **Avaliação da contagem de células somáticas do leite como indicador da ocorrência de mastite em vacas Gir.**[Evaluation of milk somatic cell count as an indicator of mastitis occurence in Gyr cows]. 2010.122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Os objetivos deste trabalho foram determinar a sensibilidade e especificidade do limiar de contagem de células somáticas (CCS) de vacas Gir para o diagnóstico de mastite subclínica causada por patógenos primários e secundários e avaliar os efeitos de rebanho, vaca, mês de coleta, quarto mamário, presença de infecção intramamária, tipo de microrganismo e suas interações sobre o logCCS e composição do leite. Avaliou-se a hipótese que o limiar da CCS para detecção de mastite subclínica é igual entre vacas Gir e Holandesas. Foram utilizadas 221 vacas Gir em lactação, provenientes de três fazendas comerciais. Foram coletadas amostras de leite individuais por quarto mamário e compostas uma vez por mês, durante um ano. Foram realizadas análises de CCS, composição do leite e cultura microbiológica. O quarto mamário e a vaca foram considerados unidades experimentais. Para determinar a sensibilidade, especificidade e *odds ratio* (OR) dos limiares da CCS para identificação de quartos infectados, foram utilizados quatro valores de CCS: 100, 200, 300 e 400 (x 10^3 células/mL), assim como a correlação entre a CCS e composição do leite. Não houve efeito do rebanho sobre o logCCS para amostras individuais de quartos mamários e compostas, mas vaca dentro de rebanho foi o principal fator responsável pela variação do logCCS. Houve efeito do rebanho sobre a composição do leite, assim como o mês de coleta apresentou efeito tanto sobre o logCCS quanto para a composição do leite, considerando as duas unidades experimentais. A presença de infecção intramamária afetou negativamente a composição do leite, exceto sobre o teor de gordura; sendo que os maiores teores de lactose, proteína e ESD foram encontrados em amostras sem isolamento bacteriano. Os maiores logCCS foram obtidos em amostras infectadas. O limiar da CCS de 100 x 10^3 células/mL apresentou, em ambas as unidades experimentais, maiores valores de sensibilidade e valor preditivo negativo. O limiar de 200 x 10^3 células/mL apresentou maior chance da ocorrência de mastite do que o limiar de 100 x 10^3 células/mL. Foi observada correlação negativa entre CCS com lactose e

extrato seco desengordurado (ESD), mas a correlação foi positiva entre CCS com gordura e proteína, tanto em nível de quarto mamário quanto de vaca. Portanto, a composição do leite foi influenciada pela CCS, os teores de lactose e ESD diminuíram em altas CCS, enquanto que as concentrações de gordura e proteína aumentaram.

Palavras-chave: Contagem de células somáticas. Vacas Gir. Mastite. Composição do leite. Limiar CCS.

ABSTRACT

MALEK DOS REIS, C. B. **Evaluation of milk somatic cell count as an indicator of mastitis occurrence in Gyr cows.** [Avaliação da contagem de células somáticas do leite como indicador da ocorrência de mastite em vacas Gir]. 2010.122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The aim of this study was to determine the sensibility and specificity of somatic cell count (SCC) threshold in Gyr cows to diagnosis the subclinical mastitis caused by primary and secondary pathogens, and to evaluate the effect of herd, cows, month, mammary quarter, intramammary infection, type of microorganism and their interactions on logSCC and milk composition. The hypothesis to be tested was that the SCC threshold to detection of subclinical mastitis is the same for Holstein and Gir cows. A total of 221 lactation Gir cows from three commercial dairy farms was selected. Composed and quarter individual milk samples were collected once a month, during one year for SCC, milk composition and bacteriological analysis. The mammary quarter and the cow were considered experimental units. To determine the sensibility, specificity and odds ratio (OR) from SCC threshold to identify the infected quarters four values of SCC: 100, 200, 300 and 400 (x 10^3 cells/mL) were used. It was also evaluated the correlation between SCC and milk composition. There was no effect of herd on logSCC in individuals and composed samples, but cow nested within herd was major factor responsible for the logSCC variation. The month of sampling presented significant effect on logSCC and milk composition in both experimental units. The intramammary infection presence affected negatively the milk composition, except of fat concentration. Higher lactose, protein and non-fat solids (NFS) percentages were found in negative samples and higher logSCC were observed in infected samples. The SCC threshold of 100 x 10^3 cells/mL presented the major sensibility and negative predictive value for subclinical mastitis detection. The threshold of 200 x 10^3 cells/mL had higher chance to have mastitis than the threshold of 100 x 10^3 cells/mL. It was observed a negative correlation between SCC with lactose and NFS; but the correlation was positive between SCC with fat and protein in mammary quarters and cow level. Milk composition was influenced by SCC, once the lactose and NFS percentages decreased in samples with high SCC and the protein and fat concentration increased.

Keywords: Somatic cell count. Gir cows. Mastitis. Milk composition. SCC Threshold.

LISTAS DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Caracterização do rebanho experimental..... 36

Tabela 2 – Efeito da localização dos quartos mamários sobre a composição do leite e logCCS em amostras de quartos mamários infectados e não infectados de vacas Gir..... 46

Tabela 3 – Efeito da presença da infecção intramamária sobre os teores de gordura e extrato seco desengordurado do leite em amostras de quartos mamários de vacas Gir..... 46

Tabela 4 - Efeito do mês de coleta sobre os teores de gordura e extrato seco desengordurado do leite em amostras de quartos mamários infectados e não infectados de vacas Gir 47

Tabela 5 - Efeito da presença da infecção intramamária e do mês de coleta sobre o logCCS e teores de lactose e proteína do leite em amostras de quartos mamários de vacas Gir 49

Tabela 6 - Efeito do tipo de microrganismo isolado sobre os teores de proteína e gordura do leite em amostras de quartos mamários de vacas Gir..... 52

Tabela 7 - Efeito do mês de coleta sobre os teores de proteína e gordura do leite em amostras de quartos mamários infectados e não infectados de vacas Gir 53

Tabela 8 - Efeito do tipo de microrganismo isolado e do mês de coleta sobre o logCCS em amostras de leite de quartos mamários de vacas Gir 54

Tabela 9 - Efeito do tipo de microrganismo isolado e do mês de coleta sobre o teor de lactose do leite em amostras de quartos mamários de vacas Gir..... 55

Tabela 10 - Efeito do tipo de microrganismo isolado e do mês de coleta sobre o teor de extrato seco desengordurado do leite em amostras de quartos mamários de vacas Gir 56

Tabela 11 - Efeito do mês de coleta sobre o teor de extrato seco desengordurado do leite em amostras de quartos mamários infectados e não infectados de vacas Gir 61

Tabela 12 - Efeito do isolamento de patógenos (primários e secundários) e do mês de coleta sobre o logCCS em amostras de leite de quartos mamários de vacas Gir 62

Tabela 13 - Efeito do isolamento de patógenos (primários e secundários) e do mês de coleta sobre o teor de lactose do leite em amostras de quartos mamários de vacas Gir 63

Tabela 14 - Efeito do isolamento de patógenos (primários e secundários) e do mês de coleta sobre o teor de proteína do leite em amostras de quartos mamários de vacas Gir 64

Tabela 15 - Efeito do isolamento de patógenos (primários e secundários) e do mês de coleta sobre o teor de gordura do leite em amostras de quartos mamários de vacas Gir 65

Tabela 16 – Efeito do rebanho sobre a composição do leite e logCCS em amostras de quartos mamários não infectados de vacas Gir 69

Tabela 17 – Efeito da localização dos quartos mamários sobre a composição do leite e logCCS em amostras de quartos mamários não infectados de vacas Gir 70

Tabela 18 - Efeito do mês de coleta sobre o logCCS e composição do leite em amostras de quartos mamários sem isolamento microbiano de vacas Gir 71

Tabela 19 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo (positivo e negativo) dos quatro limiares da CCS de quartos mamários de vacas Gir para diagnóstico de mastite causada por patógenos primários e secundários 72

Tabela 20 - Sensibilidade e especificidade dos quatro limiares da CCS para identificação de patógenos primários e secundários, considerando três diferentes critérios de diagnóstico em amostras de leite de quartos mamários em vacas Gir 74

Tabela 21 - Chances da ocorrência de mastite para cada um dos quatro limiares da CCS em amostras de leite de quatros mamários de vacas Gir..... 75

Tabela 22 – Efeito do rebanho sobre a composição do leite e logCCS em amostras compostas, dos quatro quartos mamários, infectadas e não infectadas de vacas Gir 77

Tabela 23 – Efeito do número de quartos mamários acometidos pela mastite sobre o logCCS e composição do leite em amostras compostas, dos quatro quartos mamários, infectadas e não infectadas de vacas Gir.. 78

Tabela 24 - Efeito da presença da infecção intramamária sobre o logCCS e composição do leite em amostras compostas, dos quatro quartos mamários, infectadas e não infectadas de vacas Gir 79

Tabela 25 - Efeito do mês de coleta sobre o logCCS e composição do leite em amostras compostas, dos quatro quartos mamários, infectadas e não infectadas de vacas Gir 81

Tabela 26 - Efeito do tipo de microrganismo isolado sobre o logCCS e composição do leite em amostras compostas, dos quatro quartos mamários, infectadas e não infectadas de vacas Gir 83

Tabela 27 - Efeito do tipo de microrganismo isolado e do mês de coleta sobre o teor de lactose do leite em amostras compostas, dos quatro quartos mamários, infectadas e não infectadas de vacas Gir 85

Tabela 28 - Efeito do isolamento de patógenos (primários e secundários) sobre o logCCS e sobre os teores de gordura e extrato seco desengordurado em amostras compostas, dos quatro quartos mamários, infectadas e não infectadas de vacas Gir 87

Tabela 29 - Efeito do isolamento de patógenos (primários e secundários) e do mês de coleta sobre o teor de lactose do leite em amostras compostas, dos quatro quartos mamários, infectadas e não infectadas de vacas Gir 88

Tabela 30 - Efeito do isolamento de patógenos (primários e secundários) e do mês de coleta sobre o teor de proteína do leite em amostras compostas, dos quatro quartos mamários, infectadas e não infectadas de vacas Gir 89

Tabela 31 – Efeito do rebanho sobre a composição do leite e logCCS de amostras compostas, dos quatro quartos mamários, sem isolamento microbiano de vacas Gir 91

Tabela 32 - Efeito do mês de coleta sobre o logCCS e composição do leite em amostras compostas, dos quatro quartos mamários, sem isolamento microbiano de vacas Gir 93

Tabela 33 – Sensibilidade, especificidade, valor preditivo (positivo e negativo) dos quatro limiares da CCS em amostras compostas, dos quatro quartos mamários, para identificação de amostras positivas tanto para patógenos primários quanto secundários; em vacas Gir 94

Tabela 34 - Sensibilidade e especificidade dos quatro limiares da CCS para identificação de patógenos primários e secundários, considerando os três critérios de diagnóstico para mastite em amostras compostas, dos quatro quartos mamários, de vacas Gir 95

Tabela 35 - Chances de ocorrência da mastite para os quatro limiares da CCS em amostras compostas de vacas Gir 96

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCGIL	Associação Brasileira dos Criadores de Gir Leiteiro
CBT	Contagem bacteriana total
CCS	Contagem de células somáticas
Céls	Células
CMT	Califórnia mastitis test
CORR	Correlação
DP	Desvio padrão
EC	Condutividade elétrica
ECS	Escore de células somáticas
EPM	Erro padrão da média
ESALQ	Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
ESD	Extrato seco desengordurado do leite
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
GLM	Modelo linear generalizado
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IIM	Infecção intramamária
KG	Quilograma
KOH	Hidróxido de potássio
L	Litros
Log	Logarítimo na base 10
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MG	Estado de Minas Gerais
Mg	Miligramas
mL	Mililitros
mm	Milímetros
n	Número de observações (ou tamanho amostral)
NMC	National Mastitis Council
P	Probabilidade
PNQL	Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite
SAS	Statistical Analisys System
SP	Estado de São Paulo
SQ	Soma dos quadrados
UE	Unidade experimental
USP	Universidade de São Paulo
VNP	Departamento de Nutrição e Produção Animal
WMT	Wisconsin mastitis test

LISTAS DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
x	Sinal de multiplicação
<	Sinal de menor
>	Sinal de maior
=	Sinal de igualdade
+	Sinal de adição
-	Sinal de subtração
μ	Média da população
±	Sinal de mais ou menos
®	Marca registrada
*	Sinal que indica interação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **18**

2 REVISÃO DE LITERATURA **22**

2.1 MASTITE 22

2.2 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS 25

2.3 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADES DA CCS 28

2.4 COMPOSIÇÃO DO LEITE 31

3 MATERIAL E MÉTODOS **35**

3.1 SELEÇÃO DOS REBANHOS 35

3.2 AMOSTRAGEM 36

3.2.1 Análise da CCS e composição do Leite 36

3.2.2 Análise microbiológica do leite 37

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA 38

3.3.1 Modelo estatístico 38

3.3.2 Sensibilidade e especificidade da CCS 41

3.3.3 Correlação entre CCS e composição do leite 43

4 RESULTADOS **44**

4.1 PREVALÊNCIA DA MASTITE SUBCLÍNICA EM QUARTOS MAMÁRIOS 44

4.2 FATORES QUE AFETAM A CCS E COMPOSIÇÃO DO LEITE DE QUARTOS MAMÁRIOS 44

4.2.1 Efeito do rebanho, mês de coleta, quarto mamário e presença de infecção intramamária sobre a composição do leite e CCS 44

4.2.2 Efeito do tipo de microrganismo isolado sobre o logCCS e composição do leite em quartos mamários 51

4.2.3 Efeito do isolamento de patógenos (primários e secundários) sobre o logCCS e composição do leite de quartos mamários 60

4.2.4 Efeito do rebanho, quarto mamário e mês de coleta sobre o logCCS e composição do leite em amostras sem isolamento microbiano de quartos mamários 68

4.3 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA CCS DE QUARTOS MAMÁRIOS 72

4.4 CORRELAÇÃO ENTRE A CCS E COMPOSIÇÃO DO LEITE DE QUARTOS MAMÁRIOS 75

4.5 PREVALÊNCIA DA MASTITE SUBCLÍNICA EM VACAS GIR DE AMOSTRAS COMPOSTAS 76

4.6 FATORES QUE AFETAM A CCS E COMPOSIÇÃO DO LEITE 76

4.6.1 Efeito do rebanho e do número de quartos mamários infectados sobre o logCCS e composição do leite em amostras compostas..... 76

4.6.2 Efeito do mês de coleta e da presença de infecção intramamária sobre o logCCS e composição do leite em amostras compostas..... 79

4.6.3 Efeito do tipo de microrganismo isolado sobre o logCCS e composição do leite em amostras compostas 82

4.6.4 Efeito do isolamento de patógenos (primários e secundários) sobre o logCCS e composição do leite em amostras compostas..... 87

4.6.5 Efeito do rebanho e do mês de coleta sobre o logCCS e sobre a composição do leite em amostras compostas sem isolamento microbiano . 91

4.7 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA CCS DE AMOSTRAS COMPOSTAS 94

4.8 CORRELAÇÃO ENTRE A CCS E COMPOSIÇÃO DO LEITE DE AMOSTRAS COMPOSTAS 97

5 DISCUSSÃO **98**

5.1 PREVALÊNCIA DA MASTITE SUBCLÍNICA EM QUARTOS MAMÁRIOS 98

5.2 FATORES QUE AFETAM A CCS E COMPOSIÇÃO DO LEITE DE QUARTOS MAMÁRIOS 100

5.3 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA CCS DE QUARTOS MAMÁRIOS 103

5.4 CORRELAÇÃO ENTRE A CCS E COMPOSIÇÃO DO LEITE DE QUARTOS MAMÁRIOS 105

5.5 PREVALÊNCIA DA MASTITE SUBCLÍNICA EM AMOSTRAS COMPOSTAS 106

5.6 FATORES QUE AFETAM A CCS E COMPOSIÇÃO DO LEITE DE AMOSTRAS COMPOSTAS 107

5.7 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA CCS EM AMOSTRAS COMPOSTAS 110

5.8 CORRELAÇÃO ENTRE A CCS E COMPOSIÇÃO DO LEITE EM AMOSTRAS COMPOSTAS 111

6 CONCLUSÃO **113**

REFERÊNCIAS..... **114**

1 INTRODUÇÃO

O sistema agroindustrial do leite é composto por importantes segmentos para a economia brasileira, pois gera empregos, riquezas e impostos, além de representar um dos maiores sistemas agroindustriais do mundo (CAMPOS, 2007). O setor lácteo tem apresentado contínuo crescimento nas últimas três décadas (MARTINS; CARNEIRO, 2008) devido ao incremento no uso de novas tecnologias que visam melhorar as condições de manejo alimentar, reprodutivo e sanitário dos animais (VERNEQUE et al., 2008).

O leite é um dos mais nobres alimentos, cuja composição é rica em proteínas, gorduras, carboidratos (lactose), sais minerais, vitaminas, ácido linoléico conjugado, esfingomielina, ácido butírico, dentre outras substâncias que proporcionam proteção imunológica e nutrientes essenciais aos seus consumidores (SORDILLO et al., 1997; OLIVEIRA et al., 1999). Por outro lado, atualmente, crescem as preocupações que envolvem o consumo de leite, em relação àsua baixa qualidade e ao risco à saúde pública, pela transmissão de agentes patogênicos, resíduos de antibióticos no leite e transferência de genes de resistência de bactérias do animal ao homem (SCHUKKEN et al., 2003).

No atual cenário, foi elaborado o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNQL) que tem como principal objetivo melhorar a qualidade para que a população possa consumir produtos lácteos mais seguros, mais nutritivos e mais saborosos; além de proporcionar condições para aumentar o rendimento industrial da matéria prima aos produtores (DURR, 2008). As mudanças estruturais e de mercado ocorridas no mundo, nos últimos anos, determinaram ajustes no setor leiteiro, tornando-o mais competitivo (ANDRADE et al., 2007). Neste momento de transformação, a qualidade do leite é de extrema importância pois, conforme relatam (SANTOS; FONSECA, 2007), a matéria-prima só pode participar do mercado global se apresentar qualidade compatível com as exigências dos países consumidores, caso contrário não competem com produtos de rendimento industrial superior. As empresas de laticínios passaram a exigir maior eficiência produtiva com controle de custos e melhoramento na qualidade já que algumas indústrias iniciaram programas de pagamento do leite por qualidade, tendo como análises a contagem global de microrganismos (CBT), contagem de células somáticas (CCS) e composição do leite

(OLIVEIRA et al., 1999). A título de exemplificação, o leite que apresenta valores de CCS menores que 200.000 células/mL/leite pode receber bônus de 6% sobre o preço base, porém para valores maiores de 750.000 células/mL, a penalidade pode chegar a -6% do valor pago pelo produto (MAGALHÃES et al., 2006). Dentro do mesmo contexto, a publicação da Instrução Normativa 51/2002, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) oficializou parâmetros para avaliação da qualidade do leite cru até então inexistentes no Brasil (BRASIL, 2002).

No país, em grande parte dos rebanhos, a atividade leiteira é conduzida basicamente a pasto, cujos animais, na grande maioria, são de baixo padrão genético (VERNEQUE et al., 2008). O gado é composto por mais de 70% de animais mestiços (cruzamento de raças européias com zebuínas), sendo que das raças zebuínas a Gir e Guzerá são as de maior importância na pecuária leiteira (SOUZA et al., 2005). No entanto, mesmo nestas condições o país é um dos maiores produtores de leite do mundo, com produção de 27, 579 bilhões de litros em 2008, com aumento de 5,5% do ano anterior (IBGE, 2009). Existe no Brasil, um cenário favorável ao aumento da produção, da produtividade e da melhoria da qualidade do leite e dos produtos lácteos. A procura por animais de genética superior, adaptados às condições de manejo e ambiente adversos, é crescente, e, o uso de fêmeas zebuínas é uma das principais alternativas para atender a esta demanda (VERNEQUE et al., 2008).

Rebanhos da raça Gir foram trazidos para o Brasil no ano de 1906 e, a partir do Triângulo Mineiro, alcançaram todo o território nacional (VERNEQUE et al., 1999). Fêmeas da raça Gir são muito valorizadas e são consideradas fundamentais na exploração da pecuária brasileira (FARIA et al., 2001). Segundo a Associação Brasileira dos Criadores do Gir Leiteiro (ABCGIL), foi no final da década de 30 que surgiram os primeiros trabalhos de seleção da raça Gir para produção de leite. Foi por meio destes estudos que se observou aptidão das vacas Gir à produção de leite. No território nacional, estão registrados quatro mil criadores de Gir leiteiro, dentre estes, 46 criadores estão situados no Estado de São Paulo. Por ser um mercado firme e crescente, existe grande perspectiva de ampliação do Gir leiteiro, o que destaca a importância de buscar novas alternativas que incrementem a produção de leite em rebanhos da raça Gir (ABCGIL, 2009).

Com os avanços tecnológicos, as fêmeas bovinas foram selecionadas geneticamente em busca do aumento da produção leiteira. Porém, esta

intensificação tem tido um correlato negativo com a saúde do úbere e a resistência da vaca contra a mastite, aumentando a incidência desta doença nos rebanhos leiteiros (RAINARD; RIOLLETI, 2006).

A mastite é considerada a principal doença que acomete os rebanhos leiteiros do mundo (RAINARD; RIOLLETI, 2006), caracterizada pela inflamação da glândula mamária, causada principalmente, por um processo infeccioso (SANTOS; FONSECA, 2007).

Em resposta à invasão e à multiplicação dos microrganismos na glândula mamária, durante o curso da mastite, as células de defesa migram do sangue para a glândula mamária com o objetivo de combater o agente infeccioso; aumentando desta forma a contagem das células somáticas (CCS) do leite (MULLER, 2002; ZAFALON et al., 2005).

A CCS é usada mundialmente, como um indicador da mastite, sendo considerada uma importante ferramenta no controle da doença em nível de rebanho, uma vez que a infecção da glândula mamária (IIM) tem sido reportada como a principal causa do aumento dos valores da CCS (LAEVENS et al., 1997).

Vários trabalhos científicos têm procurado estabelecer a CCS em diversos rebanhos e localidades, relacionando-a com fatores ambientais, genotípicos, sanitário, nutricional e dentre outros (SOUZA et al., 2005; CAMPOS et al., 2006; MAGALHÃES et al., 2006; PASCHOAL et al., 2006; ANDRADE et al., 2007; BARBOSA et al., 2007).

Em todo o mundo, são realizados programas de controle da saúde do úbere e da qualidade do leite, uma vez que o acompanhamento auxilia na redução de perdas econômicas e do risco à saúde humana (SCHUKKEN et al., 2003).

Em razão do uso freqüente dos rebanhos Gir e seus cruzamentos, devido à sua potencialidade de produção leiteira em condições tropicais, foi criado o Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro que abrange também, estudos de produção de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e CCS (VERNEQUE et al., 1999). Alguns autores estimam que os valores da CCS de raças zebuínas são mais baixos do que as raças européias, podendo ser um parâmetro utilizado para avaliar o melhoramento genético (RUPP; BOICHARD, 2003). Segundo Souza et al. (2005), no Brasil, existe deficiência de trabalhos que avaliam os parâmetros e fatores de risco para infecções intramamárias nestes animais.

Pesquisas que avaliam os parâmetros e os fatores de risco para a mastite nas fêmeas da raça Gir são escassas. Com isso, a hipótese a ser estudada é de que o limiar da CCS para detecção de mastite subclínica para as vacas Gir é igual ao estabelecido para as vacas Holandesas.

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a contagem de células somáticas como indicador de mastite subclínica em vacas Gir. Foram objetivos específicos estudar o efeito individual de vaca, de mês de coleta, quarto mamário, rebanho, presença da infecção intramamária e o tipo de microrganismo causador da mastite sobre a CCS e a composição do leite; além de determinar a sensibilidade e especificidade dos limiares da CCS para identificação de mastite causada por patógenos primários e secundários.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MASTITE

Conceitualmente, a mastite é a inflamação da glândula mamária, na maioria das vezes de caráter infeccioso. Em decorrência do agente etiológico, fonte de infecção e via de transmissão, a mastite é classificada como contagiosa e ambiental e, quanto à forma de manifestação da doença é dividida em clínica e subclínica. A mastite subclínica, sem sinais clínicos aparentes, mas com acentuadas alterações químicas e microbiológicas do leite, é responsável por 70% das perdas econômicas decorrentes da doença em conseqüência do seu difícil diagnóstico, da alta prevalência (15 a 20 vezes maior que a forma clínica) e de fácil disseminação (SANTOS; FONSECA, 2007).

A mastite constitui-se na enfermidade mais comum em vacas leiteiras e que acarreta prejuízos significativos ao produtor. A doença causa grandes perdas econômicas para a indústria leiteira pela diminuição da produção, aumento dos custos com o tratamento, descarte do leite e da taxa de reposição (SCHEPER; DIJKHUIZEN, 1991), além de causar efeitos negativos na qualidade do leite (BERGLUND et al., 2007). A perda atribuída à mastite depende do grau de intensidade do processo inflamatório, da prevalência da doença, da patogenicidade do agente infeccioso e do estágio de lactação (REIS et al., 2003).

São inúmeros os agentes causadores da doença, sendo as bactérias os principais microrganismos etiológicos (VIANNI; LÁZARO, 2003). Segundo o National Mastitis Council (NMC; 1981), as bactérias são classificadas como patógenos maiores (primários) e menores (secundários). Dentro do primeiro grupo encontram-se *Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Escherichia coli, Klebsiella sp. e Mycoplasma bovis*; *Streptococcus uberis, Streptococcus dysgalactiae;* enquanto que, *Staphylococcus sp.* coagulase negativa e *Corynebacterium sp.* pertencem à classe dos patógenos menores. Estas classes bacterianas diferem quanto à prevalência, à habilidade em causar os sinais clínicos, ao mecanismo de defesa envolvido e aos parâmetros da resposta da CCS (LARRY SMITH et al., 1985).

A principal fonte de eliminação dos *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus*, dentro do rebanho, é a própria glândula mamária infectada. Porém, os microrganismos ambientais, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* e coliformes, quando isolados de amostras de leite, do tanque especialmente, podem ser oriundos de outras fontes externas e não específicas do leite (BRITO et al., 1998).

As bactérias contagiosas são transmitidas de uma vaca a outra no momento da ordenha, pelas mãos do ordenhador ou teteiras contaminadas. Em contrapartida, a transmissão de bactérias ambientais ocorre entre as ordenhas, quando os animais entram em contato com as superfícies contaminadas (cama ou solo) (SHARIF; MUHAMMAD, 2009).

A mastite ocorre quando um microrganismo invade a glândula mamária, via canal do teto, vence as barreiras do sistema imune e se multiplica. No entanto, a glândula mamária é protegida por inúmeros mecanismos de defesa, que podem ser divididos em duas categorias: resposta imune inata (inespecífica) e resposta imune adquirida (específica). A barreira física (esfíncter e camada de queratina dos tetos), a população de macrófagos, neutrófilos e células “natural killer” constituem a imunidade inata, que é predominante no primeiro estágio da doença, enquanto que a população de linfócitos (T e B) é responsável pela imunidade específica, mediada por anticorpos (SORDILLO, 2005).

Considerada uma doença multifatorial de grande importância para a pecuária de leite, a mastite também acarreta sérios problemas para a saúde pública. O leite proveniente de fêmeas infectadas apresenta modificação em sua composição, alterando, conseqüentemente, as características organolépticas, físicas, químicas e microbiológicas (VIANNI; LÁZARO, 2003).

Os objetivos de um programa de controle da mastite são: eliminar infecções existentes, monitorar a saúde da glândula mamária e minimizar a incidência de novas infecções (DOHOO; LESLIE, 1991; SANTOS; FONSECA, 2007). Detectar a infecção intramamária (IIM) é de grande importância para manter o padrão de qualidade do leite e a saúde do rebanho. Vários são os métodos de diagnóstico da mastite, dentre eles: condutividade elétrica (EC), CCS, Califórnia Mastitis Test (CMT), teste da caneca, Wisconsin Mastitis Test (WMT) e cultura microbiológica (SANTOS; FONSECA, 2007; KAMPHUIS et al., 2008).

O exame bacteriológico é considerado um teste qualitativo e para que um resultado seja positivo é preciso o isolamento de pelo menos um microrganismo. No entanto, qualquer contaminação externa pode desencadear um resultado falso-positivo ou erros na preparação das amostras e dos meios de cultura podem gerar resultados falso-negativos. Por ser considerado um teste caro e pouco viável como exame de rotina na fazenda outros testes de diagnóstico da mastite devem ser empregados (URECH et al., 1999).

A CCS é mensurada como o número de células por mililitro de leite; sendo que para assumir a presença de uma infecção intramamária a concentração destas células deve exceder o limiar específico (normalmente >200 x 10^3 células/mL). Porém, resultados falso-positivos e falso-negativos podem ocorrer devido ao armazenamento e identificação incorreta das amostras, ao erro de análise laboratorial pela falha na calibração do aparelho (URECH et al., 1999) e a outros motivos relacionados ao animal que serão descritos a seguir.

Medidas de controle da mastite incluem o uso do pré-dipping e pós-dipping (imersão dos tetos em solução desinfetante), terapia de vaca seca com antibiótico de longa duração, segregação e abate de animais com mastite crônica, controle ambiental e vacinação. O pré-dipping previne novas infecções intramamárias causadas por patógenos contagiosos, durante o período de ordenha. Já a terapia de vaca seca, redução da exposição do animal ao agente, aumento da resistência da vaca (através da dieta, vacinação e prevenção do estresse) e oferecimento de alimento e água após a ordenha (para evitar que as fêmeas deitem no solo contaminado, uma vez que, o esfíncter do teto permanece aberto por 3 horas pós-ordenha) diminuem a incidência de mastite causada por patógenos ambientais (SARGEANT et al., 2001).

Estudos epidemiológicos sobre fatores de risco associados à mastite e a variação da CCS identificam características relacionadas ao animal, ao ambiente, ao procedimento de manejo e ao equipamento de ordenha. Neste contexto, (COENTRÃO et al., 2008) identificaram que animais oriundos de rebanhos onde não há treinamento dos ordenhadores para realização de uma ordenha eficiente, rebanhos onde existe a prática de imersão das teteiras em solução desinfetante entre ordenhas e procedimento de inserção total da cânula na aplicação de antibiótico intramamário e fêmeas com base do úbere junto ou abaixo do jarrete apresentaram mais chances da ocorrência da mastite e elevada CCS. Para estes

autores, o conhecimento dos fatores de risco à mastite pode aprimorar o programa de controle e prevenção da doença.

A CCS é geralmente usada como critério de diagnóstico indireto da mastite (SCHEPERS et al., 1997), pois segundo Berglund et al. (2007) a infecção intramamária é a principal causa do aumento da CCS.

Prestes et al. (2002) mencionaram que microrganismos contagiosos (*Staphylococcus aureus, Staphylococcus sp*. coagulase negativa, *Streptococcus agalactiae, Streptococcus dysgalactiae e Corynebacterium bovis*) levam ao aumento da CCS. Por outro lado, os microrganismos ambientais (*Escherichia coli, Klebsiella sp., Enterobacter sp., Streptococcus uberis* e *Pseudomonas aeruginosa*) podem ou não alterar os valores da CCS devido às diferenças das respostas imunológicas e do agente etiológico evolvido na infecção intramamária.

A CCS é um importante componente do leite em termos de qualidade, higiene e controle da mastite. O aumento da CCS está associado com alterações na qualidade da proteína do leite, nas mudanças da composição de gordura, lactose e minerais, como também, no aumento da atividade enzimática (OGOLA et al., 2007).

2.2 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS

Células somáticas são todas as células presentes no leite, em especial, as células originárias da corrente sangüínea como os leucócitos (pela alteração da permeabilidade vascular) e células de descamação do epitélio glandular secretor (pela lesão tecidual) (OLIVEIRA et al., 1999; VOLTOLINI et al., 2001). Os leucócitos fazem parte do sistema imune, cujas células principais são: neutrófilos, linfócitos e macrófagos (SORDILLO et al., 1997). Nos quartos mamários sadios, os macrófagos predominam (66-88%) e os neutrófilos representam cerca de 1-11%. No entanto, durante a mastite, os neutrófilos podem compor aproximadamente 90% das células somáticas presentes no leite, tornando-se a CCS um bom indicador de infecção intramamária (PYORALA, 2003).

Lindmark-Manssona et al. (2006) perceberam que em amostras com alta CCS as células predominantes foram os poliformonucleares (ou neutrófilos), uma vez que, estas células são responsáveis pela primeira linha de defesa do organismo contra

agentes invasores, seguidos pelos macrófagos e linfócitos. Estes autores encontraram uma correlação positiva entre a CCS e as células do sistema imune (r= 0,92 para os polimorfonucleares; r=0,81 para os macrógafos e r= 0,69 para os linfócitos). Pyorala (2003) sugere que a diferenciação da CCS pode prover mais informações sobre o estado de saúde do úbere ou do quarto mamário.

A CCS é um valioso teste empregado para acompanhar a eficiência dos programas de controle da saúde do úbere, sendo de ampla disponibilidade para indústrias leiteiras e produtores (SCHUKKEN et al., 2003) e tem sido usada extensivamente como um indicador da infecção intramamária desde 1960 (PYORALA, 2003). Uma das aplicações da CCS envolve a classificação das vacas como infectadas e não infectadas (DOHOO; LESLIE, 1991).

Após a instalação da doença, os valores da CCS aumentam dentro de algumas horas, podendo representar não só a fase crônica, mas também, a fase aguda da mastite (SORDILLO et al., 1997; SEEGERS et al., 2003). Segundo Sordillo et al. (1997) é a duração da resposta inflamatória que gera grande impacto sobre a quantidade e qualidade do leite.

A CCS tem sido considerada uma medida padrão de qualidade da matéria-prima, pois está relacionada com a composição do leite, rendimento industrial e na determinação da segurança alimentar do produto, enquanto que, para os produtores indica saúde da glândula mamária, qualidade da matéria-prima e perda de produção (BUENO et al., 2005).

Como conseqüências negativas do aumento da CCS têm-se: alteração na composição do leite, na atividade enzimática, no tempo de coagulação, na produtividade e qualidade dos derivados lácteos (OLIVEIRA et al., 1999; BUENO et al., 2005). Para Magalhães et al. (2006), altas CCS significam prejuízos para o produtor, pela perda de produção das vacas, do aumento de gastos com medicamentos e por penalidades aplicadas pelos laticínios. Para a indústria, implica em menor tempo de prateleira dos produtos, redução no rendimento industrial e instabilidade durante o processamento da matéria-prima (SANTOS; FONSECA, 2007).

A maior perda associada à alta CCS é a redução da produção de leite, contagens acima de um milhão de células somáticas podem causar 18% a menos de produção de leite (SHARIF; MUHAMMAD, 2008). Muitos trabalhos têm sido realizados para estimar a perda de produção em relação à mastite. No entanto, Durr

et al. (2008) relataram que os fatores, como: raça, estágio de lactação e ordem de parto devem também ser considerados para estas estimativas. A diminuição da produção de leite, no trabalho desenvolvido por estes autores, iniciou em amostras de leite com CCS de aproximadamente de 74 000 células/mL. Já, no estudo de Magalhães et al. (2006) as perdas chegaram a 1,02% a 21,15% na produção de leite para amostras com 171 x 10^3 células/mL até 2.488 x 10^3 células/mL, os autores observaram também que as perdas econômicas (em R$), para o leite tipo B e C, em vacas multíparas (quinto parto) foram de R$ 57,98 e R$ 52,98 para cada aumento do escore de células somáticas (ECS), respectivamente.

Além da produção, a composição do leite altera em relação às mudanças da CCS. Aumentos suaves da CCS estão relacionados à diminuição da produção e no conteúdo de gordura, caseína e lactose do leite (BERGLUND et al., 2007). Elevada CCS resulta em baixa qualidade do leite cru e, conseqüentemente, afeta a qualidade dos produtos lácteos (LE ROUX et al., 2003).

Vários fatores podem afetar a CCS: idade, estágio de lactação, ordem de parto, sazonalidade, estresse, gerenciamento, variação diurna e, principalmente a infecção bacteriana do quarto mamário. Os fatores não infecciosos são considerados menos importantes do que a mastite sobre o aumento da CCS (SANTOS; FONSECA, 2007). Sargeant et al. (2001) destacaram que a CCS geralmente é elevada logo após o parto e diminui, gradativamente, nas primeiras duas semanas de lactação. Da metade ao fim do período de lactação a CCS aumenta lentamente, indicando que a curva da CCS é inversamente proporcional a curva de lactação.

A freqüência e o intervalo entre ordenhas também afetam a CCS; quanto maior o número de ordenhas e menor o intervalo mais elevada é a CCS (PYORALA, 2003).

Segundo Reneau (1986), o número de lactação tem grande influência na variação da CCS; vacas multíparas possuem maior média da CCS do que fêmeas primíparas; o aumento da CCS pode chegar a 100.000 células/mL por lactação.

Assim como os valores da CCS diferem entre as amostras compostas e individuais dos quartos mamários, Sarikaya e Bruckmaier (2006) demonstraram que a fração de leite coletada apresentou influência crucial sobre os valores da CCS. Os resultados da CCS referente à fração do leite classificado como cisternal diferiram acentuadamente dos resultados obtidos dos primeiros jatos de leite. Os autores concluíram que para uma boa interpretação dos valores de CCS deve-se considerar

a fração do leite amostrada. Urech et al. (1999), também demonstraram que a CCS de amostras correspondentes aos primeiros jatos de leite são menores do que as amostras de leite cisternal.

As variações da CCS de um dia para o outro corresponde a 10% devido a reações não inflamatórias, como por exemplo, os distúrbios na rotina das vacas que podem resultar em alterações da CCS. Estas flutuações são consideradas sistêmicas e ocorrem em todos os quartos mamários, simultaneamente, causando diferença temporária na CCS em nível de úbere (BERGLUND et al., 2007). Segundo Olde Riekerink et al. (2007) a CCS, de quartos mamários também sofrem alterações consideráveis durante o dia devido às variações do influxo de células no leite.

Por inúmeros fatores que afetam a CCS existe a necessidade de se atentar na interpretação dos resultados da CCS como indicador de mastite (LAEVENS et al., 1997; OLDE RIEKERINK et al., 2007).

Os patógenos primários alteram, diferentemente, os valores da CCS quando comparados com os patógenos secundários. A CCS, proveniente de amostras infectadas por patógenos primários, são mais elevadas do que a CCS de amostras infectadas por patógenos secundários (DOHOO; LESLIE, 1991; PYORALA, 2003).

Em termos gerais, alguns pesquisadores têm definido o valor de 200.000 a 250.000 células/mL como limite para separar os quartos mamários infectados dos não nfectados, de forma a reduzir a ocorrência de resultados falso-positivos e falso-negativos (DOHOO; LESLIE, 1991; SCHEPERS et al., 1997; DJABRI et al., 2002). Utilizando-se este limiar de CCS, pode-se estimar uma sensibilidade de 73-89% e especificidade de 75-85% para as vacas Holandesas (SCHEPERS et al., 1997; PYORALA, 2003).

2.3 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADES DA CCS

A CCS pode ser mensurada em nível de quarto mamário, de vaca (pelas amostras compostas dos quatro quartos mamários) e de rebanho (pelas amostras de leite do tanque). Os dados de CCS podem ser usados para vários propósitos, sendo que para algumas finalidades é preciso que se estabeleça um ponto de corte (limiar

de CCS). No entanto, para outras situações está medida não é necessária. A utilização da CCS de quartos mamários e de amostras compostas prevê se existe ou não uma infecção intramamária, enquanto que, ao considerar dados da CCS de amostras do tanque, estimam-se as perdas produtivas e da qualidade do leite devido à mastite. Nas situações descritas anteriormente, principalmente, quando se objetiva adotar medidas de controle e prevenção da mastite, tais como: selecionar vacas para descarte, selecionar vacas para tratamento, selecionar vacas para linha de ordenha, dentre outras; existe a necessidade de fixar um limiar de CCS que separe vacas infectadas das não infectadas (DOHOO, 2001).

O método padrão que expressa as características do teste de diagnóstico é o valor da sensibilidade e especificidade. No caso da CCS, a sensibilidade é a proporção de vacas com infecção intramamária acima do limiar da CCS e a especificidade é a proporção de vacas não infectadas com CCS abaixo do limiar. A probabilidade que a vaca com CCS acima do limiar seja realmente infectada é conhecida como valor preditivo positivo e a probabilidade de uma vaca com CCS abaixo do limiar ser realmente livre de infecção intramamária é o chamado valor preditivo negativo. Para rebanho com alta prevalência o valor preditivo positivo é maior do que para um rebanho com baixa prevalência. Aumentar o limiar em um rebanho de baixa prevalência aumenta o valor preditivo positivo, porém para rebanho com alta prevalência o alto limiar diminui o valor preditivo negativo (DOHOO, 2001).

O teste clínico ideal deveria estabelecer a presença e ausência de uma doença em qualquer caso selecionado sem nenhum resultado falso-negativo e falso-positivo. Devido à natureza variável do sistema biológico existem poucos testes clínicos que atendem a este padrão (RENEAU, 1986). Assim, os resultados falso-positivos e falso-negativos podem ter um grande impacto na seleção do limiar. Desta forma, independentemente do ponto de corte da CCS escolhido para classificar uma vaca ou quarto mamário com mastite subclínica, algumas vacas não infectadas apresentam CCS acima desse limite (resultados falso-positivos) e algumas vacas infectadas apresentam CCS abaixo do limite estabelecido (resultados falso-negativos) (SCHEPERS et al., 1997).

Segundo Reneau (1986), os patógenos secundários podem aumentar os resultados falso-negativos e gerar resultados confusos, pois a CCS de amostras com

isolamento destes microrganismos são próximas do limiar (devido à pouca variação). Também, o estágio de lactação influencia no número de resultados falso-negativos e falso-positivos, uma vez que, a CCS sofre variação do início ao fim do período de lactação (RENEAU, 1986).

Antigamente, o limiar de 500 x 10^3 células/mL era utilizado para separar grupos de vacas infectadas e não infectadas. No entanto, ao longo do tempo, este ponto de corte tornou-se irrelevante. Muitos estudos foram desenvolvidos para avaliar a sensibilidade e especificidade do limiar de 200 x 10^3 células/mL, uma vez que, este limiar apresentava boa aplicação à campo. Atualmente, tem sido sugerido um limiar de 100 x 10^3 células/mL para quartos mamários não infectados, na tentativa de diminuir o erro de diagnóstico (PYORALA, 2003).

Estudos desenvolvidos na América do Norte e Europa têm mostrado que quartos mamários não infectados apresentam em média uma CCS de aproximadamente 70 000 células/mL (SCHUKKEN et al., 2003). Para estes autores, qualquer limiar da CCS que indique a presença de IIM terá vantagens e desvantagens; pois em algumas situações quartos mamários com baixa CCS podem ainda apresentar mastite.

Para Olde Riekerink et al. (2007), a variação diurna da CCS pode gerar conseqüências no uso da CCS como indicador da mastite. Em seu estudo, os valores da sensibilidade e especificidade variaram conforme a fração do leite coletada. Para o diagnóstico de patógenos primários, a sensibilidade de 52%, na pré-ordenha, passou para 89% uma hora depois do procedimento de ordenha, enquanto que a especificidade diminuiu de 73% na pré-ordenha para 34% depois de uma hora do término da ordenha.

Estimar a prevalência da mastite em grupos de vacas é útil para estimar os problemas decorrentes da doença no rebanho. Porém, considerar o grupo de animais acima e abaixo do limiar joga fora muitas informações relevantes. Por este motivo, uma alternativa sugerida por Dohoo (2001) é classificar a CCS dentro de intervalos e calcular o chamado “likelihood ratio” ou “odds ratio” que é o valor que expressa a chance de uma IIM ocorrer com base na CCS.

Para Mcdermott e Natzke (1982) o aspecto econômico deve ser considerado quando se objetiva escolher um limiar adequado de CCS para identificação da mastite. Como por exemplo, no caso em que se deseja tratar vacas com infecção

intramamária, é preciso decidir se é mais importante tratar grande parte dos animais ou evitar que se tratem fêmeas desnecessariamente. O principal objetivo é escolher um limiar que ajude a aperfeiçoar o programa de controle da mastite, ou seja, capaz de minimizar a ocorrência da doença, reduzir fontes de infecção, reduzir custos com tratamento e com descarte dos animais.

Segundo Schepers et al. (1997) a utilização dos limiares da CCS para detecção da infecção intramamária melhorou os parâmetros de qualidade do leite e otimizou o programa de controle da mastite.

2.4 COMPOSIÇÃO DO LEITE

Entende-se por leite, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002). O leite é constituído por uma mistura complexa e heterogênia de substâncias orgânicas e inorgânicas sendo caracterizado como uma suspensão coloidal de micelas de caseína ligadas ao cálcio e potássio, como uma emulsão de glóbulos de gordura e vitaminas lipossolúveis e como uma solução de lactose, proteínas solúveis em água, sais minerais e vitaminas hidrossolúveis (SANTOS; FONSECA, 2007).

O processo de síntese e secreção do leite envolve: o suprimento de precursores a partir do sangue, da capacidade de captação dos precursores, da sua conversão em componentes do leite e da remoção do leite pela glândula mamária. A lactose, principal carboidrato do leite (dissacarídeo composto por moléculas de glicose e galactose), é responsável pelo volume do leite produzido, pois participa do controle da pressão osmótica da glândula mamária. O proprionato de origem da fermentação microbiana, no rúmen, é considerado o principal precursor da glicose na glândula mamária, sendo limitante para a síntese de lactose do leite (SANTOS; FONSECA, 2007).

Algumas proteínas do leite não são sintetizadas na glândula mamária (como as albuminas séricas e imunoglobulinas) e são transportadas do sangue até o lúmen alveolar. No entanto, caseína, beta-lactoglobulinas e alfa-lactoalbuminas, são proteínas sintetizadas na própria glândula mamária (pelas células alveolares) a partir dos aminoácidos do sangue. A caseína (fosfoproteína) é secretada em forma de

micelas que são grupamentos de várias moléculas de caseína ligadas a íons fosfato de cálcio. A gordura do leite é composta na sua quase totalidade por triglicerídeos originários dos lipídeos da dieta ou da mobilização de reservas corpóreas (ácidos graxos de cadeia longa). Particularmente, o acetato e butirato são os precursores da gordura do leite (ácidos graxos de cadeia curta) sintetizada pelas células epiteliais da glândula mamária pela síntese *de novo* (SANTOS; FONSECA, 2007).

A característica química e microbiológica do leite é de grande importância para a saúde pública, para o processamento tecnológico e para a qualidade dos produtos lácteos. No entanto, a composição do leite pode ser muito variável e depende de inúmeros fatores, tais como: raça, idade, saúde da glândula mamária, período de lactação, nutrição da vaca, época do ano e tipo de ordenha (DOBRANIC et al., 2008).

Alterações no manejo alimentar e no balanceamento das dietas são responsáveis por mudanças nas concentrações de gordura e proteína do leite. Além disso, o consumo de matéria seca, a disponibilidade das fibras, a relação energia/proteína da dieta são considerados uns dos principais fatores que afetam a composição do leite (SANTOS; FONSECA, 2007).

A mastite, também, determina uma série de mudanças tanto na composição e características físico-químicas como na produção do leite (OGOLA et al., 2007). Essas alterações são atribuídas pela mudança na permeabilidade vascular devido ao processo inflamatório, pela lesão do epitélio glandular secretor responsável pela síntese de alguns componentes do leite e pela ação enzimática de células somáticas ou de microrganismos presentes na glândula (SHARIF; MUHAMMAD, 2008).

Alta CCS está associada com alteração na qualidade protéica, na composição da gordura, lactose e minerais e no aumento da atividade enzimática e do pH do leite cru (OGOLA et al., 2007). Dentre os componentes do leite, as proteínas são as que sofrem os maiores efeitos, principalmente, a fração caseína que diminui significativamente, ainda que a porcentagem de proteína total do leite não varie. O teor de lactose, na glândula mamária infectada, pode diminuir em até 10%. Apesar da queda da gordura do leite, a concentração de ácidos graxos livres e fosfolipídeos aumentam. A parte mineral também é afetada, uma vez que, ocorre queda na concentração de cálcio e potássio, mas aumento nos níveis de sódio e cloro. Por esta razão, mudanças na composição do leite podem alterar significativamente o seu valor como matéria-prima (SANTOS; FONSECA, 2007).

Durante a infecção intramamária, acentuadas mudanças ocorrem no tipo de proteína do leite; as sínteses de β-lactoglobulina e α-lactoalbumina são reduzidas, mas o conteúdo de albumina sérica, concentrações de imunoglobulinas, lactoferrina e atividade enzimática aumentam devido à presença dos polimorfonucleares e da alteração da permeabilidade vascular (LINDMARK-MANSSONA et al., 2006).

Para Pyorala (2003) as mudanças na composição do leite dependem do grau da resposta inflamatória, da patogenicidade do agente etiológico e do tecido da glândula mamária afetado pela mastite.

As concentrações de algumas enzimas, tais como: catalases, N-acetil-β-D-glucosaminidase, plasmina e diferentes lipases e proteases aumentam durante o processo inflamatório da glândula mamária (PYORALA, 2003). Segundo Sharif e Muhammad (2008) algumas enzimas resistem ao tratamento térmico e permanecem ativas durante o período de estocagem dos derivados lácteos (até mesmo depois de 14 a 21 dias de armazenamento) resultando em alteração do sabor e do aroma.

A mastite tem grande importância na qualidade dos produtos lácteos, uma vez que, na sua presença, ocorre o aumento da proteólise e lipólise, que, por sua vez, leva à alteração da fração protéica e aumento dos ácidos graxos livres. O acúmulo de pequenos peptídeos e destes ácidos graxos livres originam um produto lácteo de sabor amargo e rançoso, com baixo tempo de prateleira (MURPHY et al., 1989).

Elevada CCS tem sido associada à pobre qualidade dos queijos devido ao aumento do coalho e diminuição da firmeza. Leite com alta CCS gera sérios danos durante o processamento do leite pasteurizado e do leite em pó, pois devido sua menor estabilidade calórica, durante o tratamento térmico, o leite sofre coagulação e floculação (LE ROUX et al., 2003). Para fabricação de iogurte, Fernandes et al. (2007), sugerem que o leite cru utilizado para fabricação deste subproduto não deve apresentar CCS acima 400 x 10^3 células/mL para evitar mudanças significativas na viscosidade e sabor do iogurte.

Os principais indicadores da qualidade do leite são a CBT e CCS. No entanto, atualmente, os conteúdos de gordura e proteína do leite são utilizados como critério de pagamento do leite pelas indústrias de lacticínio, pelo seu rendimento industrial (DOBRANIC et al., 2008). Porém, os teores de gordura e proteína não são indicadores de mastite. Outros componentes do leite têm sido propostos como indicadores de saúde do úbere, tais como: lactoferrina, teor de lactose, concentração de ácido lático e atividade enzimática da N-acetil-β-D-glucosaminidase; uma vez que

estas substâncias apresentam correlação significativa com a CCS (LINDMARK-MANSSONA et al., 2006).

Segundo Bansal et al. (2005) os constituintes do leite devem ser considerados como ferramenta auxiliar para o diagnóstico da mastite, pois variam conforme a fração do leite coletada. Nos primeiros jatos há um aumento do conteúdo de lactose e proteína, mas baixos teores de gordura; já, na fração de leite alveolar a porcentagem de lactose e proteína diminuem e ocorre aumento das concentrações de gordura e CCS.

Segundo Sharif e Muhammad (2008), o entendimento da relação entre produção de leite de alta qualidade com a CCS é de fundamental importância para a rentabilidade da cadeia produtiva do leite.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DOS REBANHOS

Foram utilizadas 221 vacas lactantes da raça Gir provenientes de três fazendas comerciais **(Quadro 1)**, situadas nos municípios de Vargem Grande do Sul e Mococa, Estado de São Paulo e Uberaba / Minas Gerais.

As coletas de leite foram realizadas no período de Julho de 2008 a Junho de 2009. As amostras de leite foram coletadas de todas as vacas em lactação, abrangendo as fêmeas de diferentes idades, estágio de lactação e ordem de parto. Estes animais foram mantidos durante este período sob as condições de clima e manejo de cada fazenda correspondente, seguindo a rotina de ordenha própria de cada rebanho (manual ou mecânica).

Os rebanhos foram classificados em três sistemas de produção: sistema especializado, semi-especializado e não especializado. O rebanho da região de Vargem Grande do Sul/SP foi caracterizado como não especializado, pois o sistema de ordenha era manual e não se aplicava medidas de controle da mastite (exceto tratamento de vaca seca e de casos clínicos). A fazenda de Mococa/SP foi classificada como semi-especializada, por apresentar ordenha mecânica, tipo espinha de peixe 4 x 4 e linha alta. No entanto, as práticas de controle da mastite estavam sendo adotadas, tais como: pré-*dipping* e secagem dos tetos com papel toalha, além do tratamento de vacas secas e de casos clínicos. A categoria sistema de produção especializado foi aplicada ao rebanho de Uberaba/MG, pois as vacas eram ordenhadas mecanicamente, tipo *tanden* 6 x 6, linha baixa; onde as práticas (teste da caneca de fundo preto, pré-*dipping*, secagem dos tetos com papel toalha, tratamento de vacas secas e de casos clínicos) do programa de controle da mastite eram realizadas. Entretanto, em todas as situações, era necessária à presença do bezerro para a primeira mamada antes do início da ordenha, como estímulo para ejeção do leite. Nos três rebanhos, a técnica do pós-dipping não era aplicada, pois ao final de cada ordenha os bezerros eram soltos junto às fêmeas.

		Rebanhos	
Características	**A**	**B**	**C**
Número de vacas	74	51	96
Localização	Vargem G. do Sul/SP	Mococa/SP	Uberaba/MG
Tipo de produção	não especializado	semi-especializado	especializado
Produção total	700L/dia	500L/dia	900L/dia

Quadro 1 - Caracterização do rebanho experimental

3.2 AMOSTRAGEM

A coleta das amostras de leite de cada animal selecionado foi feita durante a primeira ordenha do dia, uma vez por mês, durante os 12 meses de experimento. Antes do início da ordenha, após os primeiros jatos terem sido desprezados, os tetos foram imersos em solução de iodo (0,5%) e, decorridos 20 segundos, foram secados com papel toalha descartável. Foram coletadas todas as amostras estéreis e individuais de leite de todos os quartos mamários para cultura microbiológica e para análises de CCS e composição do leite.

Após o término da ordenha foram coletadas amostras compostas (dos quatro quartos mamários) de cada vaca para as análises microbiológicas, CCS e composição do leite.

3.2.1 Análise da CCS e composição do Leite

Para a avaliação da CCS e composição do leite as amostras foram coletadas em recipientes plásticos de 50 mL, contendo 10 mg de Bronopol, identificados com a data da coleta, nome da fazenda, nome do animal e do quarto mamário examinado. Após a agitação das amostras, as mesmas foram acondicionadas em caixas, e encaminhadas por correio, imediatamente após a coleta, para o Laboratório Clínica do Leite – Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de

Queiroz" da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP, Piracicaba-SP). A contagem eletrônica de células somáticas das amostras de leite foi realizada pelo método de citometria de fluxo com o equipamento Somacount 300® (BENTLEY, 1995) e para composição do leite (lactose, proteína total, gordura, extrato seco desengordurado ou ESD) foi empregada a técnica com analisador rápido de infravermelho (BARBANO; CLARK, 1989), ambas realizadas no Laboratório Clínica do Leite – Departamento de Zootecnia da ESALQ-USP (Piracicaba-SP).

3.2.2 Análise microbiológica do leite

Para o procedimento de isolamento e identificação de patógenos primários e secundários, foi utilizada a metodologia proposta por (DOHOO; LESLIE, 1991). As amostras de leite cru de cada quarto mamário foram transportadas em caixas isotérmicas com gelo (4,5ºC) para o Laboratório de Microbiologia dos Alimentos do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VNP-FMVZ/USP), Pirassununga-SP.

Para o isolamento primário dos microrganismos foi utilizado o meio de cultura Ágar Sangue (5% de sangue bovino) em placa de Petri descartável estéril (90x15mm), onde foram inoculados 0,1mL de leite com auxílio de alça de platina calibrada, pelo método de estriamento. As placas foram então incubadas aerobicamente à temperatura de 37°C por 24 horas e 48 horas. Decorrido o tempo de incubação, foi avaliado o crescimento microbiano, observando-se as características morfológicas das culturas bacterianas, tais como: cor, aspecto, tamanho e presença ou ausência de hemólise.

Para a identificação das espécies bacterianas, foram realizadas as seguintes provas bioquímicas: coloração de Gram (para diferenciar grupos de bactérias Gram-positivas das Gram-negativas), hidróxido de potássio (KOH) como teste confirmatório da coloração de Gram, prova da catalase com peróxido de hidrogênio a 3% (diferenciação de bactérias catalase-positivas das catalase-negativas), prova da coagulase com plasma de coelho estéril (diferenciação dos *Staphylococcus aureus* coagulase-positiva daqueles *Staphylococcus sp.* coagulase-negativa), teste

de produção do fator CAMP e esculina (identificação e diferenciação do gênero *Streptococcus sp.*). Os testes aplicados para identificação de grupos Gram-negativos foram: fermentação da lactose, motilidade, indol, citrato, vermelho de metila (VM/VP).

Os patógenos foram classificados conforme recomendação do National Mastitis Council: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis, Streptococcus agalactiae, Streptococcus dysgalactiae*; cepas Gram-negativas (*Pseudomonas sp., Escherichia coli, Klebsiella sp., Enterobacter sp., Salmonella sp., Proteus sp*.), *Staphylococcus sp.* coagulase negativa ou micrococus, *Corynebacterium sp.* Os quatro primeiros grupos foram considerados patógenos primários e os dois últimos secundários (SCHEPERS et al., 1997).

As amostras consideradas positivas foram aquelas que apresentaram isolamento de um tipo de microrganismo e negativas na ausência do patógeno. Amostra com crescimento de mais de um tipo de agente foi considerada contaminada e excluída da análise estatística.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para obter uma distribuição normal os valores da CCS foram transformados em escala logarítmica na base 10 (logCCS). O quarto mamário e a vaca foram considerados unidades experimentais (UE).

3.3.1 Modelo estatístico

Considerando o quarto mamário como unidade experimental, o modelo estatístico incluiu os seguintes efeitos: rebanho, vaca, quarto mamário, microrganismo, presença ou ausência da infecção intramamária e as interações, conforme descrito por (SCHEPERS et al., 1997).

Em nível de quartos mamários, foram utilizados quatro modelos. Para o conjunto de dados com e sem isolamento microbiano, três modelos foram considerados, com os seguintes efeitos:

$$(1)\ Y=\mu+R+V(r)+M+Q+IIM+IIM*M+e$$

$$(2)\ Y=\mu+R+V(r)+M+Q+MO+MO*M+e$$

$$(3)\ Y=\mu+R+V(r)+M+Q+PATOG+PATOG*M+e$$

Onde:

Y= valores do logCCS, lactose, proteína, gordura e ESD;

μ= média geral;

R= efeito fixo do rebanho (i=1 a 3);

V(r)= efeito aleatório da vaca (i=1 a 221) dentro do rebanho;

M= efeito fixo do mês de coleta (i=1 a 12);

Q= efeito fixo do quarto mamário (i=1 a 4);

IIM= efeito fixo da presença e ausência de infecção intramamária (i=o ou 1);

MO= efeito fixo de cada microrganismo isolado e amostras negativas (i=0 a 5)

PATOG=efeito fixo dos patógenos (primários e secundários) e amostras negativas (i=0 a 3);

IIM*M= efeito de interação entre infecção intramamária e mês de coleta;

MO*M= efeito de interação entre os microrganismos e mês de coleta;

PATOG*M= efeito de interação entre os grupos de patógenos e mês de coleta

e= erro .

Foi utilizado, somente para as amostras sem isolamento microbiano, o modelo (4) com os efeitos:

$$(4)\ Y=\mu+R+V(r)+M+Q+e$$

Onde:

CCS= valores do logCCS, lactose, proteína, gordura e ESD;

μ= média total;

R= efeito fixo do rebanho (i=1 a 3);

V(r)= efeito aleatório da vaca (i=1 a 227) dentro do rebanho;

M= efeito fixo do mês de coleta (i=1 a 12);

Q= efeito fixo do quarto mamário (i=1 a 4);

e= erro .

Como não foram isoladas quantidades significativas de enterobactérias, *Streptococcus agalactiae*, *Bacillus sp*.; *Pesudomonas sp*.; *Arcanobacterium sp*. e leveduras, estes resultados não foram incluídos na análise estatística.

Por fim, considerando a vaca como unidade experimental (pelas amostras compostas dos quatro quartos mamários) o modelo estatístico incluiu os seguintes efeitos: vaca, rebanho, número que quartos mamários infectados; presença ou ausência da mastite, microrganismo e as interações.

Para estudar o efeito do tipo de microrganismo sobre a CCS de amostras compostas, foi necessário, quando isolado mais de um tipo de bactéria, excluir aquele patógeno que menos contribuiu para a alta CCS.

As amostras compostas com e sem isolamento microbiano foram analisadas com base nos seguintes modelos estatísticos:

$$(5)\ Y=\mu+R+V(r)+M+NQ+e$$

$$(6)\ Y=\mu+R+V(r)+M+IIM+IIM*M+e$$

$$(7)\ Y=\mu+R+V(r)+M+MO+MO*M+e$$

$$(8)\ Y=\mu+R+V(r)+M+PATOG+PATOG*M+e$$

Onde:

Y= valores do logCCS, lactose, proteína, gordura e ESD;

μ= média geral;

R= efeito fixo do rebanho (i=1 a 3;)

V(r)= efeito aleatório da vaca (i=1 a 221) dentro do rebanho;

M= efeito fixo do mês de coleta (i=1 a 12);

NQ= efeito fixo do número de quartos mamários infectados (i=0 a 4);

IIM= efeito fixo da presença e ausência de infecção intramamária (i=o ou 1;)

MO= efeito fixo de cada microrganismo isolado e amostras negativas (i=0 a 5)

PATOG= efeito fixo dos patógenos (primários e secundários) e amostras negativas (i=0 a 3);

IIM*M= efeito de interação entre infecção intramamária e mês de coleta;

MO*M= efeito de interação entre os microrganismos e mês de coleta;

PATOG*M= efeito de interação entre os grupos de patógenos e mês de coleta

e= erro.

Para o conjunto de dados referente as amostras compostas sem isolamento microbiano foi considerado o modelo estatístico a seguir:

$$(9)\ Y=\mu+R+V(r)+M+e$$

Onde:

Y= valores do logCCS, lactose, proteína, gordura e ESD;

μ= média geral;

R= efeito fixo do rebanho (i=1 a 3);

V(r)= efeito aleatório da vaca (i=1 a 221) dentro do rebanho;

M= efeito fixo do mês de coleta (i=1 a 12);

e= erro.

Todos os modelos descritos anteriormente foram analisados pelo procedimento GLM do software SAS (SAS, 1999), com nível de significância de $P< 0,05$.

3.3.2 Sensibilidade e especificidade da CCS

Para determinar a sensibilidade, especificidade e valor preditivo (positivo e negativo) dos limiares da CCS para identificação de quartos infectados, foram usados quatro valores da CCS: 100, 200, 300 e 400 (x 1000 células/mL), considerando-se como método padrão para a identificação de infecção intramamária o resultado de cultura microbiológica (MCDERMOTT; NATZKE, 1982).

Para estas análises foram consideradas como: a) sensibilidade: a proporção de resultado positivo acima do limiar; b) especificidade: é a proporção do resultado negativo abaixo do limiar; c) valor preditivo positivo: a proporção dos testes positivos que são verdadeiramente positivos; d) valor preditivo negativo: a proporção de testes negativos que são verdadeiramente negativos. Foi também calculada a prevalência da mastite subclínica no rebanho estudado.

Os cálculos da sensibilidade e especificidade foram aplicados à três diferentes critérios de diagnóstico da mastite. No primeiro critério, foram consideradas amostras infectadas, somente aquelas com o isolamento de patógenos primários, enquanto que amostras com isolamento de patógenos secundários e negativas foram consideradas não infectadas. No segundo critério, amostras com isolamento de patógenos primários e secundários foram consideradas infectadas e as amostras sem isolamento microbiano foram classificadas como não infectadas. Por fim, no terceiro critério, as amostras com isolamento de patógenos secundários foram excluídas tanto do diagnóstico positivo quanto negativo para mastite.

Para avaliar a chance da ocorrência da mastite para os limiares da CCS, já determinados anteriormente, o cálculo do "*odds ratio*" foi feito como descrito por (PEREIRA, 2008).

Segue abaixo as respectivas fórmulas utilizadas para os cálculos de:

Sensibilidade=VP/(VP+FN);
Especificidade=VN/(VN+FP);
Valor Preditivo Positivo=VP/(VP+FP);
Valor Preditivo Negativo=VN/(VN+FN);
Prevalência=(VP+FN)/(VP+VP+VN+FN);
Odds ratio= (VP/VN);

Onde:
VP= teste verdadeiramente positivo (vaca infectada com CCS acima do limiar);
VN= teste verdadeiramente negativo (vaca sadia com CCS abaixo do limiar);
FP= falso positivo (vaca sadia com CCS acima do limiar);
FN=falso negativo (vaca infectada com CCS abaixo do limiar).

3.3.3 Correlação entre CCS e composição do leite

O coeficiente de Pearson foi utilizado para investigar a correlação entre os níveis da CCS e a composição do leite, através do procedimento CORR do software SAS (OGOLA et al., 2007).

4 RESULTADOS

4.1 PREVALÊNCIA DA MASTITE SUBCLÍNICA EM QUARTOS MAMÁRIOS

Do total de 2840 amostras de leite de quartos mamários, 1411 apresentaram crescimento bacteriano, indicando uma prevalência de 49,68% (1411/2840) de mastite subclínica nos rebanhos estudados.

O maior índice percentual da ocorrência da mastite por rebanho foi observado na fazenda de Mococa com 64,04% (472/737) de quartos mamários infectados; o rebanho de Uberaba apresentou prevalência de 56,22% (501/891) e de Vargem Grande do Sul de 36,13% (438/1212) de quartos mamários com mastite.

Os microrganismos mais freqüentemente isolados foram: *Corynebacterium sp.* (35,50%); *Staphylococcus aureus* (30,75%); *Staphylococcus sp*. coagulase negativa (28,70%); *Streptococcus uberis* (3,75%) e *Streptococcus dysgalactiae* (1,27%).

A prevalência dos patógenos secundários foi maior do que a prevalência dos patógenos primários. O *Corynebacterium sp.* foi o microrganismo mais isolado; seguido por *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus sp.* coagulase negativa. Os patógenos primários: *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis* apresentaram menor prevalência.

4.2 FATORES QUE AFETAM A CCS E COMPOSIÇÃO DO LEITE DE QUARTOS MAMÁRIOS

4.2.1 Efeito do rebanho, mês de coleta, quarto mamário e presença de infecção intramamária sobre a composição do leite e CCS

Considerando o conjunto de dados de amostras com e sem isolamento microbiano, com 2840 observações dos três rebanhos estudados, a média geral do logCCS foi de 5,08 ± 0,82 (CCS de 120.226 células/mL).

Os resultados do logCCS e dos constituintes do leite para cada rebanho estão apresentados na **tabela 1**:

Tabela 1– Efeito do rebanho sobre a composição do leite e logCCS em amostras de quartos mamários infectados e não infectados de vacas Gir

	Rebanhos						
Variáveis	**V. G. Sul (n=1211)**	**EPM**	**Mococa (n=737)**	**EPM**	**Uberaba (n=891)**	**EPM**	**P**
LogCCS [1]	5,21	0,02	5,15	0,03	5,13	0,02	0,17
Lactose (%)	4,52	0,01	4,53	0,01	4,44	0,02	0,06
Proteína (%)	3,75 [A]	0,01	3,40 [B]	0,01	3,78 [A]	0,01	<0,0001
Gordura (%)	2,39 [A]	0,03	1,59 [B]	0,04	1,28 [C]	0,02	<0,0001
ESD [2] (%)	9,28 [A]	0,01	8,93 [B]	0,02	9,18 [A]	0,02	<0,0001

[1] logCCS (CCSx10^3céls/mL). [2] Extrato seco desengordurado

[A,B,C] médias ajustadas na mesma linha quando seguidas de letras distintas diferem entre si a P<0,05

O efeito do rebanho não foi significativo sobre o logCCS e o teor de lactose do leite. No entanto, houve efeito do rebanho sobre os teores de proteína, gordura e ESD. Os maiores teores de proteína e ESD do leite foram observados nos rebanhos de Vargem G. do Sul (3,75% e 9,28%; respectivamente) e Uberaba (3,78% e 9,18%; respectivamente) do que no rebanho de Mococa, com baixos teores de proteína e ESD do leite (3,40% e 8,93%; respectivamente). O teor de gordura do leite variou significativamente entre os três rebanhos; sendo que o maior valor foi encontrado no rebanho de Vargem G. do Sul (2,39%) seguido pelo rebanho de Mococa (1,59%) e Uberaba; este último com o menor teor de gordura do leite (1,28%).

A distribuição do logCCS e dos constituintes do leite em relação à localização dos quartos mamários está apresentada na **tabela 2**:

Tabela 2 – Efeito da localização dos quartos mamários sobre a composição do leite e logCCS em amostras de quartos mamários infectados e não infectados de vacas Gir

	Quartos mamários								
Variáveis	AD [1] (n=669)	EPM	AE [2] (n=712)	EPM	PD [3] (n=734)	EPM	PE [4] (n=725)	EPM	P
LogCCS [5]	5,12 [B]	0,03	5,13 [B]	0,03	5,24 [A]	0,02	5,16 [B]	0,03	0,01
Lactose (%)	4,52	0,02	4,51	0,02	4,46	0,02	4,50	0,02	0,13
Proteína (%)	3,66	0,01	3,63	0,01	3,64	0,01	3,65	0,01	0,60
Gordura (%)	1,71	0,04	1,74	0,04	1,80	0,04	1,77	0,03	0,31
ESD [6] (%)	9,17	0,02	9,13	0,02	9,09	0,02	9,14	0,02	0,09

[1] Quarto mamário anterior direito. [2] Quarto mamário anterior esquerdo. [3] Quarto mamário posterior direito. [4] Quarto mamário posterior esquerdo. [5] LogCCS (CCSx10^3 céls/mL). [6] Extrato seco desengordurado.

[A,B] médias ajustadas na mesma linha quando seguidas de letras distintas diferem entre si a P<0,05

A localização dos quartos mamários não afetou a composição do leite. Porém, houve efeito significativo da localização dos quartos mamários sobre o logCCS. O quarto mamário posterior direito apresentou o maior valor do logCCS (5,24) comparado aos quartos mamários anteriores e posterior esquerdo que não diferiram entre si.

O efeito da interação entre a presença de infecção intramamária e mês de coleta foi significativo sobre o logCCS e sobre os teores de lactose e proteína do leite. Todavia, o efeito da presença da infecção intramamária sobre o teor de gordura e ESD está apresentado na **tabela 3:**

Tabela 3 – Efeito da presença da infecção intramamária sobre os teores de gordura e extrato seco desengordurado do leite em amostras de quartos mamários de vacas Gir

	Infecção Intramamária				
Constituintes	Sim (n=1411)	EPM	Não (n=1429)	EPM	P
Gordura (%)	1,73	0,02	1,78	0,03	0,36
ESD [1] (%)	9,06 [B]	0,01	9,20 [A]	0,01	<0,0001

[1] Extrato seco desengordurado

[A,B] médias ajustadas na mesma linha seguidas de letras distintas diferem entre si a P<0,05

O efeito da presença da infecção intramamária foi significativo, somente, sobre o teor de ESD do leite. Quartos mamários não infectados apresentaram maior média de ESD (9,20%) do que quartos mamários infectados (9,06%).

Os resultados do efeito do mês de coleta sobre os teores de gordura e ESD estão expressos na **tabela 4**:

Tabela 4 - Efeito do mês de coleta sobre os teores de gordura e extrato seco desengordurado do leite em amostras de quartos mamários infectados e não infectados de vacas Gir

		Constituintes (%)			
Mês	**n**	**Gordura**	**EPM**	**ESD [1]**	**EPM**
Janeiro	150	1,64 [DE]	0,07	8,84 [CD]	0,04
Fevereiro	365	1,57 [E]	0,05	9,10 [B]	0,03
Março	372	1,72 [CD]	0,05	9,11 [B]	0,03
Abril	273	1,75 [CD]	0,08	9,14 [B]	0,03
Maio	364	2,01 [B]	0,05	9,27 [A]	0,03
Junho	190	2,46 [A]	0,08	9,09 [B]	0,05
Julho	125	1,08 [G]	0,07	9,25 [AB]	0,07
Agosto	220	1,86 [BCF]	0,07	9,32 [A]	0,03
Setembro	59	1,65 [DEF]	0,12	9,31 [A]	0,06
Outubro	107	1,97 [B]	0,09	9,38 [A]	0,03
Novembro	388	1,66 [DE]	0,04	8,80 [D]	0,04
Dezembro	227	1,66 [DE]	0,07	8,94 [C]	0,03
Probabilidades		<0,0001		<0,0001	

[1] Extrato seco desengordurado

[A,B, C] médias ajustadas, na mesma coluna, quando seguidas de letras distintas diferem entre si a P<0,05

Houve efeito altamente significativo (P<0,0001) do mês de coleta tanto sobre o teor de gordura quanto sobre o ESD do leite. O maior teor de gordura do leite (2,46%) foi observado no mês junho, em contrapartida, foi no mês julho que se encontrou o menor teor de gordura do leite (1,08%). Verificou-se, nos meses maio, agosto, setembro e outubro, as maiores concentrações de ESD (9,27%; 9,32%; 9,31% e 9,38%; respectivamente). A menor porcentagem de ESD do leite foi observada no mês novembro (8,80%).

Como mencionado anteriormente, foi encontrado efeito de interação entre o mês de coleta com infecção intramamária sobre o logCCS e os teores de lactose e proteína do leite. Os resultados desta interação estão expressos na **tabelas 5**.

Tabela 5 - Efeito da presença da infecção intramamária e do mês de coleta sobre o logCCS e teores de lactose e proteína do leite em amostras de quartos mamários de vacas Gir

	n		LogCCS (CCSx10^{3}céls/mL)			Lactose (%)			Proteína (%)		
Mês	**Sim**	**Não**	**Sim**	**Não**	**EPM**	**Sim**	**Não**	**EPM**	**Sim**	**Não**	**EPM**
Janeiro	103	47	5,55 ^{Aabc}	4,99 ^{Babe}	0,6	4,45 ^{Aab}	4,54 ^{Ace}	0,04	3,26 ^{Af}	3,36 ^{Aef}	0,03
Fevereiro	249	115	5,08 ^{Ad}	4,69 ^{Bdef}	0,04	4,56 ^{Aac}	4,68 ^{Abd}	0,02	3,38 ^{Be}	3,54 ^{Ae}	0,01
Março	214	157	5,23 ^{Ae}	4,81 ^{Bce}	0,04	4,44 ^{Bab}	4,58 ^{Ac}	0,02	3,52 ^{Bc}	3,61 ^{Ad}	0,01
Abril	116	157	5,28 ^{Ace}	5,05 ^{Ba}	0,04	4,38 ^{Ab}	4,44 ^{Ae}	0,02	3,70 ^{Ab}	3,77 ^{Abc}	0,02
Maio	190	174	5,31 ^{Ace}	4,87 ^{Bbc}	0,04	4,42 ^{Aab}	4,44 ^{Ae}	0,02	3,77 ^{Ab}	3,84 ^{Ab}	0,02
Junho	61	128	5,74 ^{Aa}	5,10 ^{Ba}	0,05	3,83 ^{Bd}	4,22 ^{Af}	0,06	4,17 ^{Aa}	4,03 ^{Ba}	0,05
Julho	10	115	5,13 ^{Abce}	4,79 ^{Abe}	0,07	4,75 ^{Aac}	4,65 ^{Abc}	0,05	3,58 ^{Abde}	3,69 ^{Acd}	0,04
Agosto	99	121	5,23 ^{Acde}	4,65 ^{Bef}	0,06	4,71 ^{Aac}	4,84 ^{Aa}	0,02	3,52 ^{Acd}	3,55 ^{Ae}	0,02
Setembro	32	27	5,43 ^{Aabc}	5,00 ^{Bacd}	0,12	4,51 ^{Aabc}	4,64 ^{Aace}	0,05	3,61 ^{Abc}	3,55 ^{Ade}	0,03
Outubro	31	76	5,0,4 ^{Acd}	4,52 ^{Bf}	0,07	4,71 ^{Ac}	4,87 ^{Aa}	0,03	3,68 ^{Ab}	3,73 ^{Ac}	0,04
Novembro	206	182	5,39 ^{Ac}	4,83 ^{Bcde}	0,04	4,41 ^{Bab}	4,57 ^{Acd}	0,03	3,39 ^{Ae}	3,42 ^{Ae}	0,01
Dezembro	98	128	5,60 ^{Aab}	4,87 ^{Bbde}	0,05	4,48 ^{Bab}	4,75 ^{Aab}	0,02	3,24 ^{Af}	3,31 ^{Af}	0,02

^{a,b} Médias ajustadas, na mesma coluna, seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si P<0,05

^{A,B} Médias ajustadas, na mesma linha, seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si P<0,05

Houve efeito da presença da infecção intramamária sobre o logCCS, sendo que os quartos mamários infectados apresentaram maior logCCS do que os quartos mamários não infectados. Também, foi observado o efeito do mês de coleta sobre o logCCS para os grupos de quartos mamários infectados e não infectados. Para os dois grupos, comparando os meses com maior e menor média do logCCS; foi o mês junho que apresentou os maiores logCCS (5,74 e 5,10; respectivamente). No entanto, nos quartos mamários infectados, o mês com menor média do logCCS foi março (5,23) e para os quartos mamários não infectados foi o mês outubro (4,52).

Foi encontrado efeito significativo da presença de infecção intramamária sobre o teor de lactose do leite, somente nos meses de março, junho, novembro e dezembro. Nestes meses, as concentrações de lactose foram mais baixas nos quartos mamários infectados do que nos quartos mamários não infectados. Houve também, efeito do mês de coleta sobre o teor de lactose do leite. Nos quartos mamários infectados e não infectados o mês junho apresentou as menores concentrações de lactose (3,83% e 4,22%; respectivamente), mas nos quartos mamários não infectados os meses com maiores teores de lactose foram agosto e outubro (4,84% e 4,87%; respectivamente).

A presença de infecção intramamária apresentou efeito sobre o teor de proteína do leite somente nos meses fevereiro, março e junho. Para os meses fevereiro e março os baixos teores de proteína do leite foram obtidos nos quartos mamários infectados do que nos não infectados. Em contrapartida, no mês junho foi observado que nos quartos mamários infectados a porcentagem de proteína do leite foi maior do que nos quartos mamários não infectados. O mês de coleta também foi significativo sobre o teor de proteína do leite tanto para os grupos de quartos mamários infectados quanto para os quartos mamários não infectados. Considerando o primeiro grupo de quartos mamários, o maior teor de proteína foi encontrado no mês junho (4,17%) e os menores teores em janeiro (3,26%) e dezembro (3,24%); e, para o segundo grupo de quartos mamários o maior teor de proteína do leite foi verificado em junho (4,03%) e o menor teor em dezembro (3,31%).

4.2.2 Efeito do tipo de microrganismo isolado sobre o logCCS e composição do leite em quartos mamários

O efeito da interação entre o tipo de microrganismo isolado com o mês de coleta foi significativo sobre o logCCS e os teores de lactose e ESD do leite. Por isso, o efeito principal do tipo de microrganismo isolado sobre os teores de proteína e gordura do leite está expresso na **tabela 6**.

Tabela 6 - Efeito do tipo de microrganismo isolado sobre os teores de proteína e gordura do leite em amostras de quartos mamários de vacas Gir

	Isolamento												
Constituintes	***S. aureus* (n=434)**	**EPM**	**SCN[1] (n=405)**	**EPM**	**Coryne[2] (n=501)**	**EPM**	**S. dysg[3] (n=18)**	**EPM**	***S. uberis* (n=53)**	**EPM**	**negativo (n=1429)**	**EPM**	**P**
Proteína (%)	3,42	0,01	3,56	0,01	3,58	0,02	3,36	0,08	3,52	0,05	3,64	0,01	0,07
Gordura (%)	1,68 [AB]	0,05	1,64 [AB]	0,05	1,59 [B]	0,04	1,94 [A]	0,32	1,98 [A]	0,11	1,91 [AB]	0,03	0,02

[1] *Staphylococcus* coagulase negativa, [2] *Corynebacterium sp.,* [3] *Streptococcus dysgalactiae*

[A,B] médias, na mesma linha, quando seguidas por letras distintas diferem entre si a P<0,05 pelo teste de Duncan

Houve efeito significativo do tipo de microrganismo isolado somente sobre o teor de gordura do leite. Ao isolar *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis* o teor de gordura do leite foi maior (1,94% e 1,98%; respectivamente) do que quando isolado *Corynebacterium sp.* (1,59%).

A distribuição dos teores de proteína e gordura do leite em relação aos meses de coleta está apresentada na **tabela 7**:

Tabela 7 - Efeito do mês de coleta sobre os teores de proteína e gordura do leite em amostras de quartos mamários infectados e não infectados de vacas Gir

		Constituintes (%)			
Mês	**n**	**Proteína**	**EPM**	**Gordura**	**EPM**
Janeiro	150	3,29 [F]	0,03	1,91 [BCDE]	0,07
Fevereiro	365	3,44 [EF]	0,01	1,50 [EF]	0,05
Março	372	3,56 [CDE]	0,01	1,66 [CDEF]	0,05
Abril	273	3,74 [BC]	0,02	1,61 [DEF]	0,08
Maio	364	3,80 [B]	0,02	1,91 [BCDE]	0,05
Junho	190	4,07 [A]	0,05	2,37 [AB]	0,08
Julho	125	3,68 [BCD]	0,04	1,55 [DEF]	0,07
Agosto	220	3,54 [DE]	0,02	2,11 [ABC]	0,07
Setembro	59	3,58 [CDE]	0,03	1,60 [DEF]	0,12
Outubro	107	3,72 [BCD]	0,04	2,56 [A]	0,09
Novembro	388	3,41 [EF]	0,01	1,42 [F]	0,04
Dezembro	227	3,28 [F]	0,02	1,98 [BCD]	0,07
Probabilidade		<0,0001		<0,0001	

[A,B, C] médias, na mesma coluna, quando seguidas de letras distintas diferem entre si a P<0,05 pelo teste de Sheffe

Constatou efeito do mês de coleta sobre os teores de proteína e gordura do leite. O mês junho apresentou a maior média do teor de proteína (4,07%) do que os meses janeiro e dezembro (3,29% e 3,28%; respectivamente). Foi no mês outubro que se observou o teor mais elevado de gordura do leite (2,56%) comparado com o mês novembro com baixo teor de gordura (1,42%).

O efeito significativo da interação entre o tipo de microrganismo isolado e o mês de coleta foi observado sobre o logCCS e os teores de lactose e ESD do leite (**Tabelas 8** a **10**).

Tabela 8 - Efeito do tipo de microrganismo isolado e do mês de coleta sobre o logCCS em amostras de leite de quartos mamários de vacas Gir

		Isolamento																
Mês	**n**	***S. aureus***	**EPM**	**n**	**SCN [1]**	**EPM**	**n**	**Cory [2]**	**EPM**	**n**	**Dysga [3]**	**EPM**	**n**	***S. uberis***	**EPM**	**n**	**negativo**	**EPM**
Janeiro	31	5,73 ^{Ba}	0,11	22	5,32 ^{ABab}	0,13	40	5,60 ^{Bab}	0,11	3	5,32 ^{ABab}	0,13	7	5,33 ^{ABb}	0,25	47	6,45 ^{Aa}	0,11
Fevereiro	56	5,11 ^{Bb}	0,11	89	5,07 ^{Bb}	0,08	88	5,03 ^{Bc}	0,07	4	6,40 ^{Aa}	0,06	12	5,12 ^{BCb}	0,20	115	4,69 ^{Cb}	0,06
Março	69	5,38 ^{Aa}	0,10	63	5,21 ^{Bab}	0,09	73	5,03 ^{Bc}	0,08	4	6,08 ^{Aa}	0,22	5	5,54 ^{ABab}	0,29	157	4,81 ^{Cab}	0,05
Abril	23	5,39 ^{Ab}	0,17	58	5,38 ^{Aa}	0,10	34	5,05 ^{Abc}	0,10	1	4,27 ^{ABb}	.	.	.	.	157	5,05 ^{Ba}	0,06
Maio	57	5,15 ^{Aa}	0,10	41	5,46 ^{Aa}	0,11	84	5,33 ^{Ab}	0,07	.	.	.	8	5,36 ^{Ab}	0,15	174	4,87 ^{Ba}	0,06
Junho	9	5,76 ^{Aa}	0,21	12	5,56 ^{Aa}	0,12	34	5,88 ^{Aa}	0,09	.	.	.	6	5,30 ^{ABb}	0,12	128	5,10 ^{Ba}	0,06
Julho	2	6,45 ^{Aa}	0,07	5	5,06 ^{Bab}	0,26	2	4,92 ^{Bb}	0,04	1	3,30 ^{Bb}	.	.	.	.	115	4,79 ^{Bab}	0,07
Agosto	54	5,57 ^{Aa}	0,10	26	4,60 ^{Bc}	0,16	16	5,04 ^{Bc}	0,23	1	6,74 ^{Aa}	.	2	4,80 ^{Bb}	0,50	121	4,65 ^{Bb}	0,07
Setembro	15	5,45 ^{a}	0,24	4	5,55 ^{ab}	0,25	10	5,10 ^{bc}	0,28	1	6,48 ^{a}	.	2	6,08 ^{ab}	0,40	27	5,00 ^{ab}	0,20
Outubro	8	5,27 ^{Aab}	0,22	10	4,90 ^{ABb}	0,23	12	5,02 ^{Ac}	0,22	.	.	.	1	4,90 ^{ABab}	.	76	4,52 ^{Bb}	0,08
Novembro	72	5,27 ^{Aab}	0,09	53	5,40 ^{Aa}	0,10	70	5,16 ^{Bc}	0,98	2	6,37 ^{Aa}	0,13	9	6,12 ^{Aa}	0,17	182	4,83 ^{Cab}	0,06
Dezembro	38	5,27 ^{Aab}	0,10	22	5,56 ^{Aa}	0,14	36	5,40 ^{Ab}	0,10	1	6,17 ^{ABab}	.	1	6,37 ^{ABa}	.	128	4,87 ^{Bab}	0,06

[1] *Staphylococcus sp.* coagulase negativa. [2] *Corynebacterium sp.* [3] *Streptococcus dysgalactiae*.

[A, B] Médias ajustadas, na mesma linha, seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si em P<0,05

[a,b] Médias ajustadas, na mesma coluna, seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si em P<0,05

Tabela 9 - Efeito do tipo de microrganismo isolado e do mês de coleta sobre o teor de lactose do leite em amostras de quartos mamários de vacas Gir

		Isolamento																
Mês	**n**	***S. aureus***	**EPM**	**n**	**SCN [1]**	**EPM**	**n**	**Cory [2]**	**EPM**	**n**	**Dysga [3]**	**EPM**	**n**	***S. uberis***	**EPM**	**n**	**negativo**	**EPM**
Janeiro	31	4,44 ^{a}	0,08	22	4,49 ^{b}	0,10	40	4,43 ^{a}	0,08	3	4,66 ^{a}	0,06	7	4,41 ^{a}	0,14	47	4,54 ^{b}	0,07
Fevereiro	56	4,54 ^{ABa}	0,09	89	4,53 ^{Bb}	0,06	88	4,65 ^{ABa}	0,03	4	3,83 ^{Cb}	0,18	12	4,58 ^{ABa}	0,10	115	4,68 ^{Ab}	0,03
Março	69	4,41 ^{Ba}	0,07	63	4,36 ^{Bb}	0,08	73	4,55 ^{ABa}	0,04	4	4,24 ^{ABab}	0,15	5	4,26 ^{ABa}	0,35	157	4,58 ^{Ab}	0,03
Abril	23	4,32 ^{ab}	0,07	58	4,36 ^{b}	0,05	34	4,46 ^{a}	0,05	1	4,84 ^{a}	.	.	.	.	157	4,44 ^{b}	0,03
Maio	57	4,48 ^{a}	0,07	41	4,38 ^{b}	0,06	84	4,40 ^{a}	0,04	.	.	.	8	4,37 ^{a}	0,18	174	4,44 ^{b}	0,04
Junho	9	4,03 ^{Ab}	0,18	12	4,37 ^{Ab}	0,07	34	3,47 ^{Bb}	0,17	.	.	.	6	4,55 ^{Aa}	0,08	128	4,22 ^{Ac}	0,07
Julho	2	4,17 ^{ab}	0,005	5	4,84 ^{a}	0,10	2	4,80^{a}	0,29	1	5,36 ^{a}	.	.	.	.	115	4,65 ^{b}	0,05
Agosto	54	4,60 ^{a}	0,05	26	4,92 ^{a}	0,04	16	4,77 ^{a}	0,07	1	4,16 ^{ab}	.	2	4,92 ^{a}	0,27	121	4,84 ^{a}	0,03
Setembro	15	4,48 ^{a}	0,10	4	4,50 ^{ab}	0,07	10	4,71 ^{a}	0,09	1	4,20 ^{ab}	.	2	3,39 ^{ab}	0,05	27	4,64 ^{ab}	0,08
Outubro	8	4,74 ^{a}	0,23	10	4,86 ^{a}	0,07	12	4,55 ^{a}	0,12	.	.	.	1	4,80 ^{a}	.	76	4,87 ^{a}	0,03
Novembro	72	4,37 ^{Bab}	0,08	53	4,40 ^{Bb}	0,10	70	4,60 ^{Aa}	0,05	2	3,49 ^{Cb}	1,06	9	3,55 ^{Cb}	0,40	182	4,57 ^{Ab}	0,04
Dezembro	38	4,44 ^{Ba}	0,08	22	4,42 ^{Bb}	0,14	36	4,60 ^{ABa}	0,04	1	4,58 ^{ABab}	.	1	2,21 ^{Cc}	.	128	4,75 ^{Aa}	0,02

[1] *Staphylococcus sp.* coagulase negativa. [2] *Corynebacterium sp.* [3] *Streptococcus dysgalactiae*.

[A, B] Médias ajustadas, na mesma linha, seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si em P<0,05

[a,b] Médias ajustadas, na mesma coluna, seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si em P<0,05

Tabela 10 - Efeito do tipo de microrganismo isolado e do mês de coleta sobre o teor de extrato seco desengordurado do leite em amostras de quartos mamários de vacas Gir

		Isolamento																
Mês	**n**	***S. aureus***	**EPM**	**n**	**SCN [1]**	**EPM**	**n**	**Cory [2]**	**EPM**	**n**	**Dysga [3]**	**EPM**	**n**	***S. uberis***	**EPM**	**n**	**negativo**	**EPM**
Janeiro	31	8,60 ^{b}	0,08	22	8,88 ^{b}	0,11	40	8,71	0,09	3	9,15 ^{a}	0,29	7	8,94 ^{b}	0,25	47	9,94 ^{de}	0,07
Fevereiro	56	8,76 ^{Cb}	0,08	89	8,97 ^{Bb}	0,07	88	9,07 ^{AB}	0,04	4	8,48 ^{BCa}	0,31	12	8,83 ^{ACb}	0,12	115	9,22 ^{Ac}	0,05
Março	69	8,85 ^{Bab}	0,08	63	9,00 ^{Bab}	0,07	73	9,08 ^{A}	0,05	4	8,62 ^{Aba}	0,14	5	8,89 ^{ABb}	0,19	157	9,22 ^{Ac}	0,03
Abril	23	8,87 ^{a}	0,10	58	9,12 ^{ab}	0,06	34	9,06	0,08	1	9,24 ^{a}	.	.	.	.	157	9,20 ^{c}	0,04
Maio	57	9,11 ^{a}	0,07	41	9,21 ^{a}	0,07	84	9,27	0,05	.	.	.	8	9,02 ^{ab}	0,19	174	9,28 ^{bc}	0,04
Junho	9	8,81 ^{Bab}	0,31	12	9,38 ^{Aa}	0,09	34	8,77 ^{B}	0,16	.	.	.	6	9,65 ^{Aa}	0,01	128	9,24 ^{Abc}	0,06
Julho	2	8,85 ^{a}	0,38	5	9,58 ^{a}	0,22	2	9,44	0,49	1	9,69 ^{a}	.	.	.	.	115	9,36 ^{bc}	0,07
Agosto	54	9,90 ^{a}	0,07	26	9,39 ^{a}	0,07	16	9,26	0,12	1	8,34 ^{ab}	.	2	9,05 ^{a}	0,72	121	9,39 ^{b}	0,05
Setembro	15	9,10 ^{a}	0,15	4	9,11 ^{ab}	0,12	10	9,23	0,12	1	8,46 ^{ab}	.	2	8,46 ^{b}	0,01	27	9,17 ^{cd}	0,10
Outubro	8	9,30 ^{a}	0,20	10	9,57 ^{a}	0,10	12	9,31	0,07	.	.	.	1	9,53 ^{ab}	.	76	9,64 ^{a}	0,04
Novembro	72	8,57 ^{Cb}	0,11	53	8,61 ^{Cc}	0,12	70	8,96 ^{B}	0,07	2	7,29 ^{Ab}	1,27	9	7,55 ^{Ad}	0,54	182	8,85 ^{Be}	0,06
Dezembro	38	8,73 ^{Bb}	0,10	22	8,72 ^{Bb}	0,15	36	8,95 ^{AB}	0,08	1	8,44 ^{Aab}	.	1	6,68 ^{Bd}	.	128	9,11 ^{Acd}	0,04

[1] *Staphylococcus sp.* coagulase negativa. [2] *Corynebacterium sp.* [3] *Streptococcus dysgalactiae*.

[A, B] Médias ajustadas, na mesma linha, seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si em P<0,05

[a,b] Médias ajustadas, na mesma coluna, seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si em P<0,05

O tipo de microrganismo isolado sobre o logCCS não foi significativo apenas no mês setembro. No mês de janeiro, o logCCS foi maior quando não se isolou microrganismos (logCCS=6,45) quando comparado às amostras com isolamento de *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium sp*. que apresentaram as menores médias do logCCS (5,73 e 5,60; respectivamente). Já no mês fevereiro, amostras com isolamento de *Streptococcus dysgalactiae* apresentaram maior logCCS (6,40) do que amostras negativas (logCCS=4,69). Em março, o maior valor da CCS foi observado ao isolar *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus dysgalactiae* (logCCS=5,38 e 6,08; respectivamente). No entanto, o menor logCCS foi observado em amostras negativas (logCCS=4,81). No mês maio, o isolamento de microrganismos aumentou o logCCS quando comparado as amostras negativas. Exceto para as amostras com isolamento de *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*, nos meses abril e dezembro, os maiores logCCS foram obtidos em amostras com isolamento microbiano do que amostras negativas. Para o mês junho, amostras negativas apresentaram menor logCCS (5,10) do que amostras com crescimento microbiano, exceto para amostras com isolamento de *Streptococcus uberis* que não diferiram das demais bactérias e amostras negativas. Em julho, o maior logCCS (6,45) foi verificado em amostras com isolamento de *Staphylococcus aureus* comparadas as amostras negativas e com aquelas onde há presença de outras bactérias. Altos valores do logCCS foram observados, no mês agosto, nas amostras com isolamento de *Staphylococcus aureus e Streptococcus dysgalactiae* (5,57 e 6,74); conseqüentemente, baixos logCCS foram obtidos no isolamento das demais bactérias e em amostras negativas. No mês outubro, comparando os maiores com os menores valores do logCCS foi em amostras com crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium sp*. que se notou os maiores valores do logCCS (5,27 e 5,02; respectivamente) e as amostras negativas apresentaram a menor média do logCCS (4,52). Em novembro, os maiores resultados de CCS foram obtidos ao isolar *Staphylococcus aureus, Staphylococcus sp*. coagulase negativa, *Streptococcus uberis e Streptococcus dysgalactiae*; seguido pelo *Corynebacterium sp*.. No entanto, o menor logCCS foi observado nas amostras negativas.

Houve efeito do mês de coleta sobre o logCCS em todos os tipos de microrganismos isolados e amostras negativas. Para quartos mamários com

isolamento de *Staphylococcus aureus*, os meses que apresentaram as menores médias foram fevereiro e abril (logCCS=5,11 e 5,39; respectivamente), sendo que as maiores médias do logCCS foram obtidas nos demais meses, exceto outubro, novembro e dezembro que não diferiram dos outros meses. Nas amostras com crescimento de *Staphylococcus* sp. coagulase negativa os maiores valores do logCCS foram observados em abril, maio, junho, novembro e dezembro, mas foi no mês agosto que se notou o menor logCCS (4,60). Para as amostras com isolamento de *Corynebacterium sp*. o mês que apresentou alto valor da CCS (logCCS=5,88) foi junho, mas os meses fevereiro, março, agosto, outubro e novembro apresentaram os menores valores de CCS. No isolamento de *Streptococcus dysgalactiae* os meses com maiores logCCS foram fevereiro, março, agosto, setembro e novembro, mas abril e julho apresentaram menores médias do logCCS (4,27 e 3,30; respectivamente). Amostras de leite com isolamento de *Streptococcus uberis* tiveram maiores logCCS nos meses novembro (6,12) e dezembro (6,37), enquanto que os meses janeiro, fevereiro, maio, junho e agosto apresentaram os menores valores do logCCS. Os valores do logCCS, de amostras negativas, variaram entre os meses de coleta; os maiores valores foram obtidos nos meses janeiro, abril, maio e junho, mas as menores médias do logCCS foram obtidas em fevereiro, agosto e outubro.

Não houve efeito do tipo de microrganismos isolados sobre o teor de lactose do leite para os meses janeiro, abril, maio, julho, agosto, setembro e outubro. Entretanto, em fevereiro o maior teor de lactose (4,68%) foi obtido nas amostras sem isolamento microbiano, mas o seu baixo teor (3,83%) foi encontrado em amostras com crescimento de *Streptococcus dysgalactiae*. Também, no mês março, as amostras negativas apresentaram maior teor de lactose (4,58%) do que em amostras com isolamento de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus sp*. coagulase negativa (4,41% e 4,36%; respectivamente). Resultados diferentes foram obtidos em junho, no qual, a menor concentração de lactose (3,47%) foi observada em amostras com crescimento de *Corynebacterium sp*. quando comparadas aos demais isolamentos. Em novembro, as altas porcentagens de lactose foram encontradas nas amostras com isolamento de *Corynebacterium sp*. e amostras negativas (4,60% e 4,57%; respectivamente) e as baixas concentrações de lactose nos caos em que *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae* foram encontrados (3,49% e 3,55%; respectivamente). No mês dezembro, as amostras

sem isolamento microbiano apresentaram maior teor de lactose (4,75%) do que amostras com crescimento de *Streptococcus uberis* (2,21%).

Observou-se efeito do mês de coleta sobre o teor de lactose do leite para todos os microrganismos isolados e amostras negativas. Nas amostras com isolamento de *Staphylococcus aureus* os meses que apresentaram maiores teores de lactose foram janeiro, fevereiro, março, maio, agosto, setembro, outubro e dezembro; mas os menores valores de lactose foram obtidos no mês junho (4,03%). No isolamento de *Staphylococcus sp.* coagulase negativa as altas concentrações de lactose foram encontradas em julho (4,84%), agosto (4,92%) e outubro (4,86%) e os demais meses de coleta foram obtidos os baixos valores de lactose. Considerando as amostras com isolamento de *Corynebacterium sp*. o mês que apresentou o menor teor de lactose (3,47%), comparado aos demais, foi junho. No isolamento de *Streptococcus dysgalactiae* os meses com maiores valores de lactose foram janeiro (4,66%), abril (4,84%) e julho (5,36%), mas os menores teores de lactose foram observados nos meses fevereiro (3,83%) e novembro (3,49%). Analisando o grupo de amostras com *Streptococcus uberis* as altas concentrações de lactose foram encontradas nos meses janeiro, fevereiro, março, maio, junho, agosto e outubro; entretanto, o baixo valor de lactose do leite foi notado em dezembro (2,21%). Para as amostras negativas, foram nos meses de agosto, outubro e dezembro que se obtiveram as maiores porcentagens de lactose do leite (4,84%; 4,87%; 4,75% respectivamente), enquanto que, em junho o teor de lactose foi o mais baixo (4,22%).

Não houve efeito do tipo de microrganismo isolado sobre o teor de ESD nos meses de janeiro, abril, maio, julho, agosto, setembro e outubro. Contudo, em fevereiro, o alto teor de ESD foi obtido nas amostras negativas (9,22%) e os menores valores de ESD quando isolado *Staphylococcus aureus* (8,76%). No mês de março, as maiores concentrações de ESD foram encontradas em amostras com isolamento de *Corynebacterium sp*. (9,08%), *Streptococcus dysgalactiae* (8,62%) e amostras negativas (9,22%), porém, os menores teores de ESD foram observados ao isolar *Staphylococcus aureus* (8,85%) e *Staphylococcus sp.* coagulase negativa (9,00%). Em junho, os maiores teores de ESD foram observados em *Staphylococcus sp*. coagulase negativa (9,38%), *Streptococcus uberis* (9,65%) e amostras negativas (9,24%), mas os menores valores de ESD foram verificados em *Staphylococcus*

aureus (8,81%) e *Corynebacterium sp*. (8,77%). Para amostras coletadas em novembro, os maiores teores de ESD foram obtidos para *Streptococcus uberis* (7,29%) e *Streptococcus dysgalactiae* (7,55%) e os menores em *Staphylococcus aureus* (8,57%) e *Staphylococcus sp*. coagulase negativa (8,61%). Por fim, no mês de dezembro as maiores porcentagens de ESD foram encontradas em amostras com *Streptococcus dysgalactiae* (8,44%) e amostras negativas (9,11%), mas os menores teores foram obtidos ao isolar *Staphylococcus aureus* (8,73%), *Staphylococcus sp*. coagulase negativa (8,72%) e *Streptococcus uberis* (6,68%)

Foi, somente, para amostras com isolamento de *Corynebacterium sp*. que não se verificou efeito do mês de coleta sobre o ESD. Considerando as amostras com isolamento de *Staphylococcus aureus* os maiores teores de ESD foram obtidos nos meses abril, maio, julho, agosto, setembro e outubro, os menores valores de ESD foram encontrados em janeiro (8,60%), fevereiro (8,76%), novembro (8,57%) e dezembro (8,73%). Para *Staphylococcus sp*. coagulase negativa foram nos meses maio, junho, julho, agosto e outubro que se obtiveram os maiores teores de ESD, mas em novembro, foi verificado a mais baixa concentração de ESD do leite (8,61%). Altas porcentagens de ESD, em amostras com isolamento de *Streptococcus dysgalactiae* foram encontradas nos meses de janeiro (9,15%), fevereiro (8,48%), março (8,62%), abril (9,24%) e julho (9,69%) e o menor valor de ESD em novembro (7,29%). Amostras com isolamento de *Streptococcus uberis* apresentaram maiores médias de ESD nos meses junho (9,65%) e agosto (9,05%) e menores teores de ESD em novembro (7,55%) e dezembro (6,68%). Nas amostras sem isolamento microbiano o mês de outubro apresentou o maior teor de ESD do leite (9,64%) e o mês novembro o menor valor (8,85%).

4.2.3 Efeito do isolamento de patógenos (primários e secundários) sobre o logCCS e composição do leite de quartos mamários

Sobre o teor de ESD do leite não houve efeito da interação entre o isolamento de patógenos e mês de coleta. Analisando portanto; somente o efeito principal do isolamento de patógenos sobre o teor de ESD foi observado efeito altamente

significativo (P<0,0001) do isolamento de patógenos sobre o ESD. O maior teor deste constituinte do leite foi encontrado nas amostras sem isolamento (9,21%), seguido pelas amostras com isolamento de patógenos secundários (9,11%) e por fim, com a menor porcentagem de ESD do leite (8,98%) para as amostras com isolamento de patógenos primários.

O efeito do mês de coleta sobre o teor de ESD do leite está apresentado na **tabela 11**:

Tabela 11 - Efeito do mês de coleta sobre o teor de extrato seco desengordurado do leite em amostras de quartos mamários infectados e não infectados de vacas Gir

		Constituinte (%)	
Mês	**n**	**ESD [1]**	**EPM**
Janeiro	150	8,81 [D]	0,04
Fevereiro	365	9,04 [C]	0,03
Março	372	9,07 [C]	0,03
Abril	273	9,10 [BC]	0,03
Maio	364	9,26 [A]	0,03
Junho	190	9,10 [BC]	0,05
Julho	125	9,21 [AC]	0,07
Agosto	220	9,30 [A]	0,03
Setembro	59	9,28 [AB]	0,06
Outubro	107	9,33 [A]	0,03
Novembro	388	8,75 [D]	0,04
Dezembro	227	8,89 [D]	0,03
Probabilidade		<0,0001	

[1] Extrato seco desengordurado

[A,B, C] médias ajustadas na mesma coluna quando seguidas de letras distintas diferem entre si a P<0,05

Houve efeito do mês de coleta sobre o teor de ESD, onde os maiores valores foram observados em maio (9,26%), agosto (9,30%) e outubro (9,33%) e os menores teores em janeiro (8,81%), novembro (8,75%) e dezembro (8,89%).

Verificou-se efeito da interação entre o isolamento de patógenos (primários e secundários) com o mês de coleta sobre o logCCS e os teores de lactose, proteína e gordura do leite (**Tabelas 12** a **15**).

Tabela 12 - Efeito do isolamento de patógenos (primários e secundários) e do mês de coleta sobre o logCCS em amostras de leite de quartos mamários de vacas Gir

		LogCCS (CCSx 10^3 cél/mL)							
Mês	**n**	**Primários [1]**	**EPM**	**n**	**Secundários [2]**	**EPM**	**n**	**Negativo**	**EPM**
Janeiro	41	5,63 ^{Aa}	0,09	62	5,50 ^{Aab}	0,08	47	4,99 ^{Bab}	0,11
Fevereiro	72	5,18 ^{Ab}	0,10	177	5,05 ^{Ac}	0,05	115	4,69 ^{Bcd}	0,06
Março	78	5,43 ^{Ab}	0,09	136	5,12 ^{Bc}	0,06	157	4,81 ^{Cbc}	0,05
Abril	24	5,34 ^{b}	0,17	92	5,26 ^{b}	0,07	157	5,05 ^{a}	0,06
Maio	65	5,18 ^{Ab}	0,09	125	5,37 ^{Ab}	0,06	174	4,87 ^{Bb}	0,06
Junho	15	5,57 ^{Aab}	0,14	46	5,79 ^{Aa}	0,08	128	5,10 ^{Ba}	0,06
Julho	3	5,40 ^{ab}	1,05	7	5,02 ^{bcd}	0,18	115	4,79 ^{b}	0,07
Agosto	67	5,56 ^{Aab}	0,10	42	4,77 ^{Bd}	0,13	121	4,65 ^{Bcd}	0,07
Setembro	18	5,58 ^{Aa}	0,21	14	5,23 ^{ABbd}	0,21	27	5,00 ^{Bab}	0,20
Outubro	9	5,23 ^{Ab}	0,20	22	4,97 ^{Acd}	0,15	76	4,52 ^{Bd}	0,08
Novembro	83	5,59 ^{Aa}	0,08	123	5,26 ^{Bcd}	0,06	182	4,83 ^{Cb}	0,06
Dezembro	40	5,81 ^{Aa}	0,09	58	5,46 ^{Bb}	0,08	128	4,87 ^{Cbc}	0,06

[1] Patógenos primários: *S.aureus*, *S. uberis* e *S. dysgalactiae*

[2] Patógenos secundários: *Staphylococcus sp.*coagulase negativa, *Corynebacterium sp*.

[A, B] Médias ajustadas, na mesma linha, seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si em P<0,05

[a,b] Médias ajustadas, na mesma coluna, seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si em P<0,05

Tabela 13 - Efeito do isolamento de patógenos (primários e secundários) e do mês de coleta sobre o teor de lactose do leite em amostras de quartos mamários de vacas Gir

		Lactose (%)							
Mês	**n**	**Primários [1]**	**EPM**	**n**	**Secundários [2]**	**EPM**	**n**	**Negativo**	**EPM**
Janeiro	41	4,45 ^{ab}	0,06	62	4,45 ^{bc}	0,06	47	4,54 ^{cd}	0,07
Fevereiro	72	4,51 ^{Bab}	0,07	177	4,59 ^{ABb}	0,03	115	4,68 ^{Abc}	0,03
Março	78	4,39 ^{Bab}	0,07	136	4,46 ^{ABbc}	0,04	157	4,58 ^{Ac}	0,03
Abril	24	4,34 ^{ab}	0,07	92	4,40 ^{c}	0,03	157	4,44 ^{d}	0,03
Maio	65	4,37 ^{ab}	0,07	125	4,40 ^{c}	0,03	174	4,44 ^{d}	0,04
Junho	15	4,24 ^{Ab}	0,13	46	3,70 ^{Bd}	0,14	128	4,22 ^{Ae}	0,07
Julho	3	4,57 ^{ab}	0,39	7	4,83 ^{ab}	0,09	115	4,65 ^{bc}	0,05
Agosto	67	4,61 ^{Ba}	0,05	42	4,86 ^{Aa}	0,04	121	4,84 ^{Aa}	0,03
Setembro	18	4,40 ^{ab}	0,09	14	4,65 ^{abc}	0,07	27	4,64 ^{abcd}	0,08
Outubro	9	4,75 ^{a}	0,20	22	4,69 ^{a}	0,08	76	4,87 ^{a}	0,03
Novembro	83	4,26 ^{Bb}	0,09	123	4,51 ^{Abc}	0,05	182	4,57 ^{Ac}	0,04
Dezembro	40	4,39 ^{Bab}	0,09	58	4,54 ^{Bbc}	0,06	128	4,75 ^{Aab}	0,02

[1] Patógenos primários: *S.aureus*, *S. uberis* e *S. dysgalactiae*

[2] Patógenos secundários: *Staphylococcus sp.*coagulase negativa, *Corynebacterium sp*.

[A, B] Médias ajustadas, na mesma linha, seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si em P<0,05

[a,b] Médias ajustadas, na mesma coluna, seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si em P<0,05

Tabela 14 - Efeito do isolamento de patógenos (primários e secundários) e do mês de coleta sobre o teor de proteína do leite em amostras de quartos mamários de vacas Gir

		Proteína (%)							
Mês	**n**	**Primários [1]**	**EPM**	**n**	**Secundários [2]**	**EPM**	**n**	**Negativo**	**EPM**
Janeiro	41	3,22 ^{c}	0,05	62	3,29 ^{ef}	0,05	47	3,36 ^{fg}	0,04
Fevereiro	72	3,25 ^{Cc}	0,03	177	3,44 ^{Be}	0,02	115	3,54 ^{Aef}	0,03
Março	78	3,47 ^{Bb}	0,04	136	3,55 ^{Abce}	0,03	157	3,61 ^{Ade}	0,03
Abril	24	3,58 ^{Bab}	0,06	92	3,73 ^{ABbd}	0,04	157	3,77 ^{Abc}	0,02
Maio	65	3,63 ^{Bb}	0,05	125	3,84 ^{Ab}	0,03	174	3,84 ^{Ab}	0,03
Junho	15	3,91 ^{Ba}	0,12	46	4,25 ^{Aa}	0,10	128	4,03 ^{Ba}	0,06
Julho	3	3,52 ^{abc}	0,27	7	3,60 ^{be}	0,22	115	3,69 ^{cd}	0,04
Agosto	67	3,53 ^{b}	0,05	42	3,50 ^{e}	0,05	121	3,55 ^{ef}	0,03
Setembro	18	3,64 ^{ab}	0,07	14	3,57 ^{cde}	0,06	27	3,55 ^{df}	0,04
Outubro	9	3,56 ^{bd}	0,09	22	3,73 ^{bc}	0,08	76	3,73 ^{c}	0,05
Novembro	83	3,34 ^{cd}	0,03	123	3,43 ^{e}	0,02	182	3,42 ^{f}	0,02
Dezembro	40	3,21 ^{c}	0,05	58	3,27 ^{f}	0,05	128	3,31 ^{g}	0,03

[1] Patógenos primários: *S.aureus*, *S. uberis* e *S. dysgalactiae*

[2] Patógenos secundários: *Staphylococcus sp.*coagulase negativa, *Corynebacterium sp*.

[A, B] Médias ajustadas, na mesma linha, seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si em P<0,05

[a,b] Médias ajustadas, na mesma coluna, seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si em P<0,05

Tabela 15 - Efeito do isolamento de patógenos (primários e secundários) e do mês de coleta sobre o teor de gordura do leite em amostras de quartos mamários de vacas Gir

		Gordura (%)							
Mês	**n**	**Primários [1]**	**EPM**	**n**	**Secundários [2]**	**EPM**	**n**	**Negativo**	**EPM**
Janeiro	41	1,74 ^{c}	0,10	62	1,90 ^{ab}	0,14	47	2,07 ^{bc}	0,13
Fevereiro	72	1,30 ^{d}	0,10	177	1,57 ^{c}	0,08	115	1,51 ^{f}	0,08
Março	78	1,70 ^{ABc}	0,14	136	1,42 ^{Bc}	0,08	157	1,85 ^{Ace}	0,09
Abril	24	1,42 ^{Abcd}	0,21	92	1,40 ^{Bc}	0,12	157	1,76 ^{Adef}	0,11
Maio	65	1,92 ^{ABbc}	0,13	125	1,68 ^{Bbc}	0,08	174	2,07 ^{Acf}	0,09
Junho	15	2,64 ^{a}	0,20	46	2,17 ^{a}	0,15	128	2,41 ^{ab}	0,10
Julho	3	1,44 ^{ac}	0,22	7	1,86 ^{ac}	0,22	115	1,54 ^{f}	0,08
Agosto	67	2,18 ^{Aab}	0,16	42	1,68 ^{Bbc}	0,14	121	2,22 ^{Ab}	0,10
Setembro	18	1,93 ^{Aac}	0,24	14	1,08 ^{Bc}	0,14	27	1,65 ^{Abcf}	0,18
Outubro	9	2,62 ^{ab}	0,32	22	2,42 ^{a}	0,24	76	2,60 ^{a}	0,11
Novembro	83	1,32 ^{d}	0,06	123	1,33 ^{c}	0,07	182	1,52 ^{f}	0,07
Dezembro	40	1,92 ^{bc}	0,20	58	1,94 ^{ab}	0,14	128	2,01 ^{cde}	0,10

[1] Patógenos primários: *S.aureus*, *S. uberis* e *S. dysgalactiae*

[2] Patógenos secundários: *Staphylococcus sp.*coagulase negativa, *Corynebacterium sp*.

[A, B] Médias ajustadas, na mesma linha, seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si em P<0,05

[a,b] Médias ajustadas, na mesma coluna, seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si em P<0,05

Não houve efeito do isolamento de patógenos sobre o logCCS para os meses abril e julho. No entanto, nos meses janeiro, fevereiro, maio, junho e outubro o isolamento de patógenos primários e secundários aumentou o logCCS quando comparados ao logCCS de amostras negativas (com menor valor do logCCS). Já em março, novembro e dezembro, os maiores valores do logCCS foram obtidos ao isolar patógenos primários, seguido pelo isolamento de patógenos secundários e, por fim, com menor média do logCCS em amostras negativas. No mês de agosto, tanto amostras com isolamento de patógenos secundários quanto amostras negativas apresentaram as menores médias do logCCS do que amostras com crescimento de patógenos primários. Valores do logCCS de amostras, coletadas em setembro, com isolamento de patógenos secundários não diferiram do logCCS provenientes tanto das amostras com crescimento de patógenos primários (que apresentaram maior média) quanto das amostras negativas (com baixo valor do logCCS).

Foi observado efeito do mês de coleta sobre o logCCS para as amostras tanto com isolamento de patógenos (primários e secundários) quanto para as amostras negativas. Para as amostras com crescimento de patógenos primários os maiores logCCS foram observados nos meses janeiro (logCCS=5,63), setembro (logCCS=5,58), novembro (logCCS=5,59) e dezembro (logCCS=5,81), mas os menores valores de CCS foram obtidos nos meses fevereiro (logCCS=5,18), março (logCCS=5,43), abril (logCCS=5,34), maio (logCCS=5,18), e outubro (logCCS=5,23). Considerando amostras com isolamento de patógenos secundários, o maior valor do logCCS foi encontrado em junho (5,79) e o menor logCCS em agosto (4,77). Em amostras negativas, altos valores da CCS foram observados em abril (logCCS=5,05) e junho (logCCS=5,10). Porém, o menor logCCS foi obtido em outubro (4,52).

Houve efeito do isolamento de patógenos (primários e secundários) sobre o teor de lactose, somente, nos meses fevereiro, março, junho, agosto, novembro e dezembro. Nos meses fevereiro e março os maiores teores de lactose foram obtidos em amostras negativas (4,68% e 4,58%; respectivamente) e os menores valores em amostras com isolamento de patógenos primários (4,51% e 4,39%; respectivamente); teores de lactose referentes às amostras com isolamento de patógenos secundários não diferiram tanto das amostras com patógenos primários quanto das amostras negativas. Porém, em junho, os altos teores de lactose foram observados tanto em amostras com isolamento de patógenos primários (4,24%)

quanto negativas (4,22%) comparados aos teores das amostras com patógenos secundários (3,70%). Diferentemente, nos meses agosto e novembro elevadas concentrações de lactose foram obtidas em amostras com patógenos secundários (4,86% e 4,51%; respectivamente) em amostras negativas (4,84% e 4,57%; respectivamente) do que em amostras com isolamento de patógenos primários (4,61% e 4,26%; respectivamente). Em dezembro, o maior teor de lactose foi encontrado em amostras negativas (4,75%) do que em amostras com isolamento de patógenos tanto primários (4,39%) quanto secundários (4,54%).

Tanto para amostras com isolamento microbiano quanto amostras negativas, houve efeito do mês de coleta sobre o teor de lactose do leite. Para todas estas situações, os meses com maiores teores de lactose foram agosto (4,61%; 4,86% e 4,84%; respectivamente) e outubro (4,75%; 4,69% e 4,87%; respectivamente). Os menores valores de lactose, para amostras com isolamento de patógenos primários foram junho (4,24%) e novembro (4,26%), para as amostras com isolamento de patógenos secundários e amostras negativas foi o mês junho (3,70% e 4,22%; respectivamente).

Foi notado efeito do isolamento de patógenos (primários e secundários) sobre o teor de proteína do leite nos meses de fevereiro, março, abril, maio e junho. Amostras negativas apresentaram maior teor de proteína (3,54%), quando coletadas em fevereiro, do que amostras com isolamento de patógenos secundários (3,44%) e os menores valores foram observados em amostras com isolamento de patógenos primários (3,25%). Em março e maio concentrações elevadas de proteína do leite foram obtidas ao isolar patógenos secundários (3,55% e 3,84%; respectivamente) e amostras negativas (3,61% e 3,84%; respectivamente) do que em amostras com crescimento de patógenos primários (3,47% e 3,63%; respectivamente). Para as amostras coletadas em abril, alto valor de proteína do leite foi observado nos casos de amostras negativas (3,77%) e as baixas porcentagens em amostras com isolamento de patógenos primários (3,58%). No entanto, no mês de junho, o maior teor de proteína foi obtido em amostras com patógenos secundários (4,25%) e os menores tanto em amostras negativas (4,03%) quanto com patógenos primários (3,91%).

Houve efeito do mês de coleta sobre o teor de proteína do leite tanto em amostras com isolamento de patógenos quanto negativas. Para as amostras com isolamento de patógenos primários o maior teor de proteína foi observado no mês

junho (3,91%) e os menores em janeiro (3,22%), fevereiro (3,25%) e dezembro (3,21%). Alta concentração de proteína do leite, em amostras com patógenos secundários, foi obtida em junho (4,25%) e a baixa em dezembro (3,27%). Considerando as amostras sem isolamento de patógenos, o maior valor de proteína do leite, também, foi encontrado em junho (4,03%) e o menor em dezembro (3,31%).

Efeito do isolamento de patógenos (primários e secundários) foi significativo sobre o teor de gordura do leite, apenas nos meses março, abril, maio, agosto e setembro. Nos meses de março e maio os maiores teores de gordura foram obtidos em amostras negativas (1,85% e 2,07%; respectivamente) e os menores valores ao isolar patógenos secundários (1,42% e 1,68%; respectivamente). Em abril, agosto e setembro altas porcentagens de gordura foram encontradas em amostras com crescimento de patógenos primários (1,42%; 2,18% e 1,93%; respectivamente) e negativas (1,76%; 2,22% e 1,65%; respectivamente) do que em amostras com patógenos secundários (1,40%; 1,68% e 1,08%; respectivamente).

Verificou efeito do mês de coleta sobre o teor de gordura do leite em amostras negativas e com isolamento de patógenos (primários e secundários). Considerando todas as amostras com crescimento de patógenos primários o mês com maior teor de gordura do leite foi junho (2,64%) e com os menores valores os meses fevereiro (1,30%) e novembro (1,32%). Altas porcentagens de gordura do leite, em amostras com isolamento de patógenos secundários, foram obtidas nos meses de junho (2,17%) e outubro (2,42%) e as menores em fevereiro (1,57%), março (1,42%), abril (1,40%), setembro (1,08%) e novembro (1,33%). Foi em junho que se encontrou o maior teor de gordura do leite (2,60%) em amostras negativas, e os menores valores em fevereiro (1,51%), julho (1,54%) e novembro (1,52%).

4.2.4 Efeito do rebanho, quarto mamário e mês de coleta sobre o logCCS e composição do leite em amostras sem isolamento microbiano de quartos mamários

Considerando o conjunto de dados de amostras sem isolamento microbiano, totalizando 1429 observações dos três rebanhos estudados, a média geral do logCCS foi de 4,85 ± 0,80 (CCS de 70.794 células/mL).

Os resultados do logCCS e dos constituintes do leite para cada rebanho estão apresentados na **tabela 16**:

Tabela 16 – Efeito do rebanho sobre a composição do leite e logCCS em amostras de quartos mamários não infectados de vacas Gir

	Rebanhos						
Variáveis	**V. G. Sul (n=774)**	**EPM**	**Mococa (n=265)**	**EPM**	**Uberaba (n=390)**	**EPM**	**P**
LogCCS [1]	4,87	0,02	4,88	0,05	5,03	0,04	0, 7
Lactose (%)	4,63 [A]	0,01	4,63 [A]	0,02	4,36 [B]	0,03	0,009
Proteína (%)	3,77 [A]	0,01	3,42 [B]	0,02	3,76 [A]	0,02	<0,0001
Gordura (%)	2,41 [A]	0,04	1,60 [B]	0,07	1,19 [C]	0,04	<0,0001
ESD [2] (%)	9,43 [A]	0,01	9,04 [B]	0,03	9,05 [B]	0,04	0,02

[1] logCCS (CCSx10^3 céls/mL). [2] Extrato seco desengordurado

[A,B,C] médias ajustadas na mesma linha quando seguidas de letras distintas diferem entre si a P<0,05

Não houve efeito significativo do rebanho sobre o logCCS para quartos mamários não infectados. No entanto, verificou efeito do rebanho sobre a composição do leite. O teor de lactose foi menor no rebanho de Uberaba (4,36%) do que nos rebanhos de Vargem G. do Sul e Mococa que apresentaram os maiores valores de lactose, ambos com 4,63%. As concentrações de proteína do leite foram maiores nos rebanhos de Vargem G. do Sul e Uberaba (3,77% e 3,76%; respectivamente) quando comparado ao rebanho de Mococa (3,42%). O teor de gordura do leite diferiu entre os três rebanhos, sendo que o maior valor de gordura foi observado no rebanho de Vargem G. do Sul (2,41%), seguido pelo rebanho de Mococa (1,60%) e por fim, com menor média o rebanho de Uberaba (1,19%). Alto teor de ESD foi encontrado no rebanho de Vargem G. do Sul (9,43%) do que os outros dois rebanhos de Mococa (9,04%) e Uberaba (9,05%).

A distribuição do logCCS e dos constituintes do leite em relação a localização dos quartos mamários está expressa na **tabela 17**:

Tabela 17 – Efeito da localização dos quartos mamários sobre a composição do leite e logCCS em amostras de quartos mamários não infectados de vacas Gir

	Quartos mamários								
Variáveis	AD [1] (n=322)	EPM	AE [2] (n=362)	EPM	PD [3] (n=361)	EPM	PE [4] (n=384)	EPM	P
LogCCS [5]	4,94	0,04	4,88	0,04	5,00	0,04	4,89	0,03	0,13
Lactose (%)	4,56	0,02	4,56	0,02	4,48	0,03	4,56	0,02	0,07
Proteína (%)	3,65	0,02	3,66	0,02	3,63	0,02	3,66	0,02	0,76
Gordura (%)	1,70	0,06	1,70	0,06	1,78	0,06	1,77	0,05	0,67
ESD [5] (%)	9,18 [AB]	0,04	9,20 [A]	0,03	9,09 [B]	0,03	9,22 [A]	0,03	0,02

[1] Quarto mamário anterior direito. [2] Quarto mamário anterior esquerdo. [3] Quarto mamário posterior direito. [4] Quarto mamário posterior esquerdo. [5] Extrato seco desengordurado. [5] LogCCS (CCSx10^3 céls/mL)

[A,B] médias ajustadas na mesma linha quando seguidas de letras distintas diferem entre si a P<0,05

O efeito da localização dos quartos mamário foi significativo apenas sobre o teor de ESD, onde os valores mais elevados de ESD foram obtidos nos quartos mamário anterior esquerdo (9,20%) e posterior esquerdo (9,22%). O quarto mamário posterior direito apresentou menor média de ESD (9,09%), enquanto que, o teor de ESD do quarto mamário anterior direito não deferiu dos demais, com média de 9,28%.

Os resultados do efeito do mês de coleta sobre o logCCS e os constituintes do leite para amostras sem isolamento microbiano estão apresentados na **tabela 18**.

Tabela 18 - Efeito do mês de coleta sobre o logCCS e composição do leite em amostras de quartos mamários sem isolamento microbiano de vacas Gir

				Constituintes do leite (%)							
Mês	**n**	**LogCCS [1]**	**EPM**	**lactose**	**EPM**	**Proteína**	**EPM**	**Gordura**	**EPM**	**ESD [2]**	**EPM**
Janeiro	47	5,06 ^{AB}	0,11	4,45 ^{C}	0,07	3,39 ^{D}	0,04	1,62 ^{CB}	0,13	8,85 ^{C}	0,07
Fevereiro	116	4,78 ^{C}	0,07	4,65 ^{AB}	0,03	3,57 ^{B}	0,03	1,53 ^{C}	0,08	9,21 ^{B}	0,05
Março	157	4,90 ^{B}	0,05	4,52 ^{C}	0,03	3,65 ^{C}	0,03	1,74 ^{B}	0,09	9,19 ^{B}	0,03
Abril	157	5,13 ^{A}	0,06	4,42 ^{C}	0,03	3,79 ^{C}	0,02	1,86 ^{B}	0,11	9,20 ^{B}	0,04
Maio	174	4,94 ^{AB}	0,06	4,39 ^{D}	0,04	3,88 ^{B}	0,03	2,04 ^{BC}	0,09	9,27 ^{B}	0,04
Junho	129	5,17 ^{A}	0,06	4,19 ^{E}	0,07	3,99 ^{A}	0,06	2,34 ^{A}	0,10	9,17 ^{B}	0,06
Julho	115	4,97 ^{A}	0,07	4,53 ^{B}	0,05	3,65 ^{B}	0,04	0,90 ^{D}	0,08	9,17 ^{B}	0,07
Agosto	121	4,74 ^{C}	0,07	4,74 ^{A}	0,03	3,61 ^{B}	0,03	1,85 ^{B}	0,11	9,33 ^{A}	0,05
Setembro	27	4,89 ^{ABC}	0,20	4,60 ^{AB}	0,08	3,76 ^{BC}	0,04	1,65 ^{BC}	0,18	9,32 ^{AB}	0,10
Outubro	76	4,71 ^{C}	0,08	4,74 ^{B}	0,03	3,69 ^{B}	0,05	1,96 ^{B}	0,11	9,44 ^{A}	0,04
Novembro	182	4,86 ^{BC}	0,06	4,59 ^{B}	0,04	3,46 ^{C}	0,02	1,78 ^{BC}	0,7	8,91 ^{BC}	0,06
Dezembro	128	4,97 ^{A}	0,06	4,65 ^{AB}	0,02	3,34 ^{D}	0,03	1,55 ^{C}	0,10	9,01 ^{C}	0,04
Probabilidade		<0,0001		<0,0001		<0,0001		<0,0001		<0,0001	

[1] logCCS (CCS x 10^3 céls/mL). [2] Extrato seco desengordurado.

^{A,B,C} médias ajustadas, na mesma coluna, quando seguidas de letras distintas diferem entre si a P<0,05

Neste caso, foi observado efeito altamente significativo (P<0,0001) do mês de coleta tanto sobre o logCCS quanto sobre a composição do leite para as amostras negativas. Os maiores valores do logCCS foram encontrados nos meses abril (5,13), junho (5,17), julho (4,97) e dezembro (4,97), mas os menores logCCS foram obtidos nos meses fevereiro (4,78), agosto (4,74) e outubro (4,71). Referente ao teor de lactose do leite, a alta concentração foi observada no mês de agosto (4,74%), no entanto, o baixo teor foi achado no mês junho (4,19%). Foram nos meses junho, janeiro e dezembro que se encontraram o maior e os menores valores da proteína do leite (3,99%; 3,39% e 3,34%; respectivamente). Alta porcentagem de gordura do leite foi obtida no mês junho (2,34%) e a mais baixa em julho (0,90%). O maior resultado de ESD do leite foi observado no mês outubro (9,44%) e os baixos teores de ESD em janeiro (8,85%) e dezembro (9,01%).

4.3 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA CCS DE QUARTOS MAMÁRIOS

A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, para os limiares da CCS, para identificação de quartos mamários infectados tanto por patógenos primários quanto secundários (segundo critério de diagnóstico) estão expressos na **tabela 19**:

Tabela 19 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo (positivo e negativo) dos quatro limiares da CCS de quartos mamários de vacas Gir para diagnóstico de mastite causada por patógenos primários e secundários

CCS (x 10^3 cél/mL)	Sensibilidade	Especificidade	VP + [1]	VP - [2]
100	66,2	59,2	61,6	64,0
200	51,2	50,5	64,3	59,9
300	42,9	77,4	65,3	57,8
400	36,9	81,1	65,9	56,6

[1] VP+: valor preditivo positivo

[2] VP-: valor preditivo negativo

O limiar de 100 x 10^3 células/mL apresentou o maior valor de sensibilidade (66,2%), enquanto que, foi no limiar de 400 x 10^3 células/mL que se observou a maior especificidade (81,1%).

Neste estudo, o limiar de 100 x 10^3 células/mL apresentou a maior capacidade em determinar os quartos mamários não infectados; pois obteve o maior valor preditivo negativo (64%). Ou seja, das amostras negativas a probabilidade do quarto mamário ser realmente negativo é de 64%. Deste modo, a escolha do limiar de 100 x 10^3 células/mL minimiza as amostras falso-negativas. Um valor de 66,2% e 61,6% de sensibilidade e valor preditivo positivo; respectivamente, indica que este mesmo limiar, é capaz de identificar os quartos mamários infectados, pois a probabilidade do quarto mamário ser realmente infectado é de 61,6% com altos valores de CCS (baixos resultados falso-positivos).

A média do valor preditivo positivo foi de 64,2%, devido à alta prevalência da mastite (49,68%), uma vez que o valor preditivo positivo está intimamente ligado ao índice de prevalência segundo Mcdermott e Natzke (1982).

O limiar de 200 x 10^3 células/mL, que é usualmente empregado como indicador de mastite bovina por outros autores; nesta pesquisa apresentou sensibilidade de 51,2% e especificidade de 50,5%, com valor preditivo positivo de 64,3%. Porém, devido ao seu valor preditivo negativo ser de apenas 59,9% há um aumento dos resultados falso-negativos comparando ao limiar de 100 x 10^3 células/mL. Por esta razão, o emprego deste limiar como indicador de mastite, neste estudo, prejudicaria a eficiência do programa de controle da mastite, uma vez que, vacas positivas com baixa CCS seriam mantidas no rebanho como fonte de infecção.

Abaixo, na **tabela 20**, estão expressos os resultados de sensibilidade e especificidade dos limiares da CCS conforme o patógeno envolvido na mastite.

Tabela 20 - Sensibilidade e especificidade dos quatro limiares da CCS para identificação de patógenos primários e secundários, considerando três diferentes critérios de diagnóstico em amostras de leite de quartos mamários em vacas Gir

Limiares (CCS x 10^3 céls/mL)	**Sensibilidade (%)**	**Especificidade (%)**
IIM[1]=patógenos primários S/IIM[2]= patógenos secundários e sem isolamento		
100	73,8	50,9
200	59,2	64,6
300	50,8	71,2
400	45,1	75,9
IIM=patógenos primários e patógenos secundários S/IIM= sem isolamento		
100	66,2	59,2
200	51,2	50,5
300	42,9	77,4
400	36,9	81,1
IIM=patógenos primários S/IIM= sem isolamento		
100	73,8	59,2
200	59,2	71,9
300	50,8	77,4
400	45,1	81,1

[1] quartos mamários infectados. [2] quartos mamários não infectados

Quando considerou as amostras infectadas, somente, por patógenos primários os valores da sensibilidade, para todos os limiares, aumentaram quando comparados à sensibilidade de amostras positivas tanto para patógenos primários quanto secundários. Por exemplo, para o limiar de 100 x 10^3 células/mL a sensibilidade passou de 66,2% para 73,8%. Verificou-se também que, ao considerar quartos mamários não infectados, tanto com amostras negativas quanto com isolamento de patógenos secundários, as especificidades diminuíram para todos os limiares comparadas aos valores correspondentes as amostras sem isolamento microbiano. Neste contexto, o limiar de 100 x 10^3 células/mL que apresentava uma especificidade de 59,2%, passou a apresentar uma especificidade de 50,9%.

Na **tabela 21** está apresentada a chance de ocorrer mastite conforme o limiar da CCS.

Tabela 21 - Chances da ocorrência de mastite para cada um dos quatro limiares da CCS em amostras de leite de quatros mamários de vacas Gir

	Limiares da CCS ($x10^3$céls/mL)			
Ocorrência da mastite	**<100**	**<200**	**<300**	**<400**
Sim	475	687	803	888
Não	847	1028	1107	1160
Odds	0,56	0,67	0,72	0,76
Odds Ratio	**1***	**1,19**	**1,28**	**1,35**

* odds ratio para a categoria referente é marcado como 1 (dividido por ele mesmo) e indica que as chances aumentadas nas outras categorias se referem ao contraste em esta categoria

Amostras de leite de quartos mamários com limiar < 200 x 10^3 células/mL apresentaram maior chance (1,19 vezes mais) de ter mastite do que amostras com limiar de < 100 x 10^3 células/mL.

Foi observado que quanto maior o limiar da CCS a chance de apresentar infecção intramamária aumentou.

4.4 CORRELAÇÃO ENTRE A CCS E COMPOSIÇÃO DO LEITE DE QUARTOS MAMÁRIOS

A média dos teores de proteína total, gordura, lactose e ESD do leite correspondentes aos primeiros jatos de leite dos quartos mamários individuais, considerando o conjunto de dados de amostras com e sem isolamento microbiano, foram determinados. As médias dos teores de proteína e gordura do leite foram de 3,58% ± 0,45 e 1,78% ± 1,12; respectivamente. Para o conteúdo de lactose e ESD os valores médios foram de 4,52% ±0,56 e 9,08% ±0,67.

Foi identificada correlação positiva entre o logCCS com proteína do leite (r=0,10) e logCCS com gordura do leite (r=0,25). Conforme o aumento do logCCS houve elevação dos teores de proteína e gordura. Todavia, foi observada uma correlação negativa entre o logCCS com lactose do leite (r= -0,63) e logCCS com ESD (r= -0,47), significando que o aumento no logCCS foram responsáveis pela diminuição dos teores de lactose e ESD do leite.

4.5 PREVALÊNCIA DA MASTITE SUBCLÍNICA EM VACAS GIR DE AMOSTRAS COMPOSTAS

Do total de 752 amostras de leite compostas dos quatro quartos mamários, 592 apresentaram isolamento de pelo menos um tipo de bactéria, indicando uma prevalência de 78,7% (592/752) de mastite subclínica em nível de vaca.

A ocorrência da mastite no rebanho de Vargem G. do Sul foi de 67,07% (218/325), em Mococa foi de 86,2% (163/189) e em Uberaba a prevalência foi de 88,6% (211/238).

Os patógenos secundários foram os mais isolados com 42,1% (317/752) comparados aos patógenos primários com 36,4% (274/752). Referente ao isolamento de patógenos por rebanho, as maiores porcentagens de patógenos secundários foram obtidas nos rebanhos de Uberaba com 55,4% (132/238) e Vargem G. do Sul com 44,6% (145/325) do que no rebanho de Mococa com apenas 21,1% (40/189). Conseqüentemente, foi no rebanho de Mococa que se isolou maior número de patógenos primários, com 65,07% (123/189) quando comparado aos rebanhos de Vargem G. do Sul com 22,1% (72/325) e Uberaba com 33,1% (132/238).

4.6 FATORES QUE AFETAM A CCS E COMPOSIÇÃO DO LEITE

4.6.1 Efeito do rebanho e do número de quartos mamários infectados sobre o logCCS e composição do leite em amostras compostas

Para o conjunto de dados composto pelas amostras com e sem isolamento microbiano (752 observações) a média geral do logCCS foi de 5,26 ± 0,68 (CCS de 181.970 células/mL).

O efeito do rebanho sobre o logCCS e constituintes do leite está apresentado na **tabela 22**:

Tabela 22 – Efeito do rebanho sobre a composição do leite e logCCS em amostras compostas, dos quatro quartos mamários, infectadas e não infectadas de vacas Gir

	Rebanhos						
Variáveis	**V. G. Sul (n=325)**	**EPM**	**Mococa (n=189)**	**EPM**	**Uberaba (n=238)**	**EPM**	**P**
LogCCS [1]	5,47	0,03	5,47	0,04	5,04	0,04	0,32
Lactose (%)	4,60	0,01	4,70	0,02	4,64	0,02	0,27
Proteína (%)	3,65 [A]	0,02	3,39 [B]	0,02	3,65 [A]	0,03	<0,0001
Gordura (%)	3,16 [A]	0,06	1,76 [B]	0,07	2,81 [A]	0,07	<0,0001
ESD [2] (%)	9,27 [A]	0,02	9,09 [B]	0,03	9,27 [A]	0,03	0,005

[1] logCCS (CCS x 10^3 céls/mL). [2] Extrato seco desengordurado

[A,B,C] médias ajustadas na mesma linha quando seguidas de letras distintas diferem entre si a P<0,05

O efeito do rebanho não foi significativo sobre o logCCS e sobre o teor de lactose do leite. No entanto, os maiores teores de proteína, gordura e ESD do leite foram encontrados nos rebanhos de Vargem G. do Sul (3,65%, 3,16% e 3,65%; respectivamente) e Uberaba (9,27% e 9,27%; respectivamente) do que no rebanho de Mococa com baixos valores de proteína (3,39%), gordura (1,76%) e ESD (9,09%).

A distribuição do logCCS e da composição do leite de acordo com o número de quartos mamários acometidos pela mastite está apresentada na **tabela 23**.

Tabela 23 – Efeito do número de quartos mamários acometidos pela mastite sobre o logCCS e composição do leite em amostras compostas, dos quatro quartos mamários, infectadas e não infectadas de vacas Gir

		Número de quartos mamários infectados										
Variáveis	**n**	**0**	**EPM**	**1**	**EPM**	**2**	**EPM**	**3**	**EPM**	**4**	**EPM**	**P**
LogCCS [1]	161	5,07 [D]	0,05	5,23 [C]	0,04	5,33 [BC]	0,05	5,42 [AB]	0,05	5,58 [A]	0,06	<0,0001
Lactose (%)	174	4,71	0,02	4,59	0,03	4,65	0,02	4,61	0,03	4,59	0,03	0,05
Proteína (%)	178	3,59	0,03	3,58	0,03	3,57	0,03	3,51	0,03	3,57	0,04	0,54
Gordura (%)	134	2,51	0,09	2,51	0,09	2,57	0,09	2,62	0,10	2,69	0,12	0,69
ESD [2] (%)	104	9,30 [A]	0,03	9,27 [AB]	0,04	9,21 [ABC]	0,03	9,12 [C]	0,04	9,16 [BC]	0,04	0,01

[1] LogCCS (CCS x 10^3 céls/mL). [2] Extrato seco desengordurado

[A,B,C] médias ajustadas na mesma linha quando seguidas de letras distintas diferem entre si a P<0,05

Houve efeito significativo do número de quartos mamários acometidos pela mastite somente sobre o logCCS e sobre o teor de ESD. O logCCS foi menor (5,07) quando nenhum quarto mamário foi infectado, mas o maior valor do logCCS (5,58) foi observado quando todos os quartos mamários apresentaram mastite. O maior teor de ESD (9,30%) foi obtido na ausência de quartos mamários infectados; mas o baixo valor (9,12%) foi encontrado quando três quartos mamários estavam infectados.

4.6.2 Efeito do mês de coleta e da presença de infecção intramamária sobre o logCCS e composição do leite em amostras compostas

Não foi verificado efeito da interação entre o mês de coleta e infecção intramamária sobre o logCCS e composição do leite. Portanto, os resultados do efeito da presença da infecção intramamária sobre os constituintes do leite estão expressos na **tabela 24**:

Tabela 24 - Efeito da presença da infecção intramamária sobre o logCCS e composição do leite em amostras compostas, dos quatro quartos mamários, infectadas e não infectadas de vacas Gir

	Infecção intramamária				
Variáveis	**Sim (n=592)**	**EPM**	**Não (n=160)**	**EPM**	**P**
LogCCS [1]	5,33 [A]	0,02	5,07 [B]	0,05	0,0003
Lactose (%)	4,64	0,01	4,10	0,02	0,12
Proteína (%)	3,55	0,01	3,60	0,03	0,28
Gordura (%)	2,56	0,05	2,46	0,09	0,41
ESD [2](%)	9,19 [B]	0,02	9,30 [A]	0,03	0,03

[1] logCCS (CCS x 10^3 céls/mL). [2] Extrato seco desengordurado

[A,B, C] médias ajustadas, na mesma linha, quando seguidas de letra distintas diferem entre si a P<0,05

A infecção intramamária apresentou efeito significativo apenas sobre o logCCS e o teor de ESD. Amostras infectadas apresentaram maior logCCS (5,33) do que amostras negativas (5,07). O contrário ocorreu com o teor de ESD, onde o alto

valor foi obtido em amostras sem isolamento microbiano (9,30%) e o baixo teor de ESD (9,19%) em amostras infectadas.

A distribuição do logCCS e dos constituintes do leite de acordo com o mês de coleta está apresentada na **tabela 25**.

Tabela 25 - Efeito do mês de coleta sobre o logCCS e composição do leite em amostras compostas, dos quatro quartos mamários, infectadas e não infectadas de vacas Gir

				Constituintes do leite (%)							
Mês	**n**	**LogCCS [1]**	**EPM**	**Lactose**	**EPM**	**Proteína**	**EPM**	**Gordura**	**EPM**	**ESD [2]**	**EPM**
Janeiro	56	5,16 [AB]	0,08	4,74 [ABD]	0,04	3,33 [C]	0,04	2,37 [BCD]	0,15	9,06 [BC]	0,05
Fevereiro	101	4,95 [B]	0,06	4,74 [BCD]	0,02	3,53 [CD]	0,03	2,00 [D]	0,11	9,24 [AB]	0,04
Março	93	5,13 [AB]	0,06	4,62 [C]	0,03	3,58 [CD]	0,03	2,24 [CD]	0,11	9,21 [B]	0,04
Abril	60	5,57 [A]	0,08	4,46 [DE]	0,03	3,77 [AB]	0,04	3,04 [AB]	0,18	9,23 [B]	0,05
Maio	87	5,32 [AB]	0,06	4,88 [DE]	0,03	3,81 [AB]	0,04	3,01 [AB]	0,13	9,26 [AB]	0,04
Junho	68	5,35 [A]	0,07	4,46 [E]	0,07	3,85 [A]	0,07	3,25 [A]	0,17	9,32 [AB]	0,07
Julho	35	5,16 [AB]	0,11	4,72 [BC]	0,07	3,51 [CD]	0,07	1,97 [D]	0,13	9,30 [AB]	0,07
Agosto	34	4,91 [B]	0,11	4,95 [A]	0,03	3,46 [CD]	0,06	2,14 [D]	0,15	9,41 [AB]	0,06
Setembro	18	5,25 [AB]	0,12	4,77 [AC]	0,06	3,66 [AC]	0,07	2,70 [BD]	0,23	9,44 [AB]	0,08
Outubro	29	5,12 [AB]	0,12	4,81 [AB]	0,03	3,66 [BC]	0,07	2,25 [CD]	0,12	9,48 [A]	0,07
Novembro	113	5,10 [B]	0,06	4,69 [BC]	0,03	3,45 [CD]	0,02	2,64 [BC]	0,10	9,10 [BC]	0,05
Dezembro	58	5,40 [A]	0,08	4,62 [CD]	0,04	3,28 [D]	0,05	2,49 [CD]	0,14	8,90 [C]	0,06
Probabilidade		<0,0001		<0,0001		<0,0001		<0,0001		<0,0001	

[1] logCC (CCS x 10^3 céls/mL). [2] Extrato seco desengordurado

[A,B, C] médias ajustadas, na mesma coluna, quando seguidas de letras distintas diferem entre si a P<0,05

Houve efeito altamente significativo (P <0,0001) do mês de coleta sobre a composição do leite e o logCCS. Os maiores resultados do logCCS foram encontrados nos meses abril (5,57), junho (5,35) e dezembro (5,40) e ao valores mais baixos em fevereiro (4,95), agosto (4,91) e novembro (5,10). Alto teor de lactose do leite foi obtido em agosto (4,95%) e o menor em junho (4,46%). No entanto, foi em Junho que se observou o alto teor de proteína do leite (3,85%), mas foi em dezembro, que se obteve a menor porcentagem de proteína do leite (3,28%). Elevada concentração de gordura do leite foi encontrada no mês junho (3,25%) e os baixos teores em fevereiro (2,00%), julho (1,97%) e agosto (2,14%). Foi em outubro que se observou o maior valor de ESD (9,48%). Porém, em dezembro se encontrou baixo teor de ESD (8,90%).

4.6.3 Efeito do tipo de microrganismo isolado sobre o logCCS e composição do leite em amostras compostas

O efeito da interação entre o tipo de microrganismo isolado e mês de coleta foi significativo apenas sobre o teor de lactose do leite. Desta forma, os resultados do efeito do tipo de microrganismo isolado sobre o logCCS e os teores de proteína, gordura e ESD do leite em amostras compostas, estão descritos na **tabela 26**.

Tabela 26 - Efeito do tipo de microrganismo isolado sobre o logCCS e composição do leite em amostras compostas, dos quatro quartos mamários, infectadas e não infectadas de vacas Gir

	Isolamento												
Variáveis	***S. aureus* (n=225)**	**EPM**	**SCN [1] (n=175)**	**EPM**	**Coryne [2] (n=142)**	**EPM**	**S. dysg [3] (n=15)**	**EPM**	***S. uberis* (n=28)**	**EPM**	**negativo (n=161)**	**EPM**	**P**
LogCCS [4]	5,46 [A]	0,04	5,18 [AB]	0,05	5,27 [AB]	0,05	547 [A]	0,16	5,49 [A]	0,08	5,03 [B]	0,05	<0,0001
Proteína (%)	2,42	0,02	2,58	0,02	2,66	0,04	2,26	0,08	2,57	0,08	2,63	0,03	0,11
Gordura (%)	2,47	0,07	2,89	0,08	2,87	0,10	2,90	0,33	2,91	0,24	2,73	0,09	0,97
ESD [5](%)	9,03	0,03	9,20	0,03	9,18	0,04	8,98	0,10	9,06	0,13	9,34	0,03	0,11

[1] *Staphylococcus sp.* coagulase negativa. [2] *Corynebacteirum sp.* [3] *Streptococcus dysgalactiae.* [4] logCCS (CCS x 10^3 céls/mL). [5] extrato seco desengordurado
[A,B, C] médias na mesma linha seguidas de letras distintas diferem entre si a P<0,05 pelo teste de Duncan

Verificou efeito do tipo de microrganismo isolado, exclusivamente, sobre o logCCS. Os maiores valores do logCCS foram obtidos em casos de mastite causada por *Staphylococcus aureus* (5,46), *Streptococcus dysgalactiae* (5,47) e *Streptococcus uberis* (5,49) e o menor logCCS foi encontrado em amostras negativas (5,03). No entanto, o logCCS de amostras infectadas por *Staphylococcus sp*. coagulase negativa (5,18) e *Corynebacterium sp.* (5,27) não diferiram dos demais microrganismos e das amostras negativas.

Somente sobre o teor de lactose do leite houve efeito da interação do mês de coleta com o tipo de microrganismo isolado (**Tabela 27**).

Tabela 27 - Efeito do tipo de microrganismo isolado e do mês de coleta sobre o teor de lactose do leite em amostras compostas, dos quatro quartos mamários, infectadas e não infectadas de vacas Gir

		Isolamento																
Mês	**n**	***S. aureus***	**EPM**	**n**	**SCN [1]**	**EPM**	**n**	**Coryne [2]**	**EPM**	**n**	**S. dysg [3]**	**EPM**	**n**	***S. uberis***	**EPM**	**n**	**negativo**	**EPM**
Janeiro	23	4,64 ^{bc}	0,08	12	4,66 ^{bc}	0,09	7	4,64 ^{ab}	0,07	4	4,64	0,13	7	4,56 ^{abc}	0,07	3	4,90 ^{abc}	0,15
Fevereiro	34	4,72 ^{ab}	0,05	32	4,67 ^{bc}	0,06	20	4,72 ^{ab}	0,05	4	4,77	0,12	2	4,88 ^{abc}	0,25	8	4,78 ^{ab}	0,08
Março	30	4,63 ^{bc}	0,05	27	4,50 ^{cd}	0,07	21	4,59 ^{b}	0,06	3	4,61	0,15	1	4,12 ^{c}	.	8	4,71 ^{abc}	0,03
Abril	9	4,42 ^{c}	0,04	25	4,42 ^{d}	0,04	10	4,45 ^{b}	0,07	.	.	.	.	.	.	16	4,47 ^{c}	0,06
Maio	23	4,49 ^{bc}	0,06	19	4,47 ^{cd}	0,06	26	4,54 ^{b}	0,05	.	.	.	4	4,46 ^{abc}	0,12	14	4,46 ^{c}	0,10
Junho	22	4,56 ^{Abc}	0,05	6	4,42 ^{Acd}	0,15	18	3,84 ^{Bc}	0,20	1	4,58 ^{A}	.	3	4,48 ^{Aabc}	0,22	18	4,62 ^{Abc}	0,04
Julho	2	4,65 ^{Aabc}	0,23	3	4,99 ^{Aa}	0,06	2	4,28 ^{Bb}	0,91	1	5,23 ^{A}	.	.	.	.	27	4,67 ^{ABbc}	0,06
Agosto	7	4,78 ^{ab}	0,07	6	5,08 ^{a}	0,04	2	5,09 ^{a}	0,14	.	.	.	1	5,22 ^{a}	.	18	4,93 ^{a}	0,05
Setembro	6	4,65 ^{abc}	0,08	2	4,79 ^{abd}	0,05	3	5,08 ^{a}	0,08	.	.	.	1	4,46 ^{abc}	.	6	4,85 ^{ab}	0,10
Outubro	6	4,97 ^{a}	0,09	6	4,75 ^{abc}	0,07	4	4,55 ^{ab}	0,36	.	.	.	1	4,77 ^{abc}	.	12	4,83 ^{ab}	0,09
Novembro	43	4,64 ^{ABbc}	0,05	22	4,79 ^{Aab}	0,06	18	4,72 ^{Aab}	0,08	1	4,70 ^{AB}	.	7	4,38 ^{Bbc}	0,20	21	4,70 ^{Ab}	0,09
Dezembro	20	4,60 ^{bc}	0,07	15	4,67 ^{bc}	0,12	11	4,67 ^{ab}	0,05	1	4,90	.	1	4,78 ^{abc}	.	10	4,63 ^{c}	0,10

[1] *Staphylococcus sp.* coagulase negativa. [2] *Corynebacterium sp.* [3] *Streptococcus dysgalactiae*.

[A, B] Médias ajustadas, na mesma linha, seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si em P<0,05

[a,b] Médias ajustadas, na mesma coluna, seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si em P<0,05

O efeito do tipo de microrganismo isolado sobre a lactose do leite foi significativo, apenas, nos meses junho, julho e novembro. Para amostras coletadas em junho o menor teor de lactose (3,84%) foi obtido ao isolar *Corynebacterium sp*. quando comparadas aos demais microrganismos e amostras negativas. Da mesma forma, em julho, o microrganismo responsável pela menor concentração de lactose (4,28%) foi obtida em amostras com isolamento de *Corynebacterium sp*., enquanto que, nas amostras com crescimento das demais bactérias, o teor de lactose foi maior. No entanto, a porcentagem de lactose (4,67%) das amostras negativas não diferiu de nenhum microrganismo. Em novembro a menor concentração de lactose foi observada nas amostras com *Streptococcus uberis* (4,38%) e os maiores valores ao isolar *Staphylococcus sp*. coagulase negativa (4,79%), *Corynebacterium sp*. (4,72%) e amostras negativas (4,70%).

Houve efeito do mês de coleta sobre o teor de lactose do leite, exceto para as amostras com isolamento de *Streptococcus dysgalactiae*. Todavia, para as amostras com isolamento de *Staphylococcus aureus*, foi em outubro que se obteve a maior concentração (4,97%) e, em abril, o menor valor (4,42%). Considerando as amostras com crescimento de *Staphylococcus sp*. coagulase negativa foi em agosto e julho que se observou as maiores porcentagens de lactose (5,08% e 4,99%; respectivamente) também, em abril foi obtido o menor teor (4,42%). agosto e setembro foram os meses que se encontraram os maiores teores de lactose (5,08% e 5,09%; respectivamente), para as amostras com isolamento de *Corynebacterium sp*., mas foi em julho que se notou o menor valor de lactose do leite (3,84%). Referente ao grupo de amostras com crescimento de *Streptococcus uberis* o mês de maior teor de lactose foi agosto (5,22%) e o de menor foi em março (4,12%). Maior teor de lactose, para as amostras negativas, foi observado no mês de agosto (4,93%), mas as baixas concentrações deste constituinte, em amostras sem isolamento microbiano, foram encontradas nos meses abril (4,47%), maio (4,46%) e dezembro (4,63%).

4.6.4 Efeito do isolamento de patógenos (primários e secundários) sobre o logCCS e composição do leite em amostras compostas

O efeito da interação entre o isolamento de patógenos causadores da mastite com o mês de coleta foi significativo somente sobre os teores de lactose e proteína do leite. Por isso, os resultados do efeito do isolamento de patógenos (primários e secundários) sobre os teores de gordura, ESD e logCCS estão expressos na **tabela 28**:

Tabela 28 - Efeito do isolamento de patógenos (primários e secundários) sobre o logCCS e sobre os teores de gordura e extrato seco desengordurado em amostras compostas, dos quatro quartos mamários, infectadas e não infectadas de vacas Gir

	Isolamento						
	Primários [1]		**Secundários [2]**		**Negativo**		
Variáveis	**(n=274)**	**EPM**	**(n=317)**	**EPM**	**(n=161)**	**EPM**	**P**
LogCCS [3]	5,48 [A]	0,03	5,22 [B]	0,03	5,07 [B]	0,05	<0,0001
Gordura (%)	2,57	0,07	2,55	0,06	2,46	0,09	0,70
ESD [4](%)	9,17	0,02	9,23	0,02	9,30	0,03	0,09

[1] Patógenos primários: *Staphylococcus aureus, Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*

[2] Patógenos secundários: *Staphylococcus sp*. coagulase negativa e *Corynebacterium sp.*

[3] logCCS (CCS x 10^3 céls/mL) [4] Extrato seco desengordurado

[A,B, C] médias ajustadas, na mesma linha, quando seguidas de letras distintas diferem entre si a P<0,05

O efeito do isolamento de patógenos (primários e secundários) foi significativo apenas sobre o logCCS. O maior logCCS (5,48) foi encontrado para as amostras com isolamento de patógenos primários. No entanto, o logCCS de amostras infectadas por patógenos secundários (5,22) não diferiu do logCCS de amostras sem isolamento microbiano (5,07).

A interação entre o isolamento de patógenos (primários e secundários) e o mês de coleta sobre os teores de lactose e proteína do leite de amostras compostas está apresentada nas **tabelas 29** e **30**.

Tabela 29 - Efeito do isolamento de patógenos (primários e secundários) e do mês de coleta sobre o teor de lactose do leite em amostras compostas, dos quatro quartos mamários, infectadas e não infectadas de vacas Gir

		Isolamento							
Mês	**n**	**Primários [1]**	**EPM**	**n**	**Secundários [2]**	**EPM**	**n**	**Negativo**	**EPM**
Janeiro	34	4,62 [b]	0,05	19	4,65 [bc]	0,06	3	4,90 [ab]	0,15
Fevereiro	41	4,74 [a]	0,04	52	4,69 [b]	0,04	8	4,78 [a]	0,08
Março	37	4,62 [b]	0,04	48	4,54 [cd]	0,04	8	4,71 [ab]	0,03
Abril	9	4,42 [b]	0,04	35	4,43 [d]	0,04	16	4,47 [b]	0,06
Maio	28	4,47 [b]	0,05	45	4,51 [cd]	0,04	14	4,46 [b]	0,10
Junho	26	4,55 [Ab]	0,05	24	3,98 [Be]	0,16	18	4,62 [Ab]	0,04
Julho	3	4,84 [ab]	0,23	5	4,70 [abc]	0,33	27	4,67 [b]	0,06
Agosto	8	4,84 [ab]	0,08	8	5,09 [a]	0,04	18	4,93 [a]	0,05
Setembro	7	4,62 [ab]	0,09	5	4,97 [ab]	0,08	6	4,85 [a]	0,10
Outubro	7	4,94 [a]	0,08	10	4,67 [b]	0,14	12	4,83 [a]	0,09
Novembro	52	4,62 [Bb]	0,05	40	4,77 [Ab]	0,05	21	4,70 [AB]	0,09
Dezembro	22	4,62 [b]	0,07	26	4,67 [b]	0,07	10	4,63 [b]	0,10

[1] Patógenos primários: *Staphylococcus aureus, Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*

[2] Patógenos secundários: *Staphylococcus sp*. Coagulase negativa e *Corynebacterium sp.*

[A, B] Médias ajustadas, na mesma linha, seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si em P<0,05

[a,b] Médias ajustadas, na mesma coluna, seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si em P<0,05

Tabela 30 - Efeito do isolamento de patógenos (primários e secundários) e do mês de coleta sobre o teor de proteína do leite em amostras compostas, dos quatro quartos mamários, infectadas e não infectadas de vacas Gir

		Isolamento							
Mês	**n**	**Primários [1]**	**EPM**	**n**	**Secundários [2]**	**EPM**	**n**	**Negativo**	**EPM**
Janeiro	34	3,27 ^{cd}	0,06	19	3,31 ^{c}	0,07	3	3,22 ^{bc}	0,22
Fevereiro	41	3,25 ^{Bcd}	0,04	52	3,48 ^{Ac}	0,04	8	3,66 ^{Aab}	0,09
Março	37	3,47 ^{b}	0,04	48	3,60 ^{c}	0,05	8	3,57 ^{abc}	0,07
Abril	9	3,82 ^{a}	0,08	35	3,81 ^{b}	0,07	16	3,77 ^{a}	0,05
Maio	28	3,81 ^{a}	0,07	45	3,81 ^{b}	0,05	14	3,76 ^{a}	0,10
Junho	26	3,58 ^{Bab}	0,11	24	4,23 ^{Aa}	0,13	18	3,79 ^{Ba}	0,12
Julho	3	3,47 ^{abd}	0,24	5	3,52 ^{bc}	0,23	27	3,69 ^{a}	0,09
Agosto	8	3,47 ^{ab}	0,15	8	3,41 ^{c}	0,10	18	3,63 ^{ab}	0,09
Setembro	7	3,66 ^{ab}	0,13	5	3,53 ^{b}	0,08	6	3,43 ^{bc}	0,12
Outubro	7	3,59 ^{ab}	0,07	10	3,68 ^{b}	0,11	12	3,83 ^{a}	0,14
Novembro	52	3,36 ^{bc}	0,04	40	3,43 ^{c}	0,05	21	3,43 ^{bc}	0,06
Dezembro	22	3,13 ^{d}	0,06	26	3,34 ^{c}	0,08	10	3,29 ^{c}	0,15

[1] Patógenos primários: *Staphylococcus aureus, Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*

[2] Patógenos secundários: *Staphylococcus sp*. Coagulase negativa e *Corynebacterium sp.*

[A, B] Médias ajustadas, na mesma linha, seguidas de letras maiúsculas distintas diferem entre si em P<0,05

[a,b] Médias ajustadas, na mesma coluna, seguidas de letras minúsculas distintas diferem entre si em P<0,05

Houve efeito do isolamento de patógenos (primários e secundários) sobre o teor de lactose nos meses junho e novembro. Amostras negativas e com isolamento de patógenos primários apresentaram no mês de junho a maior porcentagem de lactose (4,55% e 4,62%; respectivamente) do que amostras com crescimento de patógenos secundários (3,98%). No entanto, no mês de novembro, o maior teor de lactose foi obtido ao isolar patógenos secundários (4,77%) quando comparados aos valores de lactose de amostras com isolamento de patógenos primários (4,62%). Neste caso, também, as concentrações de lactose das amostras negativas não diferiram das amostras com isolamento de patógenos tanto primários quanto secundários.

Verificou-se efeito do mês de coleta sobre o teor de lactose para todos os patógenos isolados. Considerando amostras com crescimento de patógenos primários os meses fevereiro e outubro apresentaram as maiores médias de lactose do leite (4,74% e 4,94%; respectivamente), mas os baixos valores foram obtidos em janeiro (4,62%), março (4,62%), abril (4,42%), maio (4,47%), junho (4,55%), novembro (4,62%) e dezembro (4,62%). Nos meses agosto e junho, para as amostras com isolamento de patógenos secundários, foram obtidos, respectivamente, o maior (5,09%) e menor (3,98%) teor de lactose do leite. Nas amostras negativas, as maiores concentrações de lactose foram obtidas nos meses fevereiro (4,78%), agosto (4,93%), setembro (4,85%) e outubro (4,83%), e, as menores porcentagens nos meses abril (4,47%), maio (4,46%), junho (4,62%) julho (4,67%) e dezembro (4,63%).

Somente nos meses fevereiro e junho houve efeito do isolamento dos patógenos (primários e secundários) sobre o teor de proteína do leite. Comparando os valores de proteína de amostras negativas com as amostras com crescimento microbiano, no mês de fevereiro foi observado que as amostras com isolamento de patógenos primários apresentaram menor teor de proteína do leite (3,25%) do que amostras com patógenos secundários (3,48%) e sem isolamento microbiano (3,66%). Em junho, o maior teor de proteína do leite foi obtido nas amostras com isolamento de patógenos secundários (4,23%), e, os menores valores ao isolar patógenos primário (3,58%) e em amostras negativas (3,79%).

Houve efeito do mês de coleta sobre o teor de proteína do leite conforme o isolamento de patógenos. Amostras com crescimento de patógenos primários, os

meses que apresentaram maiores médias foram abril (3,82%) e maio (3,81%) e o mês com menor valor foi dezembro (3,13%). Referente às amostras com isolamento de patógenos secundários, o maior teor de proteína foi encontrado no mês junho (4,23%) e os menores valores em janeiro, fevereiro, março, agosto, novembro e dezembro. Nas amostras negativas, as altas concentrações de proteína do leite foram obtidas nos meses abril (3,77%), maio (3,76%), junho (3,79%), julho (3,69%) e outubro (3,83%). Porém foi em dezembro que se obteve a menor porcentagem de proteína do leite (3,29%).

4.6.5 Efeito do rebanho e do mês de coleta sobre o logCCS e sobre a composição do leite em amostras compostas sem isolamento microbiano

Para o conjunto de dados de amostras compostas dos quatro quartos mamários sem isolamento microbiano (160 observações) a média geral do logCCS foi de 5,04 ± 0,68 (CCS de 109.647 células/mL).

A distribuição do logCCS e da composição do leite para cada rebanho está apresentada na **tabela 31**:

Tabela 31 – Efeito do rebanho sobre a composição do leite e logCCS de amostras compostas, dos quatro quartos mamários, sem isolamento microbiano de vacas Gir

	Rebanhos						
Variáveis	**V. G. Sul (n=107)**	**EPM**	**Mococa (n=26)**	**EPM**	**Uberaba (n=27)**	**EPM**	**P**
LogCCS [1]	4,92	0,03	5,35	0,05	4,77	0,06	0,55
Lactose (%)	4,63	0,06	4,71	0,12	4,65	0,12	0,16
Proteína (%)	3,65 [A]	0,04	3,51 [A]	0,06	3,30 [B]	0,07	0,03
Gordura (%)	3,21 [A]	0,10	1,53 [B]	0,18	2,92 [A]	025	0,01
ESD [2] (%)	9,27	0,04	9,23	0,09	8,92	0,11	0,13

[1] logCCS (CCS x 10^3 céls/mL). [2] Extrato seco desengordurado

[A,B,C] médias ajustadas na mesma linha quando seguidas de letras distintas diferem entre si a P<0,05

Houve efeito do rebanho sobre o teor de proteína e gordura do leite. Os maiores teores de proteína do leite foram encontrados nos rebanho de Vargem G. do Sul (3,65%) e Mococa (3,51%), e a menor porcentagem, por sua vez, foi obtida no rebanho de Uberaba (3,30%). Para os teores de gordura do leite, as altas concentrações foram observadas nos rebanhos de Vargem G. do Sul (3,21%) e Uberaba (2,92%) e o baixo teor em Mococa (1,53%).

O efeito do mês de coleta sobre os constituintes do leite em amostras compostas sem isolamento microbiano está apresentado na **tabela 32.**

Tabela 32 - Efeito do mês de coleta sobre o logCCS e composição do leite em amostras compostas, dos quatro quartos mamários, sem isolamento microbiano de vacas Gir

				Constituintes do leite (%)							
Mês	**n**	**LogCCS [1]**	**EPM**	**Lactose**	**EPM**	**Proteína**	**EPM**	**Gordura**	**EPM**	**ESD [2]**	**EPM**
Janeiro	3	4,63 [B]	0,21	4,86 [AB]	0,15	2,77 [D]	0,22	2,51 [AB]	0,40	8,54	0,39
Fevereiro	8	4,72 [B]	0,25	4,49 [C]	0,08	3,68 [B]	0,09	2,23 [B]	0,30	9,09	0,10
Março	8	4,79 [B]	0,12	4,35 [CD]	0,03	3,76 [B]	0,07	2,24 [B]	0,20	9,13	0,08
Abril	16	5,59 [A]	0,17	4,30 [D]	0,06	3,86 [B]	0,05	3,70 [A]	0,40	9,19	0,07
Maio	14	5,14 [A]	0,19	4,11 [E]	0,10	4,07 [AB]	0,10	3,55 [A]	0,36	9,15	0,10
Junho	18	5,15 [A]	0,12	4,35 [CD]	0,04	4,15 [A]	0,09	2,93 [A]	0,26	9,52	0,14
Julho	26	5,37 [AB]	0,12	4,93 [AB]	0,06	3,34 [C]	0,12	1,32 [B]	0,15	9,36	0,09
Agosto	18	4,83 [B]	0,14	5,00 [A]	0,05	3,25 [C]	0,09	1,79 [B]	0,21	9,25	0,06
Setembro	6	4,97 [AB]	0,25	5,05 [A]	0,10	3,14 [ACD]	0,12	3,51 [A]	0,53	9,16	0,17
Outubro	12	5,02 [B]	0,19	4,91 [AB]	0,09	3,41 [C]	0,14	1,89 [B]	0,18	9,33	0,11
Novembro	21	4,80 [B]	0,14	4,84 [AB]	0,09	3,35 [C]	0,06	2,68 [AB]	0,28	9,16	0,14
Dezembro	10	5,16 [AB]	0,27	4,77 [B]	0,10	3,04 [D]	0,15	2,30 [B]	0,48	8,79	0,15
Probabilidade		0,008		0,003		0,03		0,02		0,07	

[1] logCCS (CCS x 10^3 céls/mL) [2] Extrato seco desengordurado

[A,B, C] médias ajustadas, na mesma coluna, quando seguidas de letras distintas diferem entre si a P<0,05

Identificou efeito do mês de coleta sobre o logCCS e a composição do leite, exceto para o teor de ESD; para as amostras sem isolamento microbiano. Os maiores logCCS foram encontrados nos meses abril (5,59), maio (5,14) e junho (5,15) e os menores valores de CCS em janeiro (4,63), fevereiro (4,72), março (4,79), agosto (4,83), outubro (5,02) e novembro (4,80). Foram nos meses agosto e setembro que se verificou os maiores teores de lactose (5,00% e 50,5%; respectivamente). No entanto, foi no mês de maio que se obteve o menor valor de lactose (4,11%). Alta concentração de proteína do leite foi encontrada no mês de junho (4,15%) e foram nos meses janeiro e dezembro que se observaram as menores porcentagens de proteína do leite (2,77% e 3,04%; respectivamente). Os maiores teores de gordura do leite foram encontradas nos meses abril (3,70%), maio (3,55%), junho (2,93%) e setembro (3,51%) e os menores valores foram obtidas nos meses fevereiro, março, julho, agosto, outubro e dezembro.

4.7 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA CCS DE AMOSTRAS COMPOSTAS

A sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo e negativo para identificação de amostras infectadas tanto por patógenos primários e secundários estão apresentados na **tabela 33**:

Tabela 33 – Sensibilidade, especificidade, valor preditivo (positivo e negativo) dos quatro limiares da CCS em amostras compostas, dos quatro quartos mamários, para identificação de amostras positivas tanto para patógenos primários quanto secundários; em vacas Gir

CCS (x 10^3 cél/mL)	Sensibilidade	Especificidade	VP + [1]	VP - [2]
100	71,2	46,2	83,07	30,32
200	52,3	69,3	86,35	28,2
300	41,7	76,2	86,6	26,1
400	33,6	80,0	86,1	24,5

[1] VP+:valor preditivo positivo
[2] VP-: valor preditivo negativo

Os valores de sensibilidade, para as amostras compostas, foram maiores para os três primeiros limiares quando comparados com as sensibilidades de amostras em nível de quarto mamário. Foi observado, também, que os valores preditivos positivos foram mais elevados quando se considerou amostras compostas.

O limiar de 100 x 10^3 células/mL apresentou o menor valor de especificidade (46,2%), mas manteve o maior valor de sensibilidade (71,2%) e valor preditivo negativo (30,32%).

Da mesma forma que em nível de quarto mamário, para as amostras compostas, considerar o limiar de CCS < 100 x 10^3 células/mL, pelo seu alto valor preditivo negativo, diminuem os resultados falso-negativos.

A alta prevalência da mastite (78,7%), em amostras compostas, aumentou o valor preditivo positivo.

A seguir, na **tabela 34**, estão apresentados os valores de sensibilidade e especificidade para os limiares da CCS para os três critérios de diagnóstico da mastite.

Tabela 34 - Sensibilidade e especificidade dos quatro limiares da CCS para identificação de patógenos primários e secundários, considerando os três critérios de diagnóstico para mastite em amostras compostas, dos quatro quartos mamários, de vacas Gir

Limiares (CCS x 10^3)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
IIM[1]=patógenos primários S/IIM[2]= patógenos secundários e sem isolamento		
100	81,02	40,1
200	62,3	60,2
300	49,6	68,8
400	39,7	74,4
IIM=patógenos primários e patógenos secundários S/IIM= sem isolamento		
100	71,2	46,2
200	52,3	69,3
300	41,7	76,2
400	81,1	80,0
IIM=patógenos primários S/IIM= sem isolamento		
100	81,02	46,5
200	61,3	69,5
300	49,6	76,3
400	39,7	80,1

[1] amostras compostas com isolamento microbiano. [2] amostras compostas sem isolamento microbiano

Foi observado que ao se excluir do critério de diagnóstico positivo para a mastite as amostras com isolamento de patógenos secundários a sensibilidade dos limiares da CCS aumentaram. Para o limiar de 100 x 10^3 células/mL a sensibilidade foi de 71,2%, considerando as amostras compostas infectadas tanto por patógenos primários quanto por patógenos secundários; porém, para este mesmo limiar a sensibilidade passou para 81,2% quando, somente, as amostras compostas infectadas por patógenos primários foram incluídas na análise. Também, verificou que ao considerar as amostras com isolamento de patógenos secundários como critério negativo para infecção intramamária os valores de especificidade diminuíram, para todos os limiares. Tendo como exemplo o limiar de 100 x 10^3 células/mL, a especificidade passou de 46,5% para 40,1%.

A chance da ocorrência de mastite para cada um dos limiares da CCS está expressa na **tabela 35**:

Tabela 35 - Chances de ocorrência da mastite para os quatro limiares da CCS em amostras compostas de vacas Gir

	Limiares da CCS (x10^3 céls/mL)			
Ocorrência da mastite	**<100**	**<200**	**<300**	**<400**
Sim	170	282	345	393
Não	74	111	122	128
Odds	2,29	2,54	2,82	3,07
Odds Ratio	**1***	**1,10**	**1,23**	**1,34**

* odds ratio para a categoria referente é marcado como 1 (dividido por ele mesmo) e indica que as chances aumentadas nas outras categorias se referem ao contraste em esta categoria

Amostras compostas com limiar de CCS <200 x 10^3 células/mL apresentaram maior chance de ocorrer mastite (1,10 vezes mais) do que amostras compostas com limiar de CCS <100 x 10^3 células/mL. Conforme aumentou o limiar para CCS <400 x 10^3 células/ml as chances de ocorrer a mastite elevaram-se ainda mais (1,34 vezes mais) comparado ao limiar de CCS <100 x 10^3 células/mL.

4.8 CORRELAÇÃO ENTRE A CCS E COMPOSIÇÃO DO LEITE DE AMOSTRAS COMPOSTAS

As médias dos teores de proteína total e gordura do leite, quando determinados pelas amostras compostas infectadas e não infectadas, foram de 3,55% ± 0,44 e 2,73% ± 1,22; respectivamente. Os valores médios do conteúdo de lactose e ESD do leite foram de 4,62% ±0,38 e 9,17% ±0,50.

Foi identificada correlação positiva entre logCCS com proteína (r= 0,12) e logCCS com gordura (r= 0,18), indicando que conforme aumentou o logCCS, também, houve elevação dos teores de proteína e gordura do leite. Porém, ocorreu uma correlação negativa entre o logCCS com lactose (r= -0,53) e logCCS com ESD (r= -0,29). Neste caso, quando aumentou o logCCS os teores de lactose e ESD diminuíram.

5 DISCUSSÃO

5.1 PREVALÊNCIA DA MASTITE SUBCLÍNICA EM QUARTOS MAMÁRIOS

Como as raças zebuínas são amplamente usadas em países da América Latina, África e Ásia; e, no Brasil, são escassas as pesquisas desenvolvidas com estes animais; a título de exemplificação, as prevalências de infecção intramamária em raças zebuínas locais da Nigéria e Etiópia foram de 56,0% e 18,7% (KERRO DEGO; TAREKE, 2003; OGOLA et al., 2007).

Kerro Dego e Tareke (2003) ao compararem, também, a ocorrência da mastite entre as raças Holandesa, Jersey e zebuínas; observaram que as vacas Holandesas, devido a sua característica de alta produção, apresentaram maior prevalência da infecção intramamária (58,3%) do que as vacas zebuínas (30,9%), porém, não observaram diferença das vacas Jersey com as Holandesas e zebuínas. Achados semelhantes foram encontrados por Almaw et al. (2008) que observaram maior prevalência de mastite subclínica (17,9%) em vacas mestiças (Holandesa x Zebuínas) do que nas vacas puras zebuínas (4,9%).

Como visto anteriormente, na presente pesquisa, os microrganismos mais isolados foram *Corynebacterium sp*. (35,5%); *Staphylococcus aureus* (30,75%); *Staphylococcus sp*. coagulase negativa (28,70%); *Streptococcus uberis* (3,75%) e *Streptococcus dysgalactiae* (1,27%). Resultados semelhantes foram encontrados por Souto et al. (2008), porém em vacas Holandesas, onde o *Corynebacterium sp*. foi o agente mais isolado (11,24%), seguido pelo grupo *Staphylococcus sp*. (9,2%) e *Streptococcus sp*. (5,34%).

Entretanto, diferentemente, Malinowski et al. (2006) encontraram maior número de *Streptococcus sp.* (15,7%), seguido pelo *Staphylococcus sp*. coagulase negativa (14,6%), *Staphylococcus aureus* (8,6%) e *Corynebacterium sp*. (3,8%); enquanto que, Piepers et al. (2007) encontraram maior prevalência de *Staphylococcus sp.* coagulase negativa (57,2%), seguido pelo *Staphylococcus aureus* (18,4%), *Streptococcus uberis* (15,9%) e *Corynebacterium sp*. (0,8%).

Sargeant et al. (2001) encontraram, em vacas Holandesas, uma prevalência de 36% de mastite, sendo que o agente mais isolado foi *Staphylococcus sp*. coagulase negativa (49,7%).

A falta de práticas de controle da mastite como o “pós-*dipping*”, nos rebanhos estudados, pode ter favorecido o alto índice de infecção intramamária causada por *Corynebacterium sp.,* uma vez que, nas vacas Gir, esta prática geralmente não é aplicada, pois os bezerros permanecem com as vacas após a ordenha para a mamada do leite residual (SANTOS; FONSECA, 2007).

Assim como no presente estudo, Schepers et al. (1997) encontraram, em vacas Holandesas, a maior prevalência de patógenos secundários (*Corynebacterium sp.* e *Staphylococcus sp*. coagulase negativa) do que de patógenos primários (*Streptococcus uberis, Streptococcus dysgalactiae* e *Staphylococcus aureus*). Dohoo e Leslie (1991) também isolaram grande número de patógenos secundários, principalmente, o *Staphylococcus sp*. coagulase negativa. Na pesquisa desenvolvida por Olde Riekerink et al. (2007) 7,1% dos patógenos isolados, de quartos mamários, eram primários (dentre eles *Staphylococcus aureus, Streptococcus uberis, Streptococcus dysgalactiae* e *Escherichia coli)* e 12% dos quartos mamários foram infectados por patógenos secundários (*Corynebacterium sp.* e *Staphylococcus sp*. coagulase negativa).

A alta prevalência de patógenos secundários pode ser explicada, pois, são considerados microrganismos contagiosos, sendo de fácil transmissão (principalmente no momento da ordenha) e disseminação no rebanho.

Segundo Almaw et al. (2008) as práticas de manejo podem interferir nos resultados de prevalência da infecção intramamária, pois a mastite é uma doença complexa, resultante de múltiplos fatores predisponentes, tais como: gerenciamento, condições ambientais, microrganismo envolvido e resposta do animal.

5.2 FATORES QUE AFETAM A CCS E COMPOSIÇÃO DO LEITE DE QUARTOS MAMÁRIOS

A média geral do logCCS encontrada neste estudo para o conjunto de dados de amostras com e sem isolamento foi de logCCS= 5,08; enquanto que, para Ogola et al. (2007), em vacas zebuínas, foi de logCCS= 4,73. Já, no estudo de Schepers et al. (1997), com vacas holandesas, o logCCS foi de apenas 1,45.

Diferentemente deste trabalho, onde não foi observado efeito do rebanho sobre o logCCS (P= 0,17); Schepers et al. (1997) encontraram efeito significativo do rebanho sobre a CCS, no entanto, o rebanho explicou pequena porção da variação da CCS. Todavia, um resultado semelhante foi observado tanto no presente estudo quando no de Schepers et al. (1997): o efeito de vaca dentro de rebanho foi altamente significativo, explicando grande parte da variação da CCS. Nesta pesquisa, o efeito individual de vaca apresentou a segundo maior valor da soma dos quadrados (SQ=21,21). Isto pode justificar que as diferenças de manejo, entre os rebanhos estudados não interferiram na variação da CCS, uma vez que, neste estudo não houve efeito do rebanho sobre o logCCS. Pode se constatar que a variabilidade individual, dentro de cada rebanho, apresenta grande importância na variação da CCS.

Neste estudo, os fatores como: o manejo nutricional e sanitário, idade e estagio de lactação das vacas não foram controlados, o que impede uma justificativa mais precisa sobre o efeito altamente significativo (P<0,0001) do rebanho sobre os teores de proteína, gordura e ESD, uma vez que, a composição do leite sofre influência destes fatores.

Estimativas realizadas por Schepers et al. (1997) mostraram que a média de CCS de quartos mamários posteriores foram maiores do que quartos mamários anteriores; pois os quartos mamários posteriores são mais susceptíveis a mastite por produzirem maior quantidade de leite do que os quartos mamários anteriores. No presente estudo, a única diferença obtida, entre as médias do logCCS foi no quarto mamário posterior direito, no qual apresentou maior logCCS= 5,24.

Muitos autores têm relatado que a mastite é a principal causa do aumento da CCS (MULLER, 2002; ZAFALON et al., 2005). Na presente pesquisa e na

desenvolvida por Schepers et al. (1997) os maiores valores da CCS foram obtidos em quartos mamários infectados. Ogola et al. (2007), também, encontraram efeito significativo da presença de infecção intramamária sobre a CCS cuja os quartos mamários infectados apresentaram maior logCCS (5,79) do que os quartos mamários não infectados (logCCS= 5,42).

Referente à composição do leite, o efeito da presença de infecção intramamária foi significativo sobre os teores de ESD, lactose e proteína. Altas concentrações de ESD, lactose e proteína foram obtidas em quartos mamários não infectados indicando que a mastite afeta negativamente a composição do leite. Ogola et al. (2007) também, com vacas zebuínas, encontraram em quartos mamários infectados o menor teor de lactose (4,5%) e maior valor de ácidos graxos livres (0,44 meqFFA/100g de gordura) do que quartos mamários não infectados que apresentaram menor valor de ácidos graxos livres (0,33 meqFFA/100g de gordura) e maior teor de lactose (4,7%). Os autores não verificaram efeito da mastite sobre o teor de proteína do leite.

Comparando o efeito do tipo de microrganismo sobre a CCS Schepers et al. (1997) obtiveram maiores valores da CCS em amostras com isolamento de *Streptococcus uberis* (logCCS= 2,91), *Streptococcus dysgalactiae* (logCCS= 2,75) e *Staphylococcus aureus* (logCCS=2,59), *Staphylococcus sp*. coagulase negativa (logCCS=1,83) e *Corynebacterium sp*. (logCCS=1,71) e os valores mais baixos em amostras negativas (logCCS=1,14). Ogola et al. (2007) também observaram que a CCS variou conforme o agente envolvido na mastite, pois quartos mamários infectados por *Staphylococcus aureus* apresentaram maiores médias do logCCS (5,84) do que quartos mamários com isolamento de *Staphylococcus sp*. coagulase negativa (logCCS=5,65). Como no presente estudo se analisou o efeito da interação do tipo de microrganismo e mês de coleta, o comportamento de cada patógeno envolvido na mastite diferiu entre os meses de coleta. Segundo Olde Riekerink et al. (2007) a epidemiologia da mastite difere conforme os patógenos envolvidos na doença, cada microrganismo possui uma capacidade de causar a doença, variando assim, a resposta imunológica contra cada agente infeccioso.

Altos valores do logCCS, no estudo de Harouna et al. (2009) foram obtidos em amostras com isolamento de *Staphylococcus aureus* (logCCS= 5,88), seguido por *Staphylococcus sp*. coagulase negativa (logCCS= 5,65) e microrganismos

ambientais (logCCS= 5,60), já o menor logCCS foi encontrado nas amostras negativas (logCCS= 5,41).

Magalhães et al. (2006) ao estudarem o efeito da época do ano sobre a CCS, observaram que no inverno a CCS foi menor do que no verão (janeiro a março), pois nos meses de alta temperatura e umidade as vacas ficam mais susceptíveis à mastite, devido ao aumento do estresse térmico e à maior exposição aos agentes patogênicos, pois essas condições ambientais são favoráveis para o crescimento microbiano.

Nos estudos de Schepers et al. (1997) e Olde Riekerink et al. (2007) quartos mamários infectados por patógenos primários mostraram maior aumento da CCS do que quartos mamários com isolamento de patógenos secundários. No presente trabalho, comparando o logCCS provenientes de amostras com isolamento de patógenos (tanto primários quanto secundários) com amostras negativas; na maioria das vezes, os menores logCCS foram obtidos em amostras negativas. Mas, também, se observou uma diferença do logCCS em amostras com isolamento de patógenos primários (com maior média do logCCS) do que para as amostras com patógenos secundários, pois o grupo de patógenos secundários apresentam pouca capacidade de variação da CCS.

Amostras de leite com isolamento de patógenos primários apresentam maior aumento da CCS do que amostras com patógenos secundários, pois segundo Reneau (1986) esta variação está associada às diferenças da magnitude da resposta celular e da duração da infecção intramamária.

Considerando apenas as amostras sem isolamento microbiano a média geral do logCCS foi de 4,85, neste estudo, e para Schepers et al. (1997) a média foi menor (logCCS=1,14). A média do logCCS para as amostras negativas foi menor (4,85) quando comparada a média do logCCS para o conjunto de dados de quartos mamários infectados e não infectados (logCCS =5,08).

Sobre as amostras sem isolamento microbiano não houve efeito do rebanho (P=0,7) na presente pesquisa, mas para Schepers et al. (1997) o efeito do rebanho sobre a CCS foi significativo.

Diferentemente, do presente estudo, onde não se observou efeito da localização do quarto mamários sobre o logCCS em amostras negativas, Berglund

et al. (2007) observaram maiores logCCS em quartos mamários posterior esquerdo (4,14) e anterior esquerdo (4,20). Os quartos mamários direitos (posterior e anterior) apresentaram, ambos, menores valores do logCCS (4,25).

Considerando os efeitos não infecciosos, pela análise das amostras sem isolamento microbiano, foi observado que sobre o logCCS o efeito do mês de coleta e vaca dentro do rebanho apresentaram efeito altamente significativo; o maior valor da soma dos quadrados foi obtido no mês de coleta (SQ=26,08) seguido pelo efeito de vaca dentro do rebanho (SQ= 13,21). Sobre a composição do leite o mês de coleta e o efeito de rebanho foram significativos apresentando os maiores valores da soma dos quadrados. O efeito do mês de coleta, no presente estudo, foi um importante fator na variação do logCCS e na composição do leite.

5.3 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA CCS DE QUARTOS MAMÁRIOS

No trabalho desenvolvido por Schepers et al. (1997) os valores de sensibilidade e especificidade, para todos os limiares estudados foram mais elevados do que os resultados obtidos neste estudo. Para o limiar de 100 x 10^3 células/mL a sensibilidade e especificidade foram, respectivamente, de 83,2% e 80,5% e, para os limiares de 200 x 10^3 células/mL e 400 x 10^3 células/mL as sensibilidades foram de 74,5% e 60,8% e as especificidades foram de 89,6% e 95,0%; respectivamente. No entanto, os valores preditivos positivos obtidos por estes autores foram mais baixos (valor máximo de 26,9%) do que os encontrados por este estudo (valor máximo de 65,9%), pois Schepers et al. (1997) encontraram baixa prevalência dos patógenos primários.

A sensibilidade e especificidade do limiar de 200 x 10^3 células/mL, no trabalho de Dohoo e Leslie (1991) foi de 72,6% e 85,5%; respectivamente. No entanto, os autores observaram que ao considerarem como quartos negativos tanto amostras sem isolamento microbiano quanto amostras com patógenos secundários, o valor de sensibilidade aumentou para 83,4%, mas a especificidade diminuiu para 58,9%. Os autores para obterem altos valores de sensibilidade e especificidade foi preciso ignorar as amostras com crescimento de patógenos secundários (84,3% e 85,5%;

respectivamente). No presente estudo, os valores de sensibilidade também sofreram alteração conforme o microrganismo envolvido; os maiores valores de sensibilidade foram obtidos quando se excluiu amostras com patógenos secundários do diagnóstico positivo para mastite. Como por exemplo, o limiar de 100 x 10^3 células/mL que apresentava sensibilidade de 66,2% passou para 73,8%, no caso do limiar de 200 x 10^3 células/mL a sensibilidade de 51,2% passou para 59,2%.

Deste modo, ao considerar os três critérios de diagnóstico, as diferenças entre as estimativas (sensibilidade e especificidade) obtidas esclarecem a participação dos patógenos primários e secundários. Os patógenos primários tendem a aumentar os valores de sensibilidade; todavia, os patógenos secundários diminuem a sensibilidade e a especificidade (quando estes são incluídos no diagnóstico positivo para mastite) (DOHOO, 2001). Para Reneau (1986), a presença dos patógenos secundários pode aumentar os resultados falso-negativos.

A alta prevalência de patógenos secundários, no presente estudo, pode justificar os baixos valores encontrados de sensibilidade (66,2%) e especificidade (59,2%) considerando o segundo critério de diagnóstico onde estes microrganismos foram incluídos nas amostras positivas para mastite.

Sargeant et al. (2001) também encontraram o maior valor de sensibilidade (57,4%) e especificidade (72,3%) para o limiar de 100 x 10^3 células/mL. Os mesmos autores observaram que a sensibilidade da CCS aumentou para 66,2% ao identificar, somente, os patógenos primários, mas a especificidade diminuiu para 66,4%. No entanto, quando estes autores objetivaram identificar exclusivamente os patógenos secundários a sensibilidade reduziu para 51,4%.

Neste estudo, também foi verificado que com o aumento do limiar da CCS as chances da ocorrência da mastite aumentaram. Schukken et al. (2003) também observaram que a alta prevalência da mastite estava associada com o aumento da CCS.

No estudo de Pyorala (2003) o limiar de 100 x 10^3 células/mL foi sugerido como um ponto de corte fisiológico, pois amostras de leite com CCS acima deste limiar apresentaram alterações nos componentes do leite.

Para Reneau (1986) não há dúvidas de que resultados da CCS provenientes de quartos mamários são mais precisos e fáceis de interpretação do que amostras compostas dos quatro quartos mamários. Resultados de amostras compostas

podem sofrer efeito de diluição, ou seja, vacas infectadas com somente um quarto mamário acometido pela mastite podem ser classificadas como sadias, pois, os outros três quartos mamários não infectados minimizam o resultado daquele quarto mamário infectado.

Contudo, no presente estudo, o limiar de CCS 100 x 10^3 células/mL tornou-se um bom indicador de mastite por apresentar boa habilidade em detectar amostras positivas (alta sensibilidade) e minimizar os resultados falso-negativos (maior valor preditivo negativo). Para o programa de controle da mastite, considerar este limiar da CCS diminui as fontes de infecção e seleciona os animais para o tratamento.

O fato de o rebanho não ter tido influência sobre o logCCS, no presente estudo, indica que o limiar proposto (100 x 10^3 células/mL) pode ser aplicado a outras fazendas.

5.4 CORRELAÇÃO ENTRE A CCS E COMPOSIÇÃO DO LEITE DE QUARTOS MAMÁRIOS

Segundo Le Roux et al. (2003) o aumento da CCS causa grande mudança na composição do leite; pois amostras de leite com alta CCS (limiar >200 x 10^3 células/ml) sofrem maiores alterações na característica química do leite do que amostras com baixas CCS (limiar <200 x 10^3 células/ml).

Foi identificada, neste trabalho, correlação positiva entre o logCCS com proteína do leite (r=0,10) e logCCS com gordura do leite (r=0,25), todavia, foi observada uma correlação negativa entre o logCCS com lactose do leite (r= -0,63) e logCCS com ESD (r= -0,47). Resultados semelhantes foram encontrados por diversos autores. No estudo de Berglund et al. (2007) considerando somente amostras negativas houve correlação positiva entre CCS com gordura (r= 0,25) e proteína (r= 0,24), e, correlação negativa entre CCS com lactose (r= -0,37). Outros autores, também, observaram correlação negativa entre CCS com o teor de lactose do leite (r= -0,63 e r= -0,77) (LE ROUX et al., 2003; LINDMARK-MANSSONA et al., 2006).

Ogola et al. (2007) verificaram correlações positivas entre CCS com ácido graxos livres (r=0,75), CCS com compostos não caseinosos (r=0,70), CCS com sódio (r=0,87) e CCS com cloro (r=0,85). Porém, foi notada uma correlação negativa entre CCS com potássio (r= -0,64) e CCS com cálcio (r= -0,87).

No presente estudo, amostras com a elevada CCS os teores de proteína e gordura do leite aumentaram, mas as concentrações de lactose e ESD diminuíram. Essas alterações, segundo a literatura, podem ter sido atribuídas ao processo inflamatório da glândula mamária pela mudança na permeabilidade vascular, que facilita a passagem de enzimas, íons e proteínas séricas do sangue para o leite; pela lesão do epitélio glandular secretor que diminui a síntese dos componentes do leite, e, pela ação enzimática (lipases e proteases dos polimorfonucleares e das bactérias que liberam peptídeos e fosfolipídeos aumentando os teores de proteína e gordura totais).

Neste estudo, o baixo teor de gordura do leite (1,78% ± 1,12) pode estar associado à fração do leite analisada (porção inicial da ordenha), uma vez que, a concentração da gordura está intimamente relacionada ao grau de esvaziamento do úbere (MILLOGO et al., 2009).

Os teores de proteína (3,58% ±0,45) e ESD (9,08% ± 0,67) estão de acordo com o recomendado pela Instrução Normativa 51 (BRASIL, 2002), cujos limites mínimos destes constituintes são de 2,9% e 8,4%. No entanto, o teor de gordura do leite estava abaixo do preconizado (< 3,0%).

Referente aos valores da CCS, em Julho de 2008 entrou em vigor o limite máximo para CCS de 750.000 células/mL; no presente estudo, esta exigência foi cumprida, uma vez que, a média geral da CCS obtida foi de 120.000 células/mL.

5.5 PREVALÊNCIA DA MASTITE SUBCLÍNICA EM AMOSTRAS COMPOSTAS

Neste estudo, em amostras compostas a prevalência da mastite em vacas Gir foi de 78,7%. No rebanho estudado por Souza et al. (2009), composto por vacas puras (Holandesa, Jersey e Pardo Suíça) quanto mestiças (Holandesa x Gir) a ocorrência da mastite foi de apenas 69,7%.

Biffa et al. (2005) encontraram uma prevalência de 34,9%. Os autores observaram, também, que houve efeito significativo da raça sobre a prevalência da infecção intramamária, entre fêmeas zebuínas, Jersey, Holandesas e Mestiças.

Souza et al. (2009) isolaram maior número de *Corynebacterium sp*. (31,6%), *Staphylococcus aureus* (30,2%), *Streptococcus agalactiae* (21,1%), *Staphylococcus sp*. coagulase negativa (17,8%) e *Streptococcus sp*. (13,4%). Porém Bonfoh et al. (2005) encontraram 20% de *Staphylococcus aureus* e 10% de *Corynebacterium sp*. No contexto de patógenos secundários e primários, foram isolados, neste trabalho, 42,1% de patógenos secundários e apenas 36,4% de patógenos primários.

Como a ocorrência da mastite depende de vários fatores predisponentes (ambiente, agente infeccioso e animal) a prevalência desta doença pode variar entre os estudos.

5.6 FATORES QUE AFETAM A CCS E COMPOSIÇÃO DO LEITE DE AMOSTRAS COMPOSTAS

A média geral do logCCS, para as amostras com e sem isolamento microbiano foi de logCCS=5,26. Outros autores, como Laevens et al. (1997), Bonfoh et al. (2005) e Souza et al. (2009) encontraram, respectivamente, logCCS=5,80; 5,89 e 1,71.

Da mesma forma em que não se encontrou efeito do rebanho sobre a CCS em nível de quartos mamários, o efeito do rebanho, também, não foi significativo (P=0,32) sobre o logCCS, considerando a unidade experimental a vaca. Diferentemente, Souza et al. (2009) encontraram efeito do rebanho sobre a CCS mas, com pouca influência sobre a variação da CCS. Para estes autores existe uma grande variação da CCS entre os animais submetidos às condições idênticas de manejo.

Souza et al. (2009) também observaram que 81,7% da variação da CCS foi devido a presença da infecção intramamária. No presente estudo, os maiores

logCCS foram obtidos nas amostras infectadas do que em amostras sem crescimento microbiano.

A grande variação da resposta imunológica à invasão bacteriana, na glândula mamária, entre os animais situados nas mesmas condições de manejo, explica o efeito individual da vaca sobre o logCCS, uma vez que, na presente investigação, a maior soma dos quadrados foi obtida no efeito de vaca dentro do rebanho (SQ= 7,39).

Bansal et al. (2005) observaram que todos os componentes do leite, exceto o teor de proteína, variaram significativamente entre amostras sem isolamento microbiano com aquelas com pelo menos um quarto mamário acometido pela mastite. Estes autores obtiveram menores valores da CCS e do teor de gordura do leite em amostras negativas (logCCS=4,55 e 1,43%) e maiores valores de CCS e gordura do leite em amostras com um quarto mamário infectado (logCCS= 4,67 e 2,00%). Porém, para o teor de lactose do leite o acometimento de um quarto mamário pela mastite causou diminuição do seu valor de 5,02% para 4,83%.

No estudo de Martins et al. (2006), com vacas da raça Jersey e Holandesa, o efeito do mês de coleta foi significativo sobre os teores de proteína, lactose e ESD quando considerou amostras com quartos mamários infectados. Entretanto, não houve efeito sobre o teor de gordura e CCS. Os valores mínimos de proteína foram obtidos em julho (2,82%) e agosto (2,90%), mas, no presente estudo, foi no mês dezembro. Os baixos valores de ESD foram encontrados nos meses junho (8,02%), julho (8,0%) e agosto (8,2%), enquanto que, neste trabalho, foi encontrado somente em dezembro. Os menores valores de lactose foram obtidos em abril (4,16%) e julho (4,16%). Os autores observaram que os maiores valores percentuais de proteína e lactose foram obtidos nos meses correspondentes a primavera e início de verão; coincidindo com a melhoria das condições climáticas e qualidade das pastagens pois, os fatores associados com o baixo teor de proteína estão o menor consumo de matéria seca, falta de proteína degradável e falta de carboidrato não-estruturado. Os maiores índices percentuais de mastite, encontrados por estes autores, foram obtidos em setembro a dezembro (62,6% a 68,0%) e o menor em agosto (32,0%) (MARTINS et al., 2006). Os maiores logCCS, nesta pesquisa, foram obtidos nos meses abril, junho e dezembro; mas os menores valores de CCS em fevereiro, agosto e novembro.

Bansal et al. (2005) encontraram, em vacas holandesas, uma diferença significativa entre os valores da CCS e lactose para amostras compostas com e sem isolamento microbiano. O menor logCCS (4,5) foi obtido, por estes autores, em amostras negativas e o maior logCCS (5,35) em amostras infectadas. O teor de lactose diminuiu em amostras com presença de infecção intramamária (4,61%) comparada as amostras negativas (4,84%). No entanto, para os teores de gordura e proteína, estes autores, não encontraram mudanças significativas entre amostras com e sem isolamento microbiano.

Neste estudo, o tipo de microrganismo isolado em casos de mastite influenciou, diferentemente, sobre a variação do logCCS. Amostras compotas com isolamento de *Staphylococcus aureus, Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae* apresentaram maior logCCS do que as amostras sem isolamento microbiano. Souza et al. (2009) obtiveram maior logCCS para amostras com *Streptococcus agalactiae* (6,18) seguido pelo *Staphylococcus aureus* (5,98) e *Streptococcus sp*. não agalactiae (5,95) e *Corynebacterium sp. e Staphylococcus sp*. coagulase negativa (ambos com 5,60). Também, para Laevens et al. (1997) a CCS de amostras com isolamento de *Streptococcus uberis*, *Corynebacterium bovis* e *Staphylococcus sp.* coagulase negativa diferiram significativamente das amostras negativas (logCCS= 1,81; 1,77; 1,72 e 1,69; respectivamente).

No presente estudo, o logCCS foi maior para as amostras com isolamento de patógenos primários e os menores valores do logCCS foram obtidos tanto para as amostras negativas quanto para amostras com isolamento de patógenos secundários. Resultados semelhantes foram obtidos por Souza et al. (2009) que encontraram diferença da CCS para as amostras com isolamento de patógenos primários; com maior logCCS= 5,69; do que com as amostras com isolamento de patógenos secundários com logCCS de apenas 5,31.

As diferenças encontradas entre a CCS conforme o patógeno envolvido na doença são atribuídas ao grau de intensidade do processo inflamatório devido à patogenicidade do agente infeccioso.

5.7 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA CCS EM AMOSTRAS COMPOSTAS

A CCS é freqüentemente mensurada em amostras de leite compostas, no entanto, para Schukken et al. (2003) a relação mais precisa entre a presença da infecção intramamária e a CCS ocorre em nível de quarto mamário. Segundo Reneau (1986), resultados falso-negativos são esperados quando se utilizam amostras compostas. No entanto, considerando a questão prática e à campo, as amostras compostas são muito utilizadas no programa de controle da mastite. Por esta razão, foi desenvolvido o estudo da sensibilidade e especificidade da CCS para as amostras compostas dos quatro quartos mamários.

Mcdermott e Natzke (1982) encontraram, em vacas da raça Holandesa e Pardo Suíça, para o limiar de 100 x 10^3 células/mL, uma sensibilidade de 92,0% e especificidade de 53,0% com valores preditivos positivo e negativo de 38% e 95%; respectivamente. No entanto, para o limiar de 400 x10^3 células/mL a sensibilidade e valor preditivo positivo foram de 60,0% e a especificidade e valor preditivo negativo foram de 87,0%. O limiar de 200 x 10^3 células/mL apresentou sensibilidade de 89,0% e especificidade de 75%, com valor preditivo positivo de 50% e valor preditivo negativo de 93%. Assim como neste estudo, o limiar de CCS com maior valor preditivo negativo foi o de 100 x 10^3 células/mL.

No presente estudo, as sensibilidades dos limiares da CCS aumentaram quando as amostras com isolamento de patógenos secundários foram excluídas das análises, passando de 71,2% para 81,02% no limiar de 100 x 10^3 células/mL, e, de 50,5% para 61,3% no limiar de 200 x 10^3 células/mL.Os patógenos secundários além de interferirem nos valores de sensibilidade foram, também, capazes de diminuir os valores de especificidade quando incluídos no diagnóstico negativo. Quando as amostras com isolamento de patógenos secundários foram atribuídas ao critério de diagnóstico negativo para mastite os valores de especificidade diminuíram de 46,2% para 40,1% e de 69,3% para 60,2%; considerando, respectivamente, os limiares de 100 e 200 x 10^3 células/mL. Esta diferença pode ter sido encontrada, pois segundo Reneau (1986) a magnitude da resposta celular e a duração do processo inflamatório variam conforme o patógeno envolvido na mastite.

Para Sarikaya e Bruckmaier (2006) amostras de leite de quartos mamários não infectados, geralmente, contêm contagem de células basais fisiológicas

menores que 100 x 10^3 células/mL e valores mais elevados de CCS apresentam correlação positiva com a mastite. Resultados similares foram obtidos deste estudo, uma vez que, as chances de ocorrer à mastite aumentaram conforme elevados limiares da CCS.

Manter animais falso-negativos dentro de um programa de controle da mastite pode causar sérios prejuízos, por isso foi proposto o limiar de 100 x 10^3 células/mL como um bom indicador de mastite bovina, uma vez que, apresentou o maior valor preditivo negativo (30,32%) minimizando, assim, as fontes de infecção.

Segundo Reneau (1986) os patógenos secundários aumentam os resultados falso-negativos, pois alteram pouco o valor da CCS. Como, no presente estudo, foi encontrada alta prevalência destes patógenos no rebanho, a escolha do limiar de 100 x 10^3 células/mL foi útil para minimizar este efeito.

Em ambas as unidades experimentais foram propostas o mesmo limiar da CCS, indicando boa relação entre a CCS e infecção intramamária tanto para amostras de quartos mamários quanto para amostras compostas.

O efetivo uso da CCS como indicador da mastite depende do entendimento claro dos fatores que afetam a CCS e o objetivo a que este limiar será proposto, uma vez que, oferece não só informações biológicas, mas também, o impacto econômico decorrente da mastite.

5.8 CORRELAÇÃO ENTRE A CCS E COMPOSIÇÃO DO LEITE EM AMOSTRAS COMPOSTAS

Foram obtidas correlações positivas entre CCS com os teores de proteína e gordura (r= 0,12 e 0,18; respectivamente) e correlações negativas entre CCS com lactose e ESD (r= -0,53 e -0,29; respectivamente). Bonfoh et al. (2005) também observaram que os teores de gordura e proteína aumentaram com elevadas CCS.

Semelhantemente, Cunha et al., (2008) encontraram correlação positiva entre CCS e gordura (r= 0,07) e CCS e proteína (r= 0,15). O teor de proteína para amostras com CCS <100 x 10^3 células/mL foi 3,07% e de gordura 3,46%, porém, em amostras com altas CCS (contagens entre 251 a 500 x 10^3 células/mL) os valores destes constituintes aumentaram (3,18% e 3,55%).

A composição do leite é afetada por uma variedade de fatores fisiológicos e patológicos. Dentre os fisiológicos, o estágio de lactação, idade, raça e alimentação são os mais importantes. No entanto, exceto o fator raça, os demais fatores, no presente estudo, não foram controlados e os animais foram expostos as condições variadas de manejo e alimentação, além das vacas estarem em diferentes estágios de lactação e idade e, por estas questões como pelo efeito significativo do rebanho sobre a composição do leite, as diferenças obtidas entre a composição do leite para cada rebanho estudado pode ser justificada pela diferença da dieta e do estágio de lactação.

Na presença de um processo infeccioso, pelo aumento da permeabilidade vascular, ocorre a passagem dos neutrófilos, íons e proteínas séricas do sangue para a glândula mamária. E, na tentativa de combater o microrganismo ha liberação de lípases e proteases que degradam os constituintes do leite liberando peptídeos e fosfolipídeos. Durante a mastite, ocorrem sérios danos no epitélio glandular secretor gerando deficiência na síntese de lactose, caseína e gordura do leite (pela *síntese de novo*). Por estas razões altas CCS causam aumento dos teores de proteína e gordura do leite e diminuição do teor de lactose.

6 CONCLUSÃO

O efeito individual da vaca dentro do rebanho foi o principal fator responsável pela variação do logCCS.

Houve efeito de rebanho apenas sobre a composição do leite, exceto sobre o teor de lactose.

O mês de coleta afetou tanto a composição do leite quanto o logCCS.

Os maiores valores do logCCS foram encontrados em quartos mamários e vacas com presença da infecção intramamária. Da mesma forma, a CCS, também, variou conforme o microrganismo causador. Patógenos primários foram os responsáveis pela maior elevação do logCCS comparados aos patógenos secundários.

O limiar da CCS de 100 x 10^3 células/mL foi um bom indicador de mastite subclínica em vacas Gir, uma vez que, apresentou o maior valor de sensibilidade e valor preditivo negativo, tanto em amostras compostas quanto de quartos mamários.

A composição do leite foi influenciada pela CCS. Em altas CCS foi observada diminuição dos teores de lactose e ESD, mas aumento das concentrações de proteína e gordura do leite.

REFERÊNCIAS

ALMAW, G.; ZERIHUN, A.; ASFAW, Y. Bovine mastitis and its association with selected risk factors in smallholder dairy farms in and around Bahir Dar, Ethiopia. **Tropical Animal Health Production**, v. 40, n. 6, p. 427-432, 2008.

ANDRADE, L. M.; FARO, L. E.; CARDOSO, V. L.; ALBUQUERQUE, L. G.; CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F. Efeitos genéticos e de ambiente sobre a produção de leite e a contagem de células somáticas em vacas holandesas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 2, p. 343-349, 2007.

BANSAL, B. K.; HAMANN, J.; GRABOWSKI, N. T.; SINGH, K. B. Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis. **Journal of Dairy Research**, v. 72, n. 2, p. 144-152, 2005.

BARBANO, D. M.; CLARK, C. L. Symposium: instrumental methods for measuring components of milk-Infrared milk analysis- challenges for the future. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 6, p. 1627-1636, 1989.

BARBOSA, S. B. P.; MONARDES, H. G.; CUE, R. I.; RIBAS, N. P.; BATISTA, A. M. V. Avaliação da contagem de células somáticas na primeira lactação de vacas holandesas no dia do controle mensal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 1, p. 94-102, 2007.

BENTLEY. **Bentley 2000**: Operator`s manual. Chasca: BENTILEY Instruments, 1995.

BERGLUND, I.; PETTERSSON, G.; OSTENSSON, K.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. Quarter Milking for improved detection of increase SCC. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 4, p. 427-432, 2007.

BIFFA, D.; DEBELA, E.; BEYENE, F. Prevalence and Risk Factors of Mastitis in Lactating Dairy Cows in Southern Ethiopia. **Internacional Journal Applied Resistance Veterinary Medicine**, v. 3, n. 3, p. 189-198, 2005.

BONFOH, B. B.; ZINSSTAGA, J.; FARAHC, Z.; SIMB!ED, C. F.; ALFAROUKHB, I. O.; AEBIE, R.; BADERTSCHERE, R. N.; COLLOMBE, M.; MEYERE, J.; REHBERGERE, B. Raw milk composition of Malian Zebu cows (Bos indicus) raised under traditional system. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, n. 1, p. 29-38, 2005.

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

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; NICOLAU, E. S.; OLIVEIRA, A. N.; P.; O. J.; NEVES, R. B. S.; MANSUR, J. R. G.; THOMAZ, L. W. Contagem Celular Somática: Relação com a Composição Centesimal do Leite e Período do Ano no Estado de Goiás. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 848-854, 2005.

CAMPOS, E. M. **Estruturação de uma organização vertical para o sistema agroindustrial do leite no Estado de São Paulo**. 2007. 163f. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto / SP, 2007.

CAMPOS, R.; GONZÁLEZ, F.; COLDEBELLA, A.; CARDOSO, F. Indicadores do ambiente ruminal e suas relações com a composição do leite e células somáticas em diferentes períodos da primeira fase da lactação em vacas de alta produção **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 525-530, 2006.

COENTRÃO, C. M.; SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F.; PAIVA E BRITO, M. A. V.; LILENBAUM, W. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 283-288, 2008.

CUNHA, R. P. L.; MOLINA, L. R.; CARVALHO, A. U.; FACURY FILHO, E. J.; FERREIRA, P. M.; GENTILINI, M. B. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 19-24, 2008.

DJABRI, B.; BAREILLE, N.; BEAUDEAU, F. E.; SEEGERS, H. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. **Veterinary Research**, v. 33, n. 4, p. 335-357, 2002.

DOBRANIC, V.; NJARI, B.; SAMARDZIJA, M.; MIOKOVIC, B.; RESANOVIC, R. The influence of the season on the chemical composition and the somatic cell count of bulk tank cow's milk.**Journal of the Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb,** v. 78, n. 3, p. 235-242, 2008.

DOHOO, I. R. Setting SCC cutpoints for cow and herd interpretation. In: Nacional Mastitis Council Annual Proceedings. **Anais...** Atlantic Veterinary College, p. 9, 2001.

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.

DURR, J. W. Como produzir leite de alta qualidade. In: SIMPÓSIO SOBRE BOVINOCULTURA LEITEIRA: REQUISITOS DE QUALIDADE NA BOVINOCULTURA LEITEIRA, 6., 2008, Piracicaba, **Anais...** 2008, p.15-26

DURR, J. W.; CUE, R. I.; MONARDES, H. G.; MORO-MENDEZ, J.; WADE, K. M. Milk losses associated with somatic cell counts per breed, parity and stage of lactation in Canadian dairy cattle. **Livestock Science**, v. 117, n. 2-3, p. 225-232, 2008.

FARIA, F. J. C.; VERCESI FILHO, A. E.; MADALENA, F. E.; JOSANHKIAN, A. A. Parâmetros populacionais do rebanho Gir Mocho registrado no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 6S, p. 1984-1988, 2001.

FERNANDES, A. M.; OLIVEIRA, C. A. F.; LIMA, C. G. Effects of somatic cell counts in milk on physical and chemical characteristics of yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 2, p. 111-115, 2007.

HAROUNA, A.; ZECCHINI, M.; LOCATELLI, C.; SCACCABAROZZI, L.; CATTANEO, C.; AMADOU, A.; BRONZO, V.; MARICHATOU, H.; BOETTCHER, P. J.; ZANONI, M. G.; ALBORALI, L.; MORONI, P. Milk hygiene and udder health in the periurban area of Hamdallaye, Niger. **Tropical Animal Health Production**, v. 41, n. 5, p. 705-710, 2009.

IBGE. ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. Rio de janeiro: Istituto Brasileiro de Geografia e Estatística**,** 2009.

KAMPHUIS, C.; SHERLOCK, R.; JAGO, J.; MEIN, G.; HOGEVEEN, H. Automatic detection of clinical mastitis is improved by In-line monitoring of somatic cell count. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 12, p. 4560-4570, 2008.

KERRO DEGO, O.; TAREKE, F. Bovine Mastitis In Selected Areas of Southern Ethiopia. **Tropical Animal Health Production**, v. 35, n. 3, p. 197-205, 2003.

LAEVENS, H.; DELUYKER, H.; SCHUKKEN, Y. H.; MEULEMEESTER, L.; VANDERMEERSCH, R.; MUELENAERE, E.; KRUIF, A. Influence of parity and stage of lactation on somatic cell count in bacteriologically negative cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 12, p. 3219-3226, 1997.

LARRY SMITH, K.; TODHUNTER, D. A.; SCHOENBERGER, P. S. Environmental Mastitis: Cause, Prevalence, Prevention. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 6, p. 1531-1553, 1985.

LE ROUX, Y.; LAURENT, F.; MOUSSAQUI, F. Polymorphonuclear proteolytic activity and milk composition change. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 629-645, 2003.

LINDMARK-MANSSONA, H.; BRANNING, C.; ALDEN, G.; PAULSSON, M. Relationship between somatic cell count, individual leukocyte populations and milk components in bovine udder quarter milk. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 7, p. 717-727, 2006.

MAGALHÃES, H. R.; FARO, L. E.; CARDOSO, V. L.; PARO DE PAZ, C. C.; CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F. Influência de fatores de ambiente sobre a contagem de células somáticas e sua relação com perdas na produção de leite de vacas da raça Holandesa. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 35, n. 2, p. 415-421, 2006.

MALINOWSKI, E.; LASSA, H.; KŁOSSOWSKA, A.; MARKIEWICZ, H.; KACZMAROWSKI, M.; SMULSKI, S. Relationship between mastitis agents and somatic cell count in foremilk samples. **Bulletin of the Veterinary Institute Pulawy**, v. 50, n. 3, p. 349-352, 2006.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 51, de 18 de Setembro de 2002. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta do leite cru refrigerado e seu transporte a granel. Brasilia: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2002.

MARTINS, P. C.; CARNEIRO, A. V. Aumento de renda da população e consumo de leite. In: SIMPÓSIO SOBRE BOVINOCULTURA LEITEIRA: REQUISITOS DE QUALIDADE NA BOVINOCULTURA LEITEIRA. 6., 2008, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba; FEALQ, 2008. 7-14p.

MASRTINS, P. R. G.; SILVA, C. A.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M. E. R.; STUMPF JUNIOR, W.; ZANELA, M. B. Produção e qualidade do leite na bacia leiteira de Pelotas-RS em diferentes meses do ano. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 209-214, 2006.

MCDERMOTT, M. P.; NATZKE, R. P. Predictability by somatic cell count related to prevalence pf intramammary infection within herds. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 8, p. 1535-1539, 1982.

MILLOGO, V.; OUEDRAOGO, G. A.; AGENAS, S.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. Day-to-day variation in yield, composition and somatic cell count of saleable milk in hand-milked zebu dairy cattle. **African Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 3, p. 151-155, 2009.

MULLER, E. E. Qualidade do leite. Contagem de células somáticas e prevenção da mastite. In: SIMPÓSIO DE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA DE LEITE DA REGIÃO SUL DO BRASIL, 2., Maringá. **Anais...** Maringá. 2002.

MURPHY, S. C.; CRANKER, K.; SENYK, G. F.; BARBANO, D. M. Influence of Bovine Mastitis on Lipolysis and Proteolysis in Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 3, p. 620-626, 1989.

OGOLA, H.; SHITANDI, A.; NANUA, J. Effect of mastitis on milk compositional quality. **Journal of Veterinary Science**, v. 8, n. 3, p. 237-242, 2007.

OLDE RIEKERINK, R. G. M.; BARKEMA, H. W.; VEENSTRA, W.; BERG, F. E.; STRYHN, H.; ZADOKS, R. N. Somatic cell count during and between milkings. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 8, p. 3733-3741, 2007.

OLIVEIRA, C. A. F.; FONSECA, L. F. L.; GERMANO, P. M. L. Aspectos relacionados à produção que influenciam a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 62, p. 10-13, 1999.

PASCHOAL, J. J.; ZANETTI, M. A.; CUNHA, J. A. Contagem de células somáticas no leite de vacas suplementadas no pré-parto com vitamina E e Selênio. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p. 1462-1466, 2006.

PIEPERS, S.; MEULEMEESTER, L. D.; KRUIF, A.; OPSOMER, G.; BARKEMA, H. W.; VLIEGHER, S. D. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. **Journal of Dairy Research**, v. 74, n. 4, p. 478-483, 2007.

PRESTES, D. S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à Mastite: Fatores que Influenciam - uma Revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 9, n. 1, p. 118-132, 2002.

PYORALA, S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 564-578, 2003.

RAINARD, P. E.; RIOLLETI, C. Innate Imunity of the Bovine Mammary Gland. **Veterinary Research**, v. 37, n. 3, p. 369-400, 2006.

REIS, S. R.; SILVA, N.; BRESCIA, M. V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 6, p. 651-658, 2003.

RENEAU, J. K. Effective Use of Dairy Herd Improvement Somatic Cell Counts in Mastitis Control. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 6, p. 1708-1720, 1986.

RUPP, R. E.; BOICHARD, D. Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 671-688, 2003.

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

SARGEANT, J. M.; LESLIE, K. E.; SHIRLEY, J. E.; PULKRABEK, B. J.; LIM, G. H. Sensitivity and specificity of somatic cell count and California Mastitis Test for identifying intramammary infection in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 9, p. 2018-2024, 2001.

SARIKAYA, H.; BRUCKMAIER, R. M. Importance of the Sampled Milk Fraction for the Prediction of Total Quarter Somatic Cell Count. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 11, p. 4246-4250, 2006.

SAS. **Statistical Analyses System**. North Carolina State University, 1999.

SCHEPER, J. A. E.; DIJKHUIZEN, A. A. The Economics of Mastitis and Mastitis Control in Dairy Cattle: a critical analysis of estimates published since 1970. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 10, p. 213-224, 1991.

SCHEPERS, A. J.; LAM, T.; SCHUKKEN, Y. H.; WILMINK, J. B. M. E.; HANEKAMP, W. J. 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.

SCHUKKEN, Y. H.; WILSON, D. J.; WELCOME, F.; GARRISON-TINOFSKY, L.; GONZALES, R. N. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 579-596, 2003.

SEEGERS, H.; FOURICHON, C.; BEAUDEAU, F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 475-491, 2003.

SHARIF, A.; MUHAMMAD, G. Somatic cell count as an indicator of udder health status under modern dairy production: a review. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 28, n. 4, p. 194-200, 2008.

SHARIF, A.; MUHAMMAD, G. Mastitis control in dairy animals. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 29, n. 3, p. 145-148, 2009.

SORDILLO, L. M. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **Livestock production Science**, v. 98, n. 1-2, p. 89-99, 2005.

SORDILLO, L. M.; SHAFIER-WEAVER, K.; DEROSA, D. Symposium: Bovine immunology. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 1851-1865, 1997.

SOUTO, L. I. M.; MINAGAWA, C. Y.; TELLES, E. O.; GARBUGLIO, M. A.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; SAKATA, S. T.; BENITES, N. R. Relationship between occurrence of mastitis pathogens in dairy cattle herds and raw-milk indicators of hygienic-sanitary quality. **Journal of Dairy Research**, v. 75, n. 1, p. 121-127, 2008.

SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F.; MOREIRA, E. C.; BRITO, M. A. V. P.; BASTOS, R. R. Fatores de risco associados à alta contagem de células somáticas do leite do tanque em rebanhos leiteiros da Zona da Mata em Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 2, p. 251-260, 2005.

SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F.; MOREIRA, E. C.; BRITO, M. A. V. P.; SILVA, M. V. G. B. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1015-1020, 2009.

URECH, E.; PUHAN, Z.; SCHA¨ LLIBAUM, M. Changes in Milk Protein Fraction as Affected by Subclinical Mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 11, p. 2402-2411, 1999.

VERNEQUE, R. S.; MARTINEZ, M. L.; TEODORO, R. L. Programa Nacional do Gir leiteiro. In: Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, 3., 1999, Belo Horizonte, **Anais...** Belo Horizonte, 1999, p. 212-218.

VERNEQUE, R. S.; PEIXOTO, M. G. C. D.; TEODORO, R. L.; MACHADO, M. A. Cruzamento para produção de leite. In: SIMPÓSIO SOBRE BOVINOCULTURA LEITEIRA. REQUISITOS DE QUALIDADE NA BOVINOCULTURA LEITEIRA, 6., 2008, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2008, p. 81-102.

VIANNI, M. C. E. E.; LÁZARO, N. S. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos em amostras de cocos Gram-positivos, catalase negativos, isoladas de mastite subclínica bubalina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 2, p. 47-51, 2003.

VOLTOLINI, T. V.; SANTOS, G. T.; ZAMBOM, M. A.; RIBAS, N. P.; MÜLLER, E. E.; DAMASCENO, J. C.; ÍTAVO, L. C. V.; VEIGA, D. R. Influência dos estádios de lactação sobre a contagem de células somáticas do leite de vacas da raça holandesa e identificação de patógenos causadores de mastite no rebanho. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 4, p. 961-966, 2001.

ZAFALON, L. F.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L. A.; OLIVEIRA, J. V.; RESENDE, F. D. **Produção e características físico-químicas e celulares do leite oriundo de quartos mamários de vacas com e sem mastite subclínica em três diferentes fases de lactação.** Boletim de Indústria Animal, Nova Odessa, v. 62, n.2, p.117-124, 2005.