PREVALÊNCIA DA MASTITE BOVINA: (ESTUDO COMPARATIVO DE MÉTODOS
PARA SUA DETECÇÃO E DO COMPORTAMENTO DE VÁRIOS AGENTES ETIO-
LÓGICOS FRENTE À PROVA DA REDUÇÃO DO AZUL DE METILENO.

Ø

^{RS}
ANTONIO NADER FILHO

Tese apresentada à Faculdade de Saúde
Pública da Universidade de São Paulo,
Departamento de Nutrição, para obten-
ção do título de "Doutor em Saúde Pú-
ca".

Orientador: Prof. Dr. Donald Wilson

São Paulo
1983

DEDICATÓRIA

A MEUS PAIS

pelo exemplo de dignidade,
amor e compreensão

À MINHA ESPOSA

cujo apoio, dedicação e
incentivo influíram na
realização deste trabalho

ÀS MINHAS FILHAS

Tatiana e Talita pelo
amor e compreensão

AGRADECIMENTOS

AO PROF. DR. DONALD WILSON

homenagem de sincero reconhece
cimento e profunda gratidão

AO PROF. DR. RUBEN PABLO

SCHOCKEN-ITURRINO

pelo estímulo e colaboração
prestada durante o planejame
mento e elaboração deste
trabalho

À COORDENADORIA DE ASSISTÊNCIA
AO PESSOAL DE ENSINO SUPERIOR
(CAPES) e À FUNDAÇÃO JUDITH
BUZAID, pela ajuda financei
ra proporcionada

- Ao Prof. Dr. AILTO ANTONIO CASAGRANDE, mui digno Diretor da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal-UNESP, pelas condições oferecidas para que este trabalho pudesse ser realizado;
- Ao Prof. Dr. ORLANDO FERRARI, Chefe do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FCAVJ/UNESP, pelo apoio irrestrito, amizade sincera e constante estímulo;
- À colega SANDRA PEREIRA FUKUDA, pela colaboração prestada junto ao Lacticínio Flor da Nata de Barretos/SP;
- Ao Prof. Dr. SEBASTIÃO TIMO IARIA, Prof. Dr. GIL VIANNA PAIM, Prof. Dr. OMAR MIGUEL, Prof^a Dr^a SIRDEIA MAURA PERRONE FURLANETTO e Prof. Dr. ARAMIS AUGUSTO PINTO, pelas críticas e sugestões apresentadas;
- Ao Prof. Dr. GIL VITAL ALVARES PESSÔA, pela colaboração prestada junto ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo;
- Ao colega AUREO EVANGELISTA SANTANÀ, pela colaboração prestada junto ao laboratório do setor de Clínica Médica da FCAVJ/UNESP;
- Às funcionárias do Instituto Biológico de Ribeirão Preto , ANA MARIA MACHADO CARNEIRO, FLÁVIA CARNEIRO BUENO e TIYO OKADA MURAKAMI, pela colaboração prestada durante o estágio realizado na FCAVJ/UNESP;

- Aos FUNCIONÁRIOS do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública e Departamento de Microbiologia da FCAVJ / UNESP, pelo apóio recebido,
 - Aos FUNCIONÁRIOS do Serviço de Inspeção do Laticínio Flor da Nata de Barretos/SP, pelo interesse e dedicação,
- E a todos aqueles, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

INDICE

	Página
RESUMO.....	xvii
SUMMARY.....	xx
INTRODUÇÃO.....	01
MATERIAL E MÉTODOS.....	15
RESULTADOS.....	38
DISCUSSÃO.....	59
CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

INDICE DE TABELAS

Página

TABELA 1 - Distribuição das fêmeas positivas, suspeitas e negativas a prova do CMT, segundo os rebanhos produtores de leite tipo B, estudados na região do Município de Barretos, São Paulo, 1982....	43
---	----

TABELA 2 - Prevalência da mastite bovina em seis rebanhos produtores de leite tipo B, detectada pelo CMT e confirmada pelo exame bacteriológico, segundo o número de fêmeas e quartos analisados, na região do Município de Barretos, São Paulo, 1982.....	44
--	----

TABELA 3 - Distribuição das amostras positivas ao exame bacteriológico, segundo a localização do quarto afetado, nos rebanhos produtores de leite tipo B, estudados na região do Município de Barretos, São Paulo, 1982.....	45
TABELA 4 - Distribuição do número de quartos positivos e negativos ao exame bacteriológico, e dos quartos "perdidos", segundo os rebanhos produtores de leite tipo B, estudados na região do Município de Barretos, São Paulo, 1982.....	46
TABELA 5 - Comparação dos resultados obtidos na prova do CMT com os do exame bacteriológico no diagnóstico da mastite bovina, e determinação do percentual de concordância, nos rebanhos produtores de leite tipo B, estudados na região do Município de Barretos, São Paulo, 1982.	47
TABELA 6 - Comparação dos resultados obtidos na prova do CMT com os da contagem leucocitária no diagnóstico da mastite bovina, e determinação percentual de concordância, nos rebanhos produtores de leite tipo B, estudados na região do Município de Barretos, São Paulo, 1982.	48

TABELA 7 - Comparação dos resultados obtidos na prova do CMT com os da pesquisa do teor de cloretos no diagnóstico da <u>ma</u> <u>s</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>t</u> <u>e</u> <u>b</u> <u>o</u> <u>v</u> <u>i</u> <u>n</u> <u>a</u> , e determinação do <u>p</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>c</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>t</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>l</u> <u>d</u> <u>e</u> <u>c</u> <u>o</u> <u>n</u> <u>c</u> <u>o</u> <u>r</u> <u>d</u> <u>â</u> <u>n</u> <u>c</u> <u>i</u> <u>a</u> , nos <u>r</u> <u>e</u> <u>b</u> <u>a</u> <u>n</u> <u>h</u> <u>o</u> <u>s</u> <u>p</u> <u>r</u> <u>o</u> <u>d</u> <u>u</u> <u>t</u> <u>o</u> <u>r</u> <u>e</u> <u>s</u> <u>d</u> <u>e</u> <u>l</u> <u>e</u> <u>i</u> <u>t</u> <u>e</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>p</u> <u>o</u> <u>B</u> , estudados na região do Município de Barretos, São Paulo, 1982.....	49
TABELA 8 - Comparação dos resultados obtidos na contagem leucocitária com os do exame bacteriológico no diagnóstico da <u>ma</u> <u>s</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>t</u> <u>e</u> <u>b</u> <u>o</u> <u>v</u> <u>i</u> <u>n</u> <u>a</u> , e determinação do <u>p</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>c</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>t</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>l</u> <u>d</u> <u>e</u> <u>c</u> <u>o</u> <u>n</u> <u>c</u> <u>o</u> <u>r</u> <u>d</u> <u>â</u> <u>n</u> <u>c</u> <u>i</u> <u>a</u> , nos <u>r</u> <u>e</u> <u>b</u> <u>a</u> <u>n</u> <u>h</u> <u>o</u> <u>s</u> <u>p</u> <u>r</u> <u>o</u> <u>d</u> <u>u</u> <u>t</u> <u>o</u> <u>r</u> <u>e</u> <u>s</u> <u>d</u> <u>e</u> <u>l</u> <u>e</u> <u>i</u> <u>t</u> <u>e</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>p</u> <u>o</u> <u>B</u> , estudados na região do Município de Barretos, São Paulo, 1982.....	50
TABELA 9 - Comparação dos resultados obtidos na contagem leucocitária com os da <u>p</u> <u>e</u> <u>s</u> <u>q</u> <u>u</u> <u>i</u> <u>s</u> <u>a</u> do teor de cloretos no diagnóstico da <u>ma</u> <u>s</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>t</u> <u>e</u> <u>b</u> <u>o</u> <u>v</u> <u>i</u> <u>n</u> <u>a</u> , e determinação do <u>p</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>c</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>t</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>l</u> <u>d</u> <u>e</u> <u>c</u> <u>o</u> <u>n</u> <u>c</u> <u>o</u> <u>r</u> <u>d</u> <u>â</u> <u>n</u> <u>c</u> <u>i</u> <u>a</u> , nos <u>r</u> <u>e</u> <u>b</u> <u>a</u> <u>n</u> <u>h</u> <u>o</u> <u>s</u> <u>p</u> <u>r</u> <u>o</u> <u>d</u> <u>u</u> <u>t</u> <u>o</u> <u>r</u> <u>e</u> <u>s</u> <u>d</u> <u>e</u> <u>l</u> <u>e</u> <u>i</u> <u>t</u> <u>e</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>p</u> <u>o</u> <u>B</u> , estudados na região do Município de Barretos, São Paulo, 1982.....	51
TABELA 10 - Comparação dos resultados obtidos na pesquisa do teor de cloretos com os do exame bacteriológico no diagnóstico da	

mastite bovina, e determinação do per <u>centual</u> de concordância, nos rebanhos produtores de leite tipo B, estudados na região do Município de Barretos, São Paulo, 1982.....	52
---	----

TABELA 11 - Distribuição dos agentes etiológicos no exame bacteriológico das 56 fêmeas reagentes a prova do CMT, nos rebanhos produtores de leite tipo B, estudados na região do Município de Barretos , São Paulo, 1982.....	53
---	----

TABELA 12 - Comparação dos resultados obtidos na prova da redução do azul de metileno com os da contagem padrão em placas , segundo as 56 amostras de leite das fêmeas reagentes a prova do CMT, nos rebanhos produtores de leite tipo B , estudados na região do Município de Barretos, São Paulo, 1982.....	54
---	----

TABELA 13 - Comparação dos resultados obtidos na contagem leucocitária com os da prova de redução do azul de metileno, segundo as 56 amostras de leite das fêmeas reagentes a prova do CMT, nos rebanhos produtores de leite tipo B, estudados na região do Município de Barretos, São Paulo, 1982.....	55
---	----

TABELA 14 - Comparação dos resultados obtidos na prova da redução do azul de metileno com os da contagem padrão em placas, segundo as amostras de leite inoculadas experimentalmente, dos rebanhos produtores de leite tipo B, estudados na região do Município de Barretos, São Paulo, 1982...	56
TABELA 15 - Distribuição dos resultados obtidos nas análises realizadas pelo Serviço de Inspeção do Laticínio Flor da Nata, segundo os rebanhos produtores de leite tipo B, estudados na região do Município de Barretos, São Paulo, 1982.....	57
TABELA 16 - Prevalência da mastite bovina nos rebanhos produtores de leite tipo B, estudados na região do Município de Barretos, São Paulo, segundo o número de fêmeas e quartos analisados, e resultados obtidos pelo SIF na pesquisa do teor de cloretos, prova de pūs e na prova de White side, 1982.....	58

RESUMO

Foram submetidas a prova do "California Mastitis Test" (CMT), 468 vacas leiteiras pertencentes a seis propriedades rurais produtoras de leite tipo B, localizadas na região do Município de Barretos, SP. Das 56 (12,0%) fêmeas reagentes a esta prova, 48 (10,3%) foram confirmadas através do isolamento e identificação do agente etiológico. A elevada concordância (85,71%) verificada entre a prova do CMT e o exame bacteriológico, confirma a eficiência desta prova na detecção de transtornos da glândula mamária não perceptíveis clinicamente, uma vez que nenhuma das fêmeas analisadas apresentou sinais da enfermidade.

A contagem leucocitária e a pesquisa do teor de cloretos efetuadas nas 56 fêmeas reagentes a prova do CMT, apresentaram concordâncias de 87,5% e 50,0%, respectivamente,

em relação ao exame bacteriológico. O *Staphylococcus aureus* foi o agente etiológico mais frequente (52,08%) nos casos de mastite bovina.

O estudo comparativo entre a contagem padrão em placas e a prova da redução do azul de metileno, efetuado nas 56 amostras reagentes a prova do CMT, revelou que 30 (53,57%) amostras apresentaram tempo de redução não condizente com o número de microrganismos determinado, isto é, tempo de redução menor que 3 1/2 horas e contagem total de microrganismos inferior a 500.000 microrg/ml. Observou-se, ainda, que destas 30 amostras, 26 (86,67%) apresentaram contagens leucocitárias superiores a 2.500.000 leucócitos/ml., sugerindo deste modo, uma provável interferência dos leucócitos quando em número elevado, na prova da redução do azul de metileno.

O estudo comparativo entre a contagem padrão em placas e a prova da redução do azul de metileno, efetuado nas 30 amostras negativas a prova do CMT, revelou que 27 (90,0%) amostras apresentaram o tempo de redução condizente com o número de microrganismos determinado, o que confirma a importância de sua utilização na rotina do Serviço de Inspeção. A provável interferência dos leucócitos não compromete a eficiência desta prova, pois as variações observadas ocorrem no sentido de abreviar o tempo de redução, sendo muito pequena a probabilidade de aceitação de um produto com o número de microrganismos superior ao permitido pelo Ministério da Agricultura.

Dentre as provas utilizadas pelo Serviço de Inspeção na detecção da mastite bovina a nível de Estabelecimentos Industriais a prova de Whiteside foi a que apresentou maior sensibilidade e especificidade, capaz de revelar a presença de leite anormal em rebanhos cuja prevalência desta doença foi igual ou superior a 7,0% das fêmeas ou 1,4% dos

quartos analisados. A pesquisa do teor de cloretos apresen
tou menor sensibilidade e especificidade, incapaz de revelar
a presença de leite anormal em todos os rebanhos analisados.
Entretanto, este fato não invalida a utilidade de sua aplicaç
ção, pois esta prova pode ser de fundamental importância na
detecção de fraudes no leite.

A prevalência da mastite bovina em até 20,0% das
fêmeas leiteiras ou em até 5,0% dos quartos examinados, não
foi suficiente para colocar os quesitos analisados nas amos-
tras de leite, fora dos padrões normais. Acredita-se que eses
tes padrões devam ser objeto de estudos posteriores.

SUMMARY

Four-hundred and sixty-eight milk cows, belonging to six type B milk producing dairy farms, located in the region of Barretos, SP, Brazil were submitted to "California Mastitis Test", of the fifty-six (12,0%) cows positive to the mentioned test, forty eight (10,3%) had the diagnosis confirmed through isolation and identification of the etiologic agent. High agreement (85,7%) was obtained between CMT and bacteriologic examination, which confirms the efficiency of CMT in the detection of diseases of the mammary glands, not perceptible by clinical examination, as none the animals examined presented signs of disease.

Leucocyte count and determination of chloride level performed on the fifty-six reactors presented agreement of 87,5% and 50,0%, respectively, with bacteriological exami

nation.

Staphylococcus aureus was the most frequently isolated bacterium (52,08% of cases).

Comparison between total plate count and reductase test, performed on thirty samples negative to CMT, showed that twenty-seven samples (90,0%) presented a reduction time compatible with the number of microorganisms present, confirming the importance of reductase test regarding inspection. The theoretical interference of leucocytes was not important in practice, as variations observed were abbreviation of reduction time, rendering the probability of accepting a product with a number of microorganisms over legal limits very small.

Considering tests used by the Inspection Service for detection of bovine mastitis, the Whiteside test presented highest sensivity and specificity, as it was capable of reveling abnormal milk when prevalence was 7,0% and over, considering animals and 1,4% considering quarters.

Chloride level presented lower sensitivity and specificity as it was unable to detect abnormal milk in all dairy farms. However it is very important in the detection of frauds.

Prevalence of mastitis of up to 20,0% of animals or of 5,0% of quarters was not sufficient to bring the total milk produced below standards.

1.- INTRODUÇÃO

A mastite bovina por suas implicações na produção de leite, constitui importante problema de saúde pública, além de acarretar consideráveis perdas econômicas representadas pela queda de produção láctea ou pela perda total desta capacidade (FIGUEIREDO, 1962; LEITE & cols., 1976).

Embora esta enfermidade ocorra em todas as espécies animais, adquire maior importância entre os bovinos, pois é considerada em dos principais entraves à exploração leiteira em praticamente todos os países do mundo (CORREIA & CORREIA, 1979; FERREIRO, 1978).

MARTINEZ (1958), LANGENEGGER & cols. (1970), HARROP & cols (1975) e FERREIRO & cols (1981), estudando as "bacias leiteiras" de Porto Alegre, Rio de Janeiro, Pernambuco e da "Zona da Mata" Minas Gerais, observaram prevalências de 6,2%,

20,0%, 14,5% e 14,2%, respectivamente. Verificaram ainda que as proporções de quartos perdidos foram de 27,8%, 7,0%, 3,9% e 1,78%, respectivamente.

A mastite bovina determina a diminuição da capacidade produtora de secreção lática em níveis que variam entre 10,0% e 25,% (PLASTRIDGE, 1958; RAWLAND & cols., 1959; O'DONOVAN & cols., 1966; LANDREY, 1966 e SANTOS & MOREIRA, 1977). Esta doença pode acarretar variações de alguns dos componentes do leite, reduzindo os teores de lactose, gordura, sólidos não gordurosos, especialmente caseína (HEIDRICH & RENK, 1969; JANSEN, 1970), além de comprometer as características físico-químicas dos produtos derivados, alterando o sabor, viscosidade e textura de manteiga e queijos (SANTOS & MOREIRA, 1976).

É muito frequente a possibilidade do leite de uma fêmea mastítica ser incorporado ao leite de vacas normais, nas atuais condições de produção (SANTOS & MOREIRA, 1977), podendo desta forma alterar a eficácia do processo de pasteurização, constituindo-se, portanto, em ameaça à saúde pública.

O leite cru procedentes de fêmeas infectadas, apresenta perigoso veículo de infecção para o homem, podendo ser transmitidas doenças como a brucelose, estafilocóccias, estreptocóccias, alguns casos de tuberculose e febre Q (TOLLE, 1971).

Embora não tenham sido notificados casos de intoxicação alimentar determinados por enterotoxina estafilocócica presente no leite e derivados, ARANALDE & cols. (1974) chamaram a atenção para a possibilidade desta intoxicação na população humana.

Segundo PANETTA (1977), ainda é grande a quanti

dade de queijo minas frescal manufaturado no Brasil com leite não pasteurizado, podendo este fato representar sério risco para a população humana. Observa-se ainda que outros tipos de queijo são produzidos com leite não pasteurizado, constituindo-se, portanto em ameaça a saúde pública.

É muito vasta a literatura sobre os agentes etiológicos causadores da mastite bovina, tendo sido relacionadas cerca de 43 espécies de microrganismos pertencentes a 25 gêneros (SANTOS & MOREIRA, 1977). Entretanto, a investigação da etiologia desta enfermidade em diversos países, tem evidenciado a predominância de bactérias do gênero *Staphylococcus* e *Streptococcus* (HARROP & cols., 1975; LANGENEGGER & cols., 1970, FERREIRO, 1980).

A primeira referência de que se tem notícia no Brasil, sobre o isolamento e identificação de bactérias consideradas como agentes etiológicos da mastite, é atribuída a SOARES FILHO (1944). Este autor, a partir de leite de vacas com mastite, isolou cepas de bactérias pertencentes ao gênero *Streptococcus*. LACERDA JÚNIOR & cols. (1954), identificaram como *Staphylococcus aureus*, as cepas isoladas de casos de mastite bovina em São Paulo. Após esta publicação tem-se verificado que este agente tem sido o microrganismo mais isolado de casos de mastite bovina nas diversas "bacias leiteiras" do país.

FIGUEIREDO (1962) LANGENEGGER & cols. (1970), FERNANDES & cols. (1973), HARROP & cols. (1975) e FERREIRO & cols. (1981), estudando amostras de leite obtidas de vacas com mastite, em "bacias leiteiras" de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Pernambuco e Minas Gerais, verificaram que o *Staphylococcus aureus* foi o patógeno mais frequentemente isolado (57,4%, 53,1%, 50,0%, 59,2% e 30,49% das amostras, respectivamente). Ainda segundo estes autores, o isolamento de cepas de *Streptococcus* sp aparecem na sequência da ordem de importân

cia causuística.

A *Escherichia coli* e o *Corynebacterium pyogenes* são outros agentes que também foram isolados de leite de vacas com mastite nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, cujos níveis de prevalência em relação a outros agentes etiológicos, situaram-se entre 0,3 e 10,0% (FERREIRO, 1978).

Atualmente o *Staphylococcus aureus* é provavelmente o agente etiológico mais frequentemente isolado das mastites bovinas em todo o mundo. Esta predominância tem ocorrido principalmente onde a terapêutica é efetuada intensivamente com penicilina e onde a ordenha manual tem sido substituída pela ordenha mecânica (HARROP & cols., 1975; BLOOD & HENDERSON, 1976; SILVA & PORTO, 1977; CORRÊA & CORRÊA, 1979; FERREIRO, 1980).

A principal fonte de infecção desta doença é representada pela vaca infectada, que ao eliminar o agente etiológico através do leite, propicia condições favoráveis para a contaminação das mãos do ordenhador, de suas roupas, dos "copos" da ordenhadeira e do meio ambiente, que podem determinar uma rápida disseminação dos microrganismos causadores de mastites a outros animais do rebanho (CORRÊA & CORRÊA, 1979).

A infecção da glândula mamária é sempre ascendente a partir do canal galactóforo, ocorrendo geralmente o desenvolvimento de inflamação, decorrente de traumatismos verificados principalmente durante a ordenha, seguida de infecção, que ocorre como um fenômeno natural. Excetua-se a esta regra a mastite tuberculosa, cujo método de disseminação pode ser por via hematôgena (TOLLE, 1971; SCHMIDT, 1971).

O diagnóstico clínico é relativamente fácil de ser efetuado em estágios avançados da doença, quando as anormalidades do leite mostram-se bastante evidenciadas, sendo ob

servada a presença de coágulos, flóculos, alterações de cor, fluidez e odor (KASTLI, 1967; FIGUEIREDO, 1962; BLOOD & HENDERSON, 1976). A presença de alteração da glândula mamária, decorrentes da substituição do tecido glandular por tecido conjuntivo, detectáveis através da palpação, facilitam em muito o diagnóstico clínico desta enfermidade (HEIDRICH & RENK, 1969).

A identificação das formas subclínicas da doença é difícil, constituindo-se em um grande problema da atualidade, devido ao elevado número destes casos (PLASTRIDGE, 1958; GIESECKE & VAN DEN HEEVER, 1974), sendo, portanto, indispensável o emprego de métodos auxiliares de diagnóstico (TOLLE, 1971).

Vários são os métodos auxiliares de diagnóstico da mastite bovina, utilizáveis tanto a nível de campo quanto a nível de laboratório, dentre os quais destacam-se:

California Mastitis Test (CMT)

SCHALM & NOORLANDER (1957), desenvolveram a prova do California Mastitis Test (CMT), idealizada para uso em larga escala a nível de campo, objetivando detectar a mastite bovina, inclusive na sua forma subclínica.

A prova do CMT fundamenta-se em três fenômenos bem conhecidos, decorrentes da mastite bovina, representados pelo aumento do número de leucócitos no leite, pelo fenômeno de Whiteside, que na expressão de seu descobridor se traduz pela formação de massa viscosa e, também, na variação do pH (FIGUEIREDO, 1962).

O reagente quando adicionado a igual volume de leite mastítico, produz inicialmente uma gelificação com subsequente aparecimento de filamentos ou flocos esbranquiçados. Esta gelificação, que aparece gradualmente, é consequente a reação do alquil-benzeno sulfato de sódio contido no de

tergente com o DNA dos leucócitos. A adição do violeta de bromocresol como indicador de pH proporciona a informação sobre a alcalinidade patológica do leite (WITTLESTONE, 1970).

A prova do CMT tem evidenciado sua eficácia, mas exige operadores bem treinados. Espelha o número total de leucócitos e polimorfonucleares do leite, sendo um bom indicador do estado sanitário do rebanho, devido a sua elevada concordância com a técnica de contagem celular, sendo mais precisa que outros métodos indiretos (DANIEL & cols., 1966; BRATTIE, 1967; ASTERMARK & cols., 1969).

A concordância da prova do CMT com a contagem leucocitária é da ordem de 90 a 99% nos casos de resultados negativos, isto é, amostras negativas ao CMT que apresentam contagens leucocitárias inferiores a 500.000 leucócitos/ml (DANIEL & cols., 1966; BRATTIE, 1967; MILLER & KEARMS, 1967). A concordância entre estas provas nos casos de resultados positivos, isto é, amostras reagentes ao CMT que apresentam contagens leucocitárias iguais ou superiores a 500.000 leucócitos/ml, é da ordem de 81,7% a 84,0% (MILLER & KEARMS, 1967; PEARSON & cols., 1970).

A concordância da prova do CMT com o exame bacteriológico, isto é, amostras positivas ao CMT em que é confirmada a mastite através da investigação bacteriológica, é da ordem de 67,4% a 85,7%, sendo esta concordância tanto maior quanto mais fortemente positiva se apresentar a reação na prova do CMT (FIGUEIREDO, 1962; LANGENEGGER & cols., 1970; HARROP & cols., 1975).

As principais vantagens atribuídas a prova do CMT, são representadas pela eficiência na detecção de transtornos individuais dos quartos da glândula mamária não perceptíveis clinicamente, pela rapidez e facilidade de execução, pelo baixo custo, quando comparados a outros métodos de diagnóstico,

pela praticabilidade e pelo pequeno número de falsos- negativos proporcionados (2,8%) (HEIDRICH & RENK, 1969; LANGENEGER & cols., 1970; HARROP & cols., 1975).

A prova do CMT apresenta como principais desvantagens: o fato de não definir exatamente o número de leucócitos no leite; a presença de resultados falsos- positivos devido a variação fisiológica do número de leucócitos observada principalmente no início e final do período de lactação; a interpretação é subjetiva no tocante a gradação da positividade (BLOOD & HENDERSON, 1976).

Prova de Whiteside

WHITESIDE (1939) comunicou que a adição de 2,0ml de solução normal de NaOH a 10,0 ml de leite mastítico, produzia uma reação caracterizada pela formação de massa viscosa. Entretanto este método era pouco satisfatório, pois apresentava resultados positivos apenas diante de leite com alterações evidenciadas macroscopicamente.

MURPHY & HANSEN (1941) modificaram a prova de Whiteside, com o intuito de detectar alterações do leite não perceptíveis macroscopicamente. Estes autores conseguiram estabelecer uma relação entre o número de leucócitos polimorfonucleares presentes no leite com a viscosidade resultante da reação entre o leite e a solução de NaOH.

O aparecimento de massa viscosa ou gelificada associada a ocorrência de grumos e estrias, verificada nesta reação, é atribuído ao aumento da permeabilidade e a lise dos leucócitos, determinada pela ação do hidróxido de sódio. A gradação da positividade desta reação, permite estimar o conteúdo leucocitário do produto (CORREIA & CORREIA, 1979).

OBIGER (1957) verificou uma elevada concordância entre a prova de Whiteside e a contagem leucocitária, cujos

percentuais foram de 86,4, 79,6 e 74,0, quando consideradas amostras oriundas dos quartos individuais, mistura dos quartos e amostras dos latões, respectivamente.

A prova de Whiteside e a prova do CMT, são as mais freqüentemente utilizadas no diagnóstico da mastite bovina, sendo consideradas práticas e eficientes. As vantagens e desvantagens atribuídas a prova de Whiteside são praticamente as mesmas da prova do CMT, uma vez que ambas fundamentam-se na estimativa do conteúdo leucocitário do leite (PLASTRIDGE, 1958; THOMPSON & POSTLE, 1974).

Contagem leucocitária

Quantidades anormais de leucócitos no leite são geralmente indicação indireta de transtornos secretórios da glândula mamária. Este fato pode ser justificado pelo aumento do número de leucócitos decorrente do mecanismo de defesa do organismo animal, diante de processos infecciosos localizados a nível de quartos glandulares (FIGUEIREDO, 1962; CORRÊA & CORRÊA, 1979).

Segundo PLASTRIDGE (1958), o leite de vacas normais raramente contém acima de 500.000 leucócitos por ml, ao contrário do que ocorre com fêmeas mastíticas, cuja contagem leucocitária é geralmente superior a este valor (TOLLE, 1971).

A concordância da contagem leucocitária com o exame bacteriológico, isto é, amostras com contagens superiores a 500.000 leucócitos/ml em que é confirmada a mastite bovina através da investigação bacteriológica, é da ordem de 87,0 a 90,0% (SINGH & BAXI, 1980). Entre as amostras com contagens inferiores a 500.000 leucócitos/ml, a mastite bovina não é confirmada através da investigação bacteriológica em cerca de 90,0 a 99,0% dos casos (SCHALM, 1957; PLASTRIDGE, 1958; BRATTIE, 1967).

Embora ocorram variações fisiológicas principalmente no início e final do período de lactação (HIPÓLITO & cols., 1965), bem como alterações determinadas pela idade da fêmea (WHITE & BLACKBURN, 1957), o método da contagem leucocitária é considerado um bom indicador da ocorrência da mastite bovina (PEARSON & cols., 1970).

Pesquisa do teor de cloretos

A pesquisa do teor de cloretos no leite é indicada como sendo um método rápido e sensível no diagnóstico da mastite bovina, tanto em sua forma clínica quanto na subclínica, pois, o aumento da concentração deste teor indica transtornos secretórios da glândula mamária (EL-NAGGAR, 1973).

Durante o processo inflamatório da glândula mamária ocorre a dilatação dos vasos sanguíneos que irrigam a área afetada, o que proporciona um aumento no volume de sangue transportado, com uma velocidade de fluxo menor. Este fato aliado ao aumento da permeabilidade dos vasos, facilita a chegada dos fluídos sanguíneos à área inflamada, atingindo consequentemente o leite. Os fluídos apresentam concentrações de sódio, potássio e cloro, semelhantes às do plasma. Assim, mesclados ao leite, que por sua vez apresenta uma composição constante destes elementos, acarreta alterações na composição iônica do produto, representadas principalmente pelo aumento de cloreto de sódio. Estas alterações tornam-se ainda mais evidentes à medida que diminui a quantidade de leite produzida (BARRY & RAWLAND, 1953; ROOK & WHELOCK, 1967).

A pesquisa do teor de cloretos é conhecida desde 1917, quando HAMMER & BAILEY descreveram um método volumétrico para a sua determinação aproximada. ROSSEL (1931) modificou a reação objetivando resultados mais precisos. HAYDEN (1932) desenvolveu um método rápido de determinação e na sua opinião, a mastite está presente quando o teor de cloretos é superior a 0,14%.

EL-NAGGAR (1973) desenvolveu uma metodologia rápida e sensível, realizável a nível de campo, capaz de diagnosticar a mastite tanto em sua forma clínica quanto subclínica. Segundo este autor, a maioria dos pesquisadores concordam em afirmar que o aumento do teor de cloretos no leite é sinal patognomônico da mastite bovina. Entretanto, HEIDRICH & RENK (1969) e CECILA (1980), afirmaram que esta pesquisa é de valor limitado, pois ocorrem consideráveis variações fisiológicas, individuais e raciais, que contribuem para a elevação do teor de cloretos, além do que, o leite normal apresenta este teor aumentado no início e final do período de lactação.

Vários autores observaram que na mastite bovina ocorre aumento de teor de cloretos no leite, quando comparado ao leite normal (SJOLLEMA & VAN DEN ZANDE, 1922; BARRY & RAWLAND, 1953; ROOK, 1961; CECIL & cols., 1965; WHELLOCK & cols., 1966; GUILLES, 1966; TAPERNOUX & cols., 1967; MULDOON & LISKI, 1971; EL-NAGGAR, 1973; NEWSTEAD, 1973; OSHIMA & cols., 1974; CHANDER & BAXI, 1975).

O teor de cloretos no leite procedente de vacas sadias e infectadas é de 0,137% e 0,192%, respectivamente (BRYAN & TROUT, 1935). Segundo NARAYANAN & IYA (1954), a concentração média do teor de cloretos no leite de vacas sadias é inferior a 0,09%, enquanto que WAHBY & NARS (1957), assinalaram uma concentração média de 0,133% (0,0939 - 0,1737%) para fêmeas não infectadas.

CHANDER & BAXI (1975) utilizando vários métodos de diagnóstico da mastite bovina, observaram que a pesquisa do teor de cloretos no leite apresentou uma concordância de apenas 52,0% com o exame bacteriológico, sendo este percentual inferior ao de todos os outros testes estudados.

NADER FILHO & MIGUEL (1981), realizaram um estudo comparativo entre as provas do CMT e pesquisa do teor de cloretos na detecção da mastite subclínica em bovinos, tendo observado uma elevada associação positiva entre ambas as provas (concordância de 80,11%). Estes autores concluíram ser indiferente o uso de uma ou de outra prova como método auxiliar de diagnóstico da mastite.

Prova de pūs

A prova de pūs, tem por objetivo avaliar a sanidade do produto a ser dado ao consumo, sendo muito utilizada a nível de estabelecimentos industriais. Nesta prova, a presença de pūs é indicada pela formação de filamentos ou grumos, resultantes da adição de amoníaco no leite. Embora esta prova seja muito difundida, pouco se conhece sobre a sua eficiência (BEHMER, 1978).

Prova da redução do azul de metileno

Segundo LOPES & cols. (1964), a prova da redução do azul de metileno adquire grande importância industrial, pois permite classificar os vários tipos de leite com simplicidade e rapidez.

A maioria dos microrganismos presentes no leite elaboram um enzima, redutase, capaz de modificar o potencial de oxi-redução do produto, descorando, assim, o azul de metileno. Sua apreciação colorométrica, portanto, permite estimar a população microbiana do leite. O tempo de redução depende do número de microrganismos presentes, sendo, portanto, estabelecida uma relação indireta (FOSTER & cols., 1975; VEISSEYRE, 1972). Entretanto, segundo LOPES & cols. (1964), há variações na capacidade redutora dos diferentes microrganismos. Alguns estreptococos causadores da mastite bovina, por exemplo, possuem a peculiaridade de não reduzir o azul de metile

leno, o qual exerce uma ação inibidora sobre os mesmos. Assim sendo, estas bactérias podem estar presentes em número elevado no leite sem que a prova da redução do azul de metileno revele este fato.

Investigação bacteriológica

A investigação bacteriológica representada pelo isolamento e identificação do agente etiológico, através de meios e provas específicas, constitui-se no método mais eficiente de diagnóstico, muito embora os resultados negativos não excluam, obrigatoriamente, a possibilidade de infecção (HIPÓLITO & cols., 1965).

Diante do exposto, depreende-se:

- que a mastite limita a exploração econômica leiteira, por causar progressiva queda na produção de leite, a medida que se propaga no rebanho, além de oferecer riscos a saúde do consumidor;
- a necessidade de maiores informações sobre os métodos auxiliares de diagnóstico, uma vez que são mencionadas controvérsias em relação a sua eficiência no diagnóstico da mastite bovina;
- a inexistência de informações sobre o comportamento das análises de rotina efetuadas pelo Serviço de Inspeção junto aos estabelecimentos industriais, no que se refere a detecção da mastite bovina a nível de plataforma de recepção;
- a necessidade de maiores informações sobre a prova da redução do azul de metileno, tendo em vista a afirmação de LOPES & cols. (1964) no

que se refere a eficiência desta prova diante de alguns estreptococos causadores da mastite bovina;

- a inexistência de informações sobre a relação existente entre a contagem padrão em placas e a prova da redução do azul de metileno, diante dos vários agentes etiológicos da mastite bovina;
- a ausência de dados sobre a prevalência desta enfermidade, bem como a distribuição dos agentes etiológicos na região do Município de Barretos/S.P.;
- que a identificação dos quartos glandulares afetados constitui uma das etapas iniciais de fundamental importância para a execução de programas de controle desta enfermidade.

Pelas razões apresentadas, cremos ter justificado a oportunidade deste trabalho, que tem por finalidade atingir os seguintes objetivos:

- Conhecer a prevalência da mastite bovina e a distribuição dos agentes etiológicos isolados entre os rebanhos leiteiros das propriedades produtoras de leite tipo B, localizadas na região do Município de Barretos/SP.
- Conhecer a capacidade de detecção da mastite bovina das provas: pesquisa do teor de cloretos, prova de Whiteside e a pesquisa de pūs, realizadas nos estabelecimentos industriais.

- Verificar a relação existente entre a contagem padrão em placas e a prova da redução do azul de metileno, considerando-se os vários agentes etiológicos.
- Verificar o comportamento dos agentes etiológicos da mastite bovina, diante da prova da redução do azul de metileno.
- Verificar a relação existente entre o "California Mastitis test", contagem leucocitária e pesquisa do teor de cloretos com o exame bacteriológico.

2.- MATERIAL E MÉTODOS

Foram submetidos a prova do "California Mastitis Test" (CMT), 468 vacas leiteiras pertencentes a seis propriedades rurais produtoras de leite tipo B, localizadas na região do Município de Barretos/SP. Após a colheita de amostras de leite das fêmeas reagentes, efetuou-se a pesquisa do teor de cloretos, a contagem leucocitária e o isolamento e identificação do agente etiológico, com o intuito de conhecer a prevalência da doença nesta região, a distribuição dos agentes etiológicos e de analisar comparativamente a eficiência destas provas no diagnóstico da mastite bovina. Realizou-se, ainda, a contagem padrão em placas e a prova da redução, a fim de verificar a relação existente entre ambas as provas e de conhecer o comportamento dos agentes etiológicos isolados, diante da prova da redutase.

Simultaneamente, o leite de conjunto de cada pro

priedade, contendo inclusive o produto das fêmeas reagentes ao CMT, foi submetido a pesquisa do teor de cloretos, a prova de Whitiside e a pesquisa de pus, com o intuito de conhecer a eficiência destas provas na detecção da mastite bovina, a nível de estabelecimentos industriais. Efetuou-se, ainda, as análises de rotina do Serviço de Inspeção, representadas pela acidez, densidade, teor de gordura, extrato seco total, extrato seco desengordurado, ponto crioscópio, redução e contagem padrão em placas, com o objetivo de comparar com os padrões estabelecidos pelo Ministério da Agricultura. Estes procedimentos são apresentados detalhadamente a seguir:

Propriedade rurais

Foram estudadas seis propriedades rurais produtoras de leite tipo B, localizadas na região do Município de Barretos, Estado de São Paulo, as quais correspondiam a totalidade dos estabelecimentos produtores deste tipo de leite na referida região.

Características da população bovina

Os rebanhos eram constituídos, em sua grande maioria, por animais da raça holandesa variedades preta e branca e vermelha e branca, sendo verificada a presença de animais da raça pitangueiras em apenas uma das propriedades visitadas. Em todas as fazendas adotava-se o sistema de ordenha mecânica, realizada duas vezes ao dia, cuja produção média diária situava-se em torno de 9,5 litros por vaca.

Amostras de leite

Durante o período de agosto a outubro de 1982 ,

468 vacas leiteiras foram submetidas ao "California Mastitis Test"(SCHALM & NOORLANDER, 1957), com o intuito de verificar a prevalência da mastite bovina nas propriedades rurais localizadas na região em estudo. A escolha destes animais era efetuada ao acaso, sendo analisadas cerca de 60% das fêmeas lactantes em cada fazenda.

Diante dos resultados positivos ou suspeitos, colhia-se em tubos de ensaio esterilizados, 50,0 ml de leite dos quartos reagentes, obedecendo-se as normas de assepsia (VEISSEYRE, 1972). Em seguida, as amostras eram acondicionadas em caixa de material isotérmico ("isopor"), contendo cubos de gelo, sendo transportadas para o laboratório do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal-UNESP.

No referido laboratório, as amostras eram submetidas a contagem padrão em placas e a prova da redutase (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1981), a fim de verificar a relação existente entre ambas as provas. Em seguida, efetuava-se a pesquisa do teor de cloretos (EL-NAGGAR, 1973), contagem leucocitária (SUBCOMMITTEE on Screening Test National Mastitis Council, 1968) e o isolamento e identificação do possível agente etiológico, com o objetivo de confirmar a presença do processo infeccioso entre as fêmeas reagentes a prova do CMT.

Simultaneamente, o leite de conjunto de cada propriedade, contendo inclusive o produto das fêmeas reagentes, era analisado no laboratório do Lactcinio Flor da Nata Ltda, localizado em Barretos/SP, (SIF nº 2186) de modo que a partida de leite analisado contivesse o produto da ordenha por nós estudada. A coleta de amostras era efetuada de acordo com a rotina do Serviço de Inspeção do Ministério da Agricultura, ou seja, uma mistura de todos os latões procedentes da pro

priedade considerada.

A determinação da densidade, teor de gordura, acidez, extrato seco total, extrato seco desengordurado, ponto crioscópico, redutase e contagem padrão em placas (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1981), era realizada com o intuito de comparar com os padrões estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, enquanto que a prova de Whiteside, pesquisa de pus, e a pesquisa do teor de cloretos (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1981), eram efetuadas com a finalidade de determinar a sensibilidade e a especificidade em relação a mastite bovina prevalente em cada propriedade.

Posteriormente, iniciou-se uma nova etapa, com o objetivo de verificar o comportamento dos agentes etiológicos isolados na fase anterior, diante da prova da redução do azul de metileno. Selecionaram-se 10 (dez) fêmeas negativas ao CMT, das quais colheram-se 100,0 ml de leite de cada uma, em frascos esterilizados, observando-se os mesmos cuidados de assepsia e transporte já mencionados.

As amostras eram submetidas a contagem padrão em placas e a prova da redução do azul de metileno (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1981). Em seguida, cada amostra era fracionada em 2 (duas) sub-amostras com cerca de 50,0 ml cada, sendo formado desta forma, dois grupos, contendo cada um, 10 (dez) sub-amostras.

As amostras do primeiro grupo eram submetidas ao processo de autoclavação em vapor fluente durante 20 minutos. Em seguida, 7 (sete) delas foram inoculadas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysagalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*, respectivamente. As 3 (três) sub-amostras restantes, também foram inoculadas com *Streptococcus dysagalactiae*, *Streptococcus agalactiae*,

e *Streptococcus uberis* respectivamente. O inóculo consistiu de 3 (três) alçadas de cultura desses agentes, sendo estas sub-amostras mantidas a 32°C por 3 (três) horas. Decorrido este intervalo de tempo, efetuava-se a contagem padrão de placas e a prova da redução do azul de metileno (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1981).

O tratamento dispensado às sub-amostras do segundo grupo, diferia do anterior, apenas no fato do leite não ser submetido previamente a tratamento térmico. Assim, os demais passos representados pela inoculação do agente, temperatura e tempo de incubação, contagem padrão em placas, e prova da redução do azul de metileno, foram conduzidos de forma idêntica (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1981).

Técnicas

California Mastitis Test (CMT

De acordo com a técnica proposta por SCHAM & NOORLANDER (1957), desprezavam-se os três primeiros "jatos" de leite, sendo as amostras obtidas diretamente do úbere em uma bandeja plástica apropriada, contendo quatro "bocais" ou "copos" distintos.

Colhiam-se cerca de 2,0ml de leite de cada quarto da glandula mamária nos respectivos "copos", aos quais adicionava-se igual quantidade de reagente (Solução CMT - FATEC*). Após a execução de movimentos circulares e uniformes imprimidos à bandeja, realizava-se a leitura

(*) Solução CMT-FATEC/ Fórmula

Violeta de bromocresol	-----0,02%
Alquil-benzeno-sulfato de sódio	-----1,34%
Veículo Q.S.Q	-----100,00%

A interpretação do resultado da prova baseava-se na seguinte convenção: negativo (-), suspeitos ou traços (T), fracamente positivos (+), distintamente positivos (++) e fortemente positivos (+++), em função do aparecimento ou não de gel e alteração do pH, esta última evidenciada pelo indicador violeta de bromocresol, contido no reagente (HIPÓLITO & col., 1965).

Pesquisa do teor de cloretos

De acordo com a técnica proposta por EL-NAGGAR (1973), adicionavam-se em um tubo de ensaio, 0,5 ml de leite 5,0 ml de solução de nitrato de prata a 0,134% e 3 gotas de solução de cromato de potássio a 10,0%. Após a agitação efetivava-se a leitura do resultado, sendo consideradas positivas as amostras que apresentavam coloração entre o bege e o amarelo canário, e negativas as que revelavam coloração entre o vermelho tijolo e o marrom claro.

Deve-se assinalar que esta técnica proposta por EL-NAGGAR (1973), foi aplicada apenas às amostras que apresentavam positividade ou suspeição ante a prova do CMT, e foram realizadas no laboratório do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FCAVJ/UNESP.

Por outro lado, o leite de conjunto da propriedade, também era submetido a pesquisa do teor de cloretos, no laboratório do Lactícinio Flor da Nata. Entretanto, a técnica adotada pelo Ministério da Agricultura, diferia daquela empregada no laboratório do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FCAVJ/UNESP, embora o fundamento da prova fosse o mesmo. Assim sendo, utilizavam-se

10,0 ml de leite, aos quais adicionavam-se 4,5 ml de solução de nitrato de prata 0,1N e 8 a 10 gotas de solução de cromato de potássio a 10,0%. Após a agitação efetuava-se a leitura, de modo indêntico a técnica proposta por EL-NAGGAR(1973).

Contagem padrão em placas

Para a execução desta prova, após a homogeneinização de amostras de leite, preparavam-se diluições de 10^{-1} até 10^{-5} , empregando-se como diluente solução salina a 0,85%. Em seguida, 1,0 ml de cada diluição era colocado em placas de Petri esterilizadas, em duplicatas, vertendo-se a seguir cerca de 10,0 ml de agar padrão (Difco-B0-479), previamente fundido e resfriado a 43/45°C.

Após a homogeneinização e solidificação em temperatura ambiente, as placas eram incubadas em estufa a 32°C por 48 horas, quando efetuava-se a contagem de colônias. O número de colônias contados em cada placa, contendo entre 30 e 300 colônias, era multiplicado pela respectiva da diluição correspondente e o resultado obtido expressava o número de microrganismos mesófilos aeróbios ou facultativos, viáveis por ml de leite.(MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1981).

Prova de redução do azul de metileno

De acordo com a técnica adotada pelo Ministério da Agricultura (1981), preparava-se uma solução de "estoque" de azul de metileno, dissolvendo-se 1,1 g de corante seco em 500 ml de água destilada, sendo esta solução mantida em frasco escuro.

Para a realização desta prova, a cada 1,0 ml de solução de "estoque" adicionavam-se 39,0 ml de água destilada.

Em seguida, 1,0 ml desta solução era adicionada a 10,0 ml da amostra a ser analisada. A incubação era efetuada em banho - maria a 37°C, até o momento da descoloração, quando então registrava-se o tempo decorrido para a viragem da cor azul para a branca.

Contagem leucocitária

A contagem de células somáticas no leite, foi efetuada através de microscopia direta, de acordo com a técnica proposta pelo SUBCOMMITTEE on Screening Tests National Council, (1968), a qual é uma modificação da técnica proposta por BREED (1910).

Para a execução desta prova, espalhava-se 0,01 ml da amostra de leite sobre a câmara de Neubauer, numa área circular de 1 cm². Após a secagem, o esfregaço era corado pelo método de Newman e, em seguida, usando-se a objetiva de imersão, efetuava-se a contagem de todas as células somáticas nucleadas presentes na unidade da área examinada.

Determinação da densidade

De acordo com a técnica recomendada pelo MINISTÉRIO DA AGRICULTURA (1981), vertiam-se cerca de 200 ml de leite em uma proveta, cuja capacidade era de 250 ml, tendo-se o cuidado de evitar a formação de espuma.

Em seguida, mergulhava-se o termolactodensímetro, sendo a leitura da densidade efetuada a altura do nível do leite. Simultaneamente, anotava-se a temperatura observada na escala superior do aparelho. Caso esta temperatura fosse diferente de 15°C, efetuava-se a correção do valor da densidade através do uso de tabela apropriada.

Determinação do teor de gordura

A determinação do teor de gordura foi realizada através do Butirômetro de Gerber, ao qual juntavam-se 10,0 ml de ácido sulfúrico ($D=1,820$), 11,0 ml de leite e 1,0 ml de álcool amílico ($D=0,815$). Após a homogeneização, esta mistura era submetida a centrifugação (800/1200 rpm) durante 3 a 5 minutos.

O percentual de gordura da amostra de leite examinada, correspondia ao percentual da camada gordurosa verificada na escala do aparelho.

Determinação do extrato seco total

De acordo com a técnica recomendada pelo MINISTÉRIO DA AGRICULTURA (1981), a determinação do extrato seco total foi realizada através do calculador de Ackermann. O referido calculador é constituído por dois discos superpostos, sendo um móvel, com graduações correspondentes a densidade, e o outro fixo, onde são encontradas duas ordens de graduações; a primeira, mais interna, denota o percentual de gordura, enquanto que a segunda, mais externa, mostra o extrato seco total.

Para a determinação do extrato seco total, fazia-se coincidir o valor da densidade com o valor do teor de gordura obtido. Assim, o ponteiro indicador existente no primeiro disco, apontava o valor do extrato seco total.

Determinação do extrato seco desengordurado

A determinação do extrato seco desengordurado, era realizada através de subtração do teor de gordura, obtido pelo método de Gerber, do extrato seco total, obtido pelo calculador de Ackermann (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1981).

Determinação da acidez

A determinação de acidez foi realizada através do método de Dornic. Assim, em um erlemeyer juntavam-se 10,0 ml de leite e 3 a 5 gotas de solução de fenolftaleína (2,0%). Paralelamente, em uma bureta graduada de 25 ml, colocavam-se 25 ml de solução de Hidróxido de sódio (N/9).

Para a titulação gotejava-se a solução (NaOH/9) ao leite contendo fenolftaleína até o aparecimento de ligeira tonalidade rosa, sendo anotada a quantidade de soda Dornic gasta durante o processo. Este número multiplicado por 10, correspondia ao grau de acidez da amostra analisada (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1981).

Determinação do ponto crioscópico

A determinação do ponto crioscópico do leite foi realizada através de Lactocrioscópico. Assim, adicionavam-se cerca de 10,0 ml de leite em tubo de ensaio apropriado, sendo este, imediatamente colocado no interior da cuba constituinte do aparelho, a qual apresentava uma temperatura em torno de -5°C , obtida através da mistura de gelo e cloreto de sódio.

O tubo de ensaio contendo a amostra de leite, era acoplado a um termômetro especial de mercúrio, cuja graduação era em centésimos de grau. Através de uma haste, efetuava-se contínua agitação da amostra, até o ponto de congelamento, verificado pela estabilização da coluna de mercúrio (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1981).

Isolamento e identificação dos possíveis agentes etiológicos

Bactérias do gênero *Staphylococcus*

No isolamento de bactérias pertencentes a este gênero, eram utilizados o ágar *Staphylococcus* 110 (Difco) e o ágar Baird-Parker (Oxoid), recomendados pela AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (1976). As amostras de leite eram semeadas nestes meios, seguindo-se a técnica proposta por DEMETER (1969). Assim, adicionavam-se 10,0 ml de leite em tubos de forma cônica (17x108 mm) e centrifugava-se a 3000 rpm por 10 minutos. Em seguida, desprezava-se o sobrenadante e, com alça de níquel-cromo, semeava-se o sedimento na superfície dos referidos meios, empregando-se a técnica de esgotamento, sendo as placas incubadas a 37°C por 24/48 horas.

Após a incubação, havendo crescimento de colônias com coloração amarelada ou branca no ágar *Staphylococcus* 110, algumas delas eram submetidas a verificação microscópica em esfregaços corados pelo método de Gram. Das colônias que se revelassem com cocos Gram-positivos em cachos, eram isoladas até duas de cada uma, as quais eram semeadas em ágar nutriente inclinado. No local da retirada da colônia, gotava-se solução de azul de bromo-timol a 0,04% e deixava-se a placa em repouso por 10 minutos. O aparecimento de coloração amarelada, indicava ser a prova do manitol positiva, enquanto que a cor esverdeada, denotava prova de manitol negativa. Em seguida, vertiam-se 5,0 ml da solução aquosa de sulfato de amônia saturada sobre a superfície do meio sendo a placa, a seguir, mantida durante 10 minutos em estufa a 37°C. O aparecimento da zona transparente ao redor da colônia indicava prova positiva para a produção da gelatinase.

As colônias que em ágar Baird-Parker se apresentassem com coloração negra circundadas por uma zona transparente, eram também submetidas a verificação microscópica em esfregaços corados pelo método de Gram. Das colônias que se revelassem com cocos Gram-positivos em cachos, duas eram isoladas e semeadas em ágar nutriente inclinado.

Os tubos de ensaio contendo agar nutriente inclinado semeados com as colônias isoladas de ambos os meios, eram incubadas a 37°C por 24-48 horas. Após a incubação, era realizado um repique de cada cepa para ágar nutriente inclinado e depois conservado em refrigerador a 4°C, para sua manutenção.

A partir dos outros tubos, realizavam-se as provas de catalase (HARRIGAN & McCANGE, 1969), oxidação e fermentação (O-F) da glicose, coagulase, DNase (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1976), utilização do manitol e hemólise (BLAIR & cols., 1971) e da lecitinase (ITO & cols., 1969) que serão apresentadas detalhadamente a seguir.

Prova da catalase

Para a execução desta prova, as cepas isoladas eram semeadas em caldo de infusão de cérebro e coração (Difco) e, a seguir, incubada a 37°C por 24-48 horas. Posteriormente, a cada tubo adicionava-se 1,0 ml de solução de água oxigenada a 3% e efetuava-se a leitura, sendo a prova considerada positiva quando ocorria o despreendimento de bolhas. Paralelamente, eram realizadas as provas controles positiva e negativa, empregando-se culturas de *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus faecalis*, respectivamente (HARRIGAN & McCANCE, 1969).

Prova de oxidação e fermentação da glicose (O-F)

As cepas isoladas eram semeadas no meio para a prova da O-F, por picada, usando fio longo, de modo que o inóculo atingisse o fundo do tubo. Cada cepa era semeada em dois tubos de ensaio contendo o referido meio, sendo que em um deles, a superfície era coberta com vaselina líquida esteril. Havendo a produção de ácido em toda a extensão do meio em ambos os tubos, ou seja, provas de oxidação e de fermentação positivas, o microrganismo era classificado como sendo do gênero *Staphylococcus*. A acidificação era evidenciada pela viragem de cor do indicador do verde para o amarelo (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1976).

Prova da coagulase livre

Para a execução desta prova, as cepas isoladas eram semeadas em caldo de infusão de cérebro e coração (Difco) e, incubadas a 37°C por 24-48 horas. Posteriormente, em tubos de ensaio (10x70 mm), juntavam-se 0,25 ml desta cultura a 0,5 ml de plasma de coelho citratado (diluído a 1:5 em solução fisiológica a 0,85%). Após a agitação, os tubos eram incubados a 37°C, sendo as leituras realizadas após 1, 2, 4 e 24 horas. O resultado era considerado positivo quando ocorria a coagulação do plasma. Simultaneamente eram realizadas provas controles positiva e negativa, empregando-se culturas de *Staphylococcus aureus* e de *Staphylococcus epidermidis*, respectivamente. (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1976).

Prova da desoxirribonuclease (DNase)

A prova da DNase era realizada a partir de culturas de 24 horas em caldo de infusão de cérebro e coração (Difco) a 37°C. A semeadura era efetuada em estria curta, na superfície do ágar DNase (Oxoid), em placas, sendo estas, a

seguir, incubadas por 24 horas a 37°C. Após a incubação, a superfície do meio era banhada com solução de ácido clorídrico N/1. A prova era considerada positiva, quando ocorria o aparecimento de zona clara em torno da sementeira, indicando deste modo, a despolimerização do ácido desoxirribonucleico em decorrência da ação desoxirribonuclease produzida durante o crescimento bacteriano (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1976).

Utilização do manitol

Para a execução desta prova, as cepas isoladas eram semeadas em estria em placa contendo ágar manitol salgado (Difco), sendo estas, a seguir, incubadas a 37°C por 24 horas. A prova era considerada positiva, quando ao redor do crescimento bacteriano, o meio apresentava coloração amarela, determinada pela viragem do indicador vermelho de fenol, acusando deste modo, a produção de ácido a partir da utilização do manitol (BLAIR & cols., 1971).

Verificação da hemólise

As cepas isoladas eram semeadas, em estria, na superfície do ágar sangue (Difco), em placas, sendo estas, a seguir, incubadas a 37°C por 24 horas. A prova era considerada positiva, quando ao redor das colônias, desenvolvia-se um halo de hemólise (BLAIR & cols., 1971).

Prova da lecitinase

O teste de atividade lecitinásica (produção de lecitinase) era efetuada em ágar NI, adicionado de gema de ovo (ITO & cols., 1969). Após a sementeira em estria, em placas, estas eram incubadas a 37°C por 24 horas. A prova para produção de lecitinase era considerada positiva, quando ocorria uma zona de opalescência ao redor da sementeira. Quando após 24 horas

de incubação a prova era negativa, as placas eram reincubadas por mais 24 horas a 37°C, após o que efetuava-se a leitura final.

Com a realização destas provas, as cepas isoladas podiam ser classificadas como pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, porém para serem consideradas como sendo da espécie *S. aureus*, levava-se em consideração, fundamentalmente, a prova positiva para produção de coagulase (SPERBER & TATTINI, 1975). As que se apresentavam negativamente a esta prova, poderiam pertencer as espécies *S. epidermidis* ou *S. saprophyticus*.

Bacterias do gênero *Streptococcus*

No isolamento de bactérias pertencentes a este gênero, eram utilizados o meio de Edwards (Oxoid) e o ágar sangue azida (Difco), recomendados pela AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (1976). As amostras de leite eram semeadas nestes meios, seguindo-se a técnica proposta por DEMETER (1969), sendo as placas incubadas a 37°C por 24-48 horas.

Após a incubação, havendo o crescimento de colônias puntiformes com ou sem halo de hemólise, eram também submetidas a verificação microscópica em esfregaços corados pelo método de Gram. Das colônias que se revelassem com cocos Gram-positivos em cadeias, eram isoladas até duas de cada uma (hemolítica e não hemolítica), as quais eram semeadas em ágar nutriente inclinado, sendo estes, a seguir, incubados a 37°C por 24-48 horas.

A partir destes tubos, realizavam-se as provas da catalase (HARRIGAN & McCANCE, 1969), da verificação do crescimento a 10°C e 45°C (FOSTER & cols., 1969), de hemólise (BLAIR & cols., 1971), da hidrólise da esculina e do hipurato de sódio, do CAMP-Test (DEMETER, 1969) e da utilização de carbohi-

dratos e alcoois, representados pela rafinose, arabinose, maltose, sacarose, salicina, lactose, trealose, inulina, glicerina, manitol, sorbitol e amido (DEMETER, 1969; AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1976). Estas provas serão apresentadas detalhadamente a seguir.

Prova catalase

Para a execução desta prova, adotava-se a técnica proposta por HARRIGAN & McCANCE (1969), descrita no isolamento e identificação das bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus*.

Verificação do crescimento a 10°C e 45°C

Cada cepa isolada era semeada em dois tubos de ensaio contendo caldo de infusão de cérebro e coração (Difco), os quais eram incubados a 10°C e 45°C, respectivamente, durante 24-48 horas. Após a incubação, efetuava-se a leitura, sendo a prova considerada positiva quando ocorria a turvação do caldo, cujo crescimento era comprovado pela verificação microscópica em esfregaços corados pelo método de Gram. Simultaneamente eram realizadas provas de controle negativa, empregando-se tubos de ensaio contendo caldo de infusão de cérebro e coração sem inóculo (FOSTER & cols., 1969).

Verificação da hemólise

As cepas isoladas eram semeadas, em estria, na superfície de ágar sangue (Difco), em placas, sendo estas, a seguir, incubadas a 37°C por 24 horas em atmosfera de CO₂. A hemólise era considerada como sendo do tipo alfa, quando ao redor das colônias, desenvolvia-se um halo de hemólise parcial, procurando-se constatar, também, a viridescência, através da presença de coloração esverdeada no referido halo. A hemólise era considerada como sendo do tipo beta hemolítico, quando ao redor das colônias, desenvolvia um halo de

hemólise total, com evidente clareamento do sangue. Eram considerados como sendo do tipo gama ou inerte, quando, ao redor das colônias, havia ausência de hemólise (BLAIR & cols., 1971).

Hidrólise da esculina

Para a execução desta prova, as cepas eram semeadas em caldo extrato de carne (Merck) e, incubadas a 37°C por 4 dias. Após a incubação, adicionava-se 1,0 ml de solução de cloreto fêrrico a 7%, agitava-se e efetuava-se a leitura. A prova era considerada positiva, quando ocorria o aparecimento de um precipitado negro esverdeado, e, negativa, quando o meio apresentava coloração amarelada (DEMETER, 1969).

Hidrólise do hipurato de sódio

As cepas isoladas eram semeadas em caldo simples contendo 1% de hipurato de sódio e, incubadas a 37°C por 4 dias. Após a incubação, juntava-se em um tubo de ensaio, 1,0 ml de sobrenadante destas culturas a 0,3 ml de solução de cloreto fêrrico (12 g. de cloreto fêrrico, 0,25 ml de ácido clorídrico concentrado e 100,0 ml de água destilada). Após a agitação desta mistura, efetuava-se a leitura da prova, sendo considerada positiva quando ocorria o aparecimento de um precipitado marron escuro e, negativa quando o meio não apresentava turvação ou precipitação (DEMETER, 1969).

CAMP-test

Para a execução desta prova era utilizado o meio de Edwards (Oxoid), recomendada por DEMETER (1969). Assim, semeava-se, inicialmente, no centro da placa, uma estria longitudinal de cultura de uma cepa de *Staphylococcus aureus* produtora de beta toxina. Em seguida, semeava-se perpendicularmente a esta estria, as cepas a serem testadas, tendo-se o

cuidado de não junta-las à linha de inoculação do *Staphylococcus aureus*, sendo mantida uma distância de pelo menos 2 mm. Posteriormente, as placas eram incubadas a 37°C por 24 horas em atmosfera de CO₂.

Após a incubação, efetuava-se a leitura, observando-se as características de zona hemolítica desenvolvida, principalmente na extremidade da estria perpendicular, próximo da estria longitudinal. Era considerada como sendo de *Streptococcus agalactiae*, as cepas das estrias perpendiculares que apresentavam formação de zona hemolítica cuneiforme (em forma de pã). Eram consideradas como sendo *Streptococcus uberis*, as cepas que apresentavam formação de uma zona hemolítica em forma quadrada (ou de enxadão); por outro lado eram tidas como sendo de *Streptococcus dysagalactiae*, as cepas que apresentavam formação de uma zona hemolítica, também em forma de enxadão, porém, muito mais tênue que a observada para as cepas de *S. uberis*. (DEMETER, 1969).

Fermentação de carboidratos e alcoois

Para a execução desta prova, era utilizado o caldo base com vermelho de fenol (Difco), dividido em aliquotas, adicionadas dos diversos carboidratos e álcoois estudados, representados pela arabinose, maltose, sacarose, lactose, trealose, rafinose, inulina, glicerina, manitol, sorbitol, salicina e amido (DEMETER, 1969; AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1976).

As cepas isoladas eram semeadas em caldo infusão de cérebro e coração (Difco) e, incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, a partir destas culturas, eram semeadas em tubos correspondentes aos diferentes carboidratos e álcoois, sendo estes incubados a 37°C por 24 horas. Após a incubação, realizava-se a leitura, sendo a prova considerada positiva quando

ocorria a viragem de cor do indicador do vermelho para o amarelo. Simultaneamente eram realizadas provas de controle negativa, empregando-se tubos de ensaio contendo os respectivos meios não inoculados.

Diante da realização destas provas, eram identificadas como sendo *Streptococcus dysagalactiae*, as cepas que apresentavam resultados positivos nas provas de fermentação da sacarose, maltose, trealose e do amido, assim sendo, resultados negativos nas provas de verificação de crescimento a 10°C e 45°C, da hidrólise da esculina e do hipurato de sódio, da catalase da fermentação da arabinose, rafinose, inulina, manitol, sorbitol e salicina, e que apresentavam formação de zona hemolítica característica no CAMP-test e hemólise do tipo alfa em ágar sangue (DEMETER, 1969).

Eram identificadas como sendo de *Streptococcus agalactiae*, as cepas que apresentavam resultados positivos nas provas de fermentação da maltose, sacarose, lactose, trealose, salicina, amido e da hidrólise de sódio, assim como, resultados negativos nas provas de crescimento a 10°C e 45°C da hidrólise da esculina, da catalase, de fermentação da arabinose, rafinose, inulina, glicerina, manitol e do sorbitol, e que apresentavam formação de zona hemolítica característica no CAMP-test (DEMETER, 1969).

Eram identificadas como sendo de *Streptococcus uberis*, as cepas que apresentavam resultados positivos nas provas de fermentação da maltose, sacarose, lactose, trealose, salicina, amido e da hidrólise do hipurato de sódio e da esculina, assim como, resultados negativos nas provas de verificação do crescimento a 10°C e 45°C, da catalase, da fermentação da arabinose, rafinose, inulina e do amido e, que apresentavam formação de zona hemolítica característica no

CAMP-test e hemólise do tipo alfa em ágar sangue (DEMETER , 1969).

Eram identificados como sendo *Streptococcus pyogenes*, as cepas que apresentavam resultados positivos nas provas de fermentação da maltose, sacarose, lactose, trealose e salicina, assim como, resultados negativos nas provas de verificação do crescimento a 10°C e 45°C, da catalase, da hidrólise da esculina e do hipurato de sódio, de fermentação da arabinose, rafinose, inulina, glicerina, manitol, sorbitol e amido e, que apresentavam hemólise do tipo beta em ágar sangue (DEMETER, 1969).

Escherichia coli

No isolamento desta bactéria, eram utilizados o ágar eosina azul de metileno (Oxoid) e o ágar MacConkey (Oxoid), recomendados pela AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (1976). As amostras de leite eram semeadas nestes meios, seguindo-se a técnica recomendada por DEMETER (1969), sendo as placas incubadas a 37°C por 24-48 horas.

Após a incubação, havendo o crescimento de colônias com centro escuro e brilho verde metálico no ágar eosina azul de metileno, algumas delas eram submetidas a verificação microscópica em esfregaços corados pelo método de Gram. Das colônias que se revelavam com bacilos Gram-negativos, duas eram semeadas em ágar nutriente.

As colônias que em ágar MacConkey se apresentassem com coloração rosada e aspecto mucóide, eram também submetidas a verificação microscópica em esfregaços corados pelo método de Gram. Das colônias que se revelavam com bacilos Gram-negativos, duas eram semeadas em ágar nutriente inclinado.

Os tubos de ensaio contendo ágar nutriente inclinado semeados com colônias isoladas de ambos os meios, eram incubados a 37°C por 24-48 horas. Apos a incubação, era realizado um repique de cada cepa para ágar nutriente inclinado, que apos a incubação a 37°C por 24-48 horas, era conservado em refrigerador a 4°C, para sua manutenção.

A partir dos outros tubos, as cepas isoladas eram emeadas no meio IAL (Instituto Adolfo Lutz), recomendado por PESSOA & SILVA (1974) e, incubadas a 37°C por 24 horas. Apos a incubação, efetuava-se a leitura das propriedades bioquímicas pesquisadas neste meio. Assim, eram selecionadas as cepas que apresentavam resultados positivos nas provas do indol e da fermentação da glicose com produção de gás e, negativos nas provas da desaminação do L-triptofano da produção de H₂S e da hidrolise da urêia.

Posteriormente, as cepas isoladas eram submetidas a várias outras provas bioquímicas de identificação. Assim, eram confirmadas como sendo de *Escherichia coli*, as cepas que apresentavam resultados positivos nas provas de indol, de vermelho de metila, da fermentação do manitol, da produção de Beta-galactosidase e Beta-xilosidase e, negativos nas provas de Voges Proskauer, do aproveitamento do citrato de Simmons, da fermentação do adonitol, inositol e rafinose, da utilização do molonato, da produção da urease, gelatinase e desaminase da Fenil-alanina e de crescimento em KCN.

Corynebacterium pyogenes

No isolamento desta bactéria, eram utilizados o meio de Loeffler (Difco) em tubos e o ágar com dextrose- proteose nº 3 adicionado de sangue e télurito de potássio (Difco) em placas. As amostras de leite eram semeadas nestes meios, seguindo-se a técnica proposta por DEMETER (1969). A seguir,

os tubos e as placas semeados eram incubados a 37°C por 24 horas em atmosfera de CO₂.

Após a incubação, caso houvesse crescimento em meio de Loeffler e formação de colônias granulosas com coloração cinza ou negra no ágar dextrose-proteose nº 3 adicionado de sangue e telurito de potássio, seria realizada a verificação microscópica em esfregaços corados pelo método de Gram. Caso fosse detectada a presença de bacilos Gram-positivos com extremidades entumecidas (em forma de clava) e agrupamentos característicos em forma de letras chinesas, proceder-se-ia o isolamento de colônias e sua semeadura em meio de Loeffler, seguido de incubação a 37°C por 24 horas em atmosfera de CO₂.

Poderia ocorrer o caso de haver crescimento em meio de Loeffler, porém não em placa contendo meio de isolamento. Neste caso, se fosse constatada a presença, no meio de Loeffler de bactérias com as características referidas, partindo-se desta cultura, proceder-se-ia a semeadura em placa, para realização do isolamento de colônias.

Após a incubação, seria realizada a identificação das cepas isoladas, através das provas da catalase (BUCHANAN & GIBBONS, 1974), do leite tornasolado (PREVOT & FREDETTE, 1966) e da fermentação da dextrose, sacarose, maltose, trealose e lactose (BUCHANAN E GIBBONS, 1974).

Seriam identificadas como sendo *Corynebacterium pyogenes* as cepas que apresentassem resultados positivos na fermentação da dextrose, maltose e trealose e, negativos nas provas da catalase, do leite tornasolado e da fermentação da sacarose e lactose (COLLINS, 1969).

Salienta-se que para nenhuma amostra analisada foi observado crescimento em meio de Loeffler e nem a presença de colônias em ágar dextrose-proteose nº 3 adicionado de san

que e telurito de potássio, que apresentassem as características do gênero *Corynebacterium*.

Meios de cultivo utilizados e seu preparo

Os meios de cultivo utilizados, assim como seu preparo, são apresentados detalhadamente nos Anexos.

3.- RESULTADOS

Os dados inseridos nas TABELAS 1 a 11, referem-se a ocorrência de mastite subclínica, uma vez que nas seis propriedades estudadas, não foram constatadas, ao exame clínico, a presença de fêmeas doentes.

A TABELA 1 mostra a distribuição das fêmeas positivas, suspeitas e negativas à prova do CMT, segundo os rebanhos produtores de leite tipo B, estudados na região do Município de Barretos, São Paulo. Observa-se que das 468 fêmeas submetidas à prova do CMT, 44 (9,4%) foram positivas, 12 (2,6%) suspeitas e 412 (88,0%) negativas.

A TABELA 2 mostra a prevalência da mastite bovina nos seis rebanhos produtores de leite tipo B, na região do Município de Barretos, São Paulo, segundo o número de fêmeas e quartos analisados. O exame bacteriológico efetuado nas amostras de leite das 56 fêmeas reagentes (positivas e suspeitas) a

prova do CMT, revelou que a prevalência da mastite bovina na região em estudo foi de 10,3%, tendo variado entre 6,3% (rebanho F) e 20,0% (rebanho B).

A TABELA 3 mostra a distribuição das amostras positivas ao exame bacteriológico, segundo a localização do quarto afetado, nos rebanhos produtores de leite tipo B, estudados na região do Município de Barretos, São Paulo. Os dados desta tabela mostram maior ocorrência de casos (31,3%) no quarto anterior direito. Entretanto, a aplicação do teste de dupla proporcionalidade aos valores desta tabela, evidenciou ser não significativa esta variação.

A TABELA 4 mostra a distribuição do número de quartos positivos e negativos ao exame bacteriológico, e dos quartos "perdidos", segundo os rebanhos produtores de leite tipo B, estudados na região do Município de Barretos, São Paulo. Observa-se que o número de quartos "perdidos" variou entre 0,3% (rebanho F) e 3,7% (rebanho C), de modo que o percentual da região em estudo foi de 1.9.

Para melhor ilustrar os resultados obtidos na prova do CMT, contagem leucocitária e pesquisa do teor de cloretos, analisados comparativamente entre si e em relação ao exame bacteriológico, constituiu-se as TABELAS de 5 a 10.

A TABELA 5 mostra a comparação dos resultados obtidos na prova do CMT com os do exame bacteriológico no diagnóstico da mastite bovina, e determinação de percentual da concordância, nos rebanhos produtores de leite tipo B, estudados na região do Município de Barretos, São Paulo. O percentual de concordância estabelecido para ambas as provas foi de 85,71, tendo variado entre 58,33% (reações suspeitas ou traços) e 100,00% (reações fortemente positivas).

A TABELA 6 mostra a comparação dos resultados ob

tidos na prova do CMT com os da contagem leucocitária no diagnóstico da mastite bovina, e determinação do percentual de concordância, nos rebanhos produtores de leite tipo B, estudados na região do Município de Barretos, São Paulo. O percentual de concordância estabelecido para ambas as provas foi de 83,93, tendo variado entre 41,67% (reações suspeitas ou traços) e 100,00% (reações fortemente positivas).

A TABELA 7 mostra a comparação dos resultados obtidos na prova do CMT com os da pesquisa do teor de cloretos no diagnóstico da mastite bovina, e determinação do percentual de concordância, nos rebanhos produtores de leite tipo B, estudados na região do Município de Barretos, São Paulo. O percentual de concordância estabelecido para ambas as provas foi de 46,43, tendo variado entre 25,0% (reações suspeitas ou traços) e 70,0% (reações fortemente positivas).

A TABELA 8 mostra a comparação dos resultados obtidos na contagem leucocitária com os do exame bacteriológico no diagnóstico da mastite bovina, e determinação do percentual de concordância, nos rebanhos produtores de leite tipo B, estudados na região do Município de Barretos, São Paulo. O percentual de concordância estabelecido para ambas as provas foi de 87,5.

A TABELA 9 mostra a comparação dos resultados obtidos na contagem leucocitária com os da pesquisa do teor de cloretos no diagnóstico da mastite bovina, e determinação do percentual de concordância, nos rebanhos produtores de leite tipo B, estudados na região do Município de Barretos, São Paulo. O percentual de concordância estabelecido para ambas as provas foi de 55,36.

A TABELA 10 mostra a comparação dos resultados obtidos na pesquisa do teor de cloretos com os do exame bacte

riológico no diagnóstico da mastite bovina, nos rebanhos produtores de leite tipo B, estudados na região do Município de Barretos, São Paulo. O percentual de concordância estabelecido para ambas as provas foi de 50,0.

A TABELA 11 mostra a distribuição dos agentes etiológicos isolados no exame bacteriológico das 56 fêmeas reagentes à prova do CMT, nos rebanhos produtores de leite tipo B, estudados na região do Município de Barretos, São Paulo. Observa-se a predominância do *Staphylococcus aureus* (52,08%) sobre os demais microrganismos. O *Corynebacterium pyogenes* não foi isolado em nenhuma das amostras analisadas, e o percentual de cultivos sem crescimento foi de 14,29.

A TABELA 12 mostra a comparação dos resultados obtidos na prova da redução do azul de metileno com as da contagem padrão em placas, segundo as 56 amostras das fêmeas reagentes à prova do CMT, nos rebanhos produtores de leite tipo B, estudados na região do Município de Barretos, São Paulo. Os dados desta tabela revelam que 30 (53,57%) amostras apresentaram o tempo de redução não condizente com o número de microrganismos determinado, isto é, tempo de redução menor que 3 1/2 horas e contagem total de microrganismos inferior a 500.000 microrg/ml.

A TABELA 13 foi constituída com o intuito de tentar justificar as variações observadas na TABELA 12. Os dados desta tabela mostram a comparação dos resultados obtidos na contagem leucocitária com os da prova da redução do azul de metileno, segundo as 56 amostras de leite reagentes à prova do CMT, nos rebanhos produtores de leite tipo B, estudados na Região do Município de Barretos, São Paulo. Observa-se que 26 (86,67%) amostras com tempo de redução inferior a 3 1/2 horas, apresentavam contagens leucocitárias superiores a

2.500.000 leuc/ml., enquanto que 23 (88,46%) amostras com tempo de redução superior a 3 1/2 horas, apresentavam contagens leucocitárias iguais ou menores que 2.500,000 leuc/ml.

Com o intuito de verificar a relação existente entre a prova da redução do azul de metileno e a contagem padrão em placas, diante dos vários agentes etiológicos isolados, constituiu-se a TABELA 14. Os dados desta tabela mostram a comparação dos resultados obtidos na prova da redução do azul de metileno com os da contagem padrão em placas, segundo as amostras de leite inoculadas experimentalmente. Observa-se que 27(90,0%) amostras apresentaram o tempo de redução na prova da redução do azul de metileno compatível com o número de microorganismos determinado.

A TABELA 15 mostra a distribuição dos resultados obtidos nas análises realizadas pelo Serviço de Inspeção do Laticínio Flor da Nata, segundo os rebanhos produtores de leite tipo B, na região do Município de Barretos, São Paulo. Os dados desta tabela evidenciam que todos os resultados obtidos, atenderam as exigências estabelecidas pelo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal do Ministério da Agricultura.

A TABELA 16 mostra a prevalência da mastite bovina nos rebanhos produtores de leite tipo B, na região do Município de Barretos, São Paulo, segundo o número de fêmeas e quartos analisados, e resultados obtidos na pesquisa do teor de cloretos, prova de pus e prova de Whiteside. A prova de Whiteside mostrou positividade a partir de uma prevalência de 7,0 % das fêmeas ou 1,7% dos quartos analisados. A prova de pus mostrou positividade a partir de 16,4% das fêmeas ou 4,1% dos quartos analisados e a pesquisa do teor de cloretos, mostrou-se negativa em todos os rebanhos estudados.

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DAS FÊMEAS POSITIVAS, SUSPEITAS E NEGATIVAS À PROVA DO CMT, SEGUNDO OS REBANHOS PRODUTORES DE LEITE TIPO B, ESTUDADOS NA REGIÃO DO MUNICÍPIO DE BARRETOS, SÃO PAULO, 1982.

Fêmeas Rebanhos	Examinadas	Positivas		Suspeitas		Negativas	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
A	42	7	16,7	3	7,1	32	76,2
B	30	5	16,7	2	6,7	23	76,8
C	61	7	11,5	4	6,6	50	83,3
D	73	7	9,6	-	-	66	91,7
E	86	4	4,7	3	3,5	79	91,9
F	176	14	8,0	-	-	162	92,0
TOTAL	468	44	9,4	12	2,6	412	88,0

TABELA 2 - PREVALÊNCIA DA MASTITE BOVINA EM SEIS REBANHOS PRODUTORES DE LEITE TIPO B, DETECTADA PELO CMT E CONFIRMADA PELO EXAME BACTERIOLÓGICO, SEGUNDO O NÚMERO DE FÊMEAS E QUARTOS ANALISADOS, ESTUDADOS NA REGIÃO DO MUNICÍPIO DE BARRETOS, SÃO PAULO, 1982.

Amostras Rebanhos	Fêmeas analisadas	Positivas		Quartos analisados	Positivos
		Nº	%		%
A	42	8	19,1	168	4,8
B	30	6	20,0	120	5,0
C	61	10	16,4	244	4,1
D	73	7	9,6	292	2,4
E	86	6	7,0	344	1,7
F	176	11	6,3	704	1,6
TOTAL	468	48	10,3	1872	2,6

TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS POSITIVAS AO EXAME BACTERIOLÓGICO, SEGUNDO A LOCALIZAÇÃO DO QUARTO AFETADO, NOS REBANHOS PRODUTORES DE LEITE TIPO B, ESTUDADOS NA REGIÃO DO MUNICÍPIO DE BARRETOS, SÃO PAULO, 1982.

Amostras Quartos afetados	Positivas		
	Nº	%*	%**
Anterior direito	15	3,3	31,2
Anterior esquerdo	13	2,8	27,1
Posterior direito	14	3,0	29,2
Posterior esquerdo	6	1,3	12,5
TOTAL	48	10,3	100,00

(*) .- Em relação ao número total de fêmeas analisadas.

(**) .- Em relação ao número total de fêmeas positivas.

TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO DE QUARTOS POSITIVOS E NEGATIVOS AO EXAME BACTERIOLÓGICO, E DOS QUARTOS "PERDIDOS", SEGUNDO OS REBANHOS PRODUTORES DE LEITE TIPO B, ESTUDADOS NA REGIÃO DO MUNICÍPIO DE BARRETOS, SÃO PAULO, 1982.

Quartos Rebanhos	Examinados	Positivos		Negativos		Perdidos	
		Nº	%*	Nº	%*	Nº	%*
A	168	8	4,8	159	94,6	1	0,6
B	120	6	5,0	112	93,3	2	1,7
C	244	10	4,1	225	92,2	9	3,7
D	292	7	2,4	280	95,9	5	1,7
E	344	6	1,7	337	98,0	1	0,3
F	704	11	1,6	676	96,0	17	2,4
TOTAL	1872	48	2,6**	1789	95,6**	35	1,9**

(*) .- Em relação ao número total de quartos analisados em cada rebanho.

(**) .- Em relação ao número total de quartos analisados em todos os rebanhos.

TABELA 5 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NA PROVA DO CMT COM OS DO EXAME BACTERIOLÓGICO NO DIAGNÓSTICO DA MASTITE BOVINA, E DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE CONCORDÂNCIA, NOS REBANHOS PRODUTORES DE LEITE TIPO B, ESTUDADOS NA REGIÃO DO MUNICÍPIO DE BARRETOS, SÃO PAULO, 1982.

"California Mastitis Test" Leitura	Exame Bacteriológico			Concordância %
	Nº	Positivo	Negativo	
Suspeitas ou traços (T)	12	7	5	58,33
Fracamente positivas (+)	21	19	2	90,91
Distintamente positivas (++)	13	12	1	92,31
Fortemente positivas (+++)	10	10	-	100,00
TOTAL	56	48	8	85,71

TABELA 6 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NA PROVA DO CMT COM OS DA CONTAGEM LEUCOCITÁRIA NO DIAGNÓSTICO DA MASTITE BOVINA, E DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE CONCORDÂNCIA, NOS REBANHOS PRODUTORES DE LEITE TIPO B, ESTUDADOS NA REGIÃO DO MUNICÍPIO DE BARRETOS, SÃO PAULO, 1982.

"California Mastitis Tests"		Contagem Leucocitária		Concordância
Leitura	Nº	Superior 500.000/ml	Inferior 500.000/ml	%
Suspeitas ou				
traços (T)	12	5	7	41,67
Fracamente				
positivas (+)	21	19	2	90,48
Distintamente				
positivas (++)	13	13	-	100,00
Fortemente				
positivas(+++)	10	10	-	100,00
TOTAL	56	47	9	83,93

TABELA 7 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NA PROVA DO CMT COM OS DA PESQUISA DO TEOR DE CLORETOS NO DIAGNÓSTICO DA MASTITE BOVINA, E DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE CONCORDÂNCIA, NOS REBANHOS PRODUTORES DE LEITE TIPO B, ESTUDADOS NA REGIÃO DO MUNICÍPIO DE BARRETOS, SÃO PAULO, 1982.

"California Mastitis test "		Teor de Cloretos		Concordância
Leitura	Nº	Positivo Nº	Negativo Nº	%
Suspeitas ou traços (T)	12	3	9	25,00
Fracamente positivas (+)	21	9	12	42,86
Distintamente positivas (++)	13	7	6	53,85
Fortemente positivas(+++)	10	7	3	70,00
TOTAL	56	26	30	46,43

TABELA 8 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NA CONTAGEM LEUCOCITÁRIA COM OS DO EXAME BACTERIOLÓGICO NO DIAGNÓSTICO DA MASTITE BOVINA, E DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE CONCORDÂNCIA, NOS REBANHOS PRODUTORES DE LEITE TIPO B, ESTUDADOS NA REGIÃO DO MUNICÍPIO DE BARRETOS, SÃO PAULO, 1982.

Contagem leucocitária		Exame bacteriológico		Concordância
Leitura*	Nº	Positivo	Negativo	%
Positiva	47	44	3	87,5
Negativa	9	4	5	
TOTAL	56	48	8	

* Critério:

Positivo: Contagem leucocitária igual ou superior a 500.000 leuc/ml.

Negativo: Contagem leucocitária inferior a 500.000 leuc/ml.

TABELA 9 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NA CONTAGEM LEUCOCITÁRIA COM OS DA PESQUISA DO TEOR DE CLORETOS NO DIAGNÓSTICO DA MASTITE BOVINA, E DETERMINAÇÃO NO PERCENTUAL DE CONCORDÂNCIA, NOS REBANHOS PRODUTORES DE LEITE TIPO B, ESTUDADOS NA REGIÃO DO MUNICÍPIO DE BARRETOS, SÃO PAULO, 1982.

Contagem leucocitária		Teor de cloretos		Concordância
Leitura *	Nº	Positivo	Negativo	%
Positiva	47	24	23	55,36
Negativa	9	2	7	
TOTAL	56	26	30	

* Critério:

Positivo: Contagem leucocitária igual ou superior a 500.000 leuc/ml.

Negativo: Contagem Leucocitária inferior a 500.000 leuc/ml.

TABELA 10 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NA PESQUISA DO TEOR DE CLORETOS COM OS DO EXAME BACTERIOLÓGICO NO DIAGNÓSTICO DA MASTITE BOVINA, E DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE CONCORDÂNCIA, NOS REBANHOS PRODUTORES DE LEITE TIPO B, ESTUDADOS NA REGIÃO DO MUNICÍPIO DE BARRETOS, SÃO PAULO, 1982

Teor de cloretos		Exame bacteriológico		Concordância
Leitura	nº	Positivo	Negativo	%
Positiva	26	23	3	50,0
Negativa	30	25	5	
TOTAL	56	48	8	

TABELA 11 - DISTRIBUIÇÃO DOS AGENTES ETIOLÓGICOS ISOLADOS NO EXAME BACTERIOLÓGICO DAS 56 FÊMEAS REAGENTES A PROVA DO CMT, NOS REBANHOS PRODUTORES DE LEITE TIPO B, ESTUDADOS NA REGIÃO DO MUNICÍPIO DE BARRETOS, SÃO PAULO, 1982.

Agentes etiológicos	Amostras		
	Nº	%*	%**
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	44,64	52,08
<i>Streptococcus dysagalactiae</i>	7	12,50	14,58
<i>Streptococcus agalactiae</i>	5	8,93	10,42
<i>Streptococcus uberis</i>	4	7,14	8,33
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3	5,36	6,25
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ou <i>S. saprophyticus</i>	3	5,36	6,25
<i>Escherichia coli</i>	1	1,79	2,08
<i>Corynebacterium pyogenes</i>	-	-	-
Cultivos sem crescimento	8	14,29	-
TOTAL	56	100,00	100,00

* .- Em relação ao número total de fêmeas reagentes.

** .- Em relação ao número total de agentes etiológicos isolados.

TABELA 12 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NA PROVA DA REDUÇÃO DO AZUL DE METILENO COM OS DA CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS, SEGUNDO AS 56 AMOSTRAS DE LEITE DAS FÊMEAS REAGENTES A PROVA DO CMT, NOS REBANHOS PRODUTORES DE LEITE TIPO B, ESTUDADOS NA REGIÃO DO MUNICÍPIO DE BARRETOS, SÃO PAULO, 1982.

Redução do azul de metile no. (Horas)	CPP*	CPP*			Total
		< 250	250 — 500	500	
— 1/2	1/2	4**	-	-	4
1/2 — 1,00	1,00	9**	-	-	9
1,00 — 1 1/2	1 1/2	3**	1**	-	4
1 1/2 — 2,00	2,00	4**	1**	-	5
2,00 — 2 1/2	2 1/2	4**	-	-	4
2 1/2 — 3,00	3,00	3**	-	-	3
3,00 — 3 1/2	3 1/2	1**	-	-	1
3 1/2 — 4,00	4,00	1	-	-	1
4,00 ou mais	ou mais	25	-	-	25
TOTAL		54	2		56

(*) CPP.- Contagem padrão em placas. (em milhares).

(**) .- Tempo de viragem na prova da redutase não é compatível com o número de microrganismos determinado.

TABELA 13 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NA CONTAGEM LEUCOCITÁRIA COM OS DA PROVA DE REDUÇÃO DO AZUL DE METILENO, SEGUNDO AS 56 AMOSTRAS DE LEITE DAS FÊMEAS REAGENTES A PROVA DO CMT, NOS REBANHOS PRODUTORES DE LEITE TIPO B, ESTUDADOS NA REGIÃO DO MUNICÍPIO DE BARRETOS, SÃO PAULO, 1982

Nº de leucócitos (X 1000)	Redução do azul de me- tileno	<3 1/2hs		≥3 1/2hs		Total
		Nº	%*	Nº	%*	
— 500		-	-	9	34,62	9
500— 1000		-	-	3	11,54	3
1000— 2500		4	13,33	11	42,31	15
2500— 5000		5	16,67	2	7,69	7
5000— 10000		9	30,00	1	3,85	10
10000 ou mais		12	40,00	-	-	12
TOTAL		30	53,57**	26	46,43**	56

(*) .- Em relação ao tempo de viragem verificado na prova da redutase.

(**) .- Em relação ao número total de amostras analisadas.

TABELA 14 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NA PROVA DA REDUÇÃO DO AZUL DE METILENO COM OS DA CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS, SEGUNDO AS AMOSTRAS DE LEITE INOCULADAS EXPERIMENTALMENTE, DOS REBANHOS PRODUTORES DE LEITE TIPO B, ESTUDADOS NA REGIÃO DO MUNICÍPIO DE BARRETOS, SÃO PAULO, 1982.

Redução do azul de metileno (Horas)	CPP*	<250	250— 500	500 ou +	Total
— 1/2		1**	-	5	6
1/2 — 1,00		-	-	1	1
1,00 — 1 1/2		-	-	2	2
1 1/2 — 2,00		1**	-	3	4
2,00 — 2 1/2		-	-	3	3
2 1/2 — 3,00		-	-	2	2
3,00 — 3 1/2		-	1	-	1
3 1/2 — 4,00		3	1	1**	5
4,00 ou mais		6	-		6
TOTAL		11	2	17	30

(*) CPP .- Contagem padrão em placas (em milhares).

(**) .- Tempo de viragem na prova da redutase não é compatível com o número de microrganismos.

TABELA 15 - DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NAS ANÁLISES REALIZADAS PELO SERVIÇO DE INSPEÇÃO DO LACTICÍNIO FLOR DA NATA, SEGUNDO OS REBANHOS PRODUTORES DE LEITE TIPO B, ESTUDADOS NA REGIÃO DO MUNICÍPIO DE BARRETOS, SÃO PAULO, 1982.

Rebanhos	A	B	C	D	E	F
Análises						
Acidez (ºD)	15,5	15,5	16,0	15,5	15,5	15,5
Densidade	1,031	1,031	1,032	1,033	1,033	1,031
Gordura (%)	3,5	3,5	3,5	3,2	3,5	4,1
EST (%)*	12,28	12,12	12,56	12,45	12,66	13,06
ESD (%)**	8,78	8,62	9,06	9,25	9,16	8,96
Crioscopia (ºC)	-0,55	-0,53	-0,54	-0,55	-0,55	-0,55
Contagem padrão placas(x 1000)	130	240	230	360	440	260
Redutase (hs)	5,25	4,20	5,25	4,40	3,50	4,40

(*) EST .- Extrato Seco Total.

(**) ESD .- Extrato Seco Desengordurado.

TABELA 16 - PREVALÊNCIA DA MASTITE BOVINA NOS REBANHOS PRODUTORES DE LEITE TIPO B, ESTUDADOS NA REGIÃO DO MUNICÍPIO DE BARRETOS, SÃO PAULO, SEGUNDO O NÚMERO DE FÊMEAS E QUARTOS ANALISADOS, E RESULTADOS OBTIDOS PELO SIF NA PESQUISA DO TEOR DE CLORETOS, PROVA DE PŪS E NA PROVA DE WHITESIDE, 1982.

Rebanhos	% fêmeas doentes	% quartos doentes	teor de cloretos	prova de pus	prova Whiteside
A	19,1	4,8	negativo	positivo	positivo
B	20,0	5,0	negativo	positivo	positivo
C	16,4	4,1	negativo	positivo	positivo
D	9,6	2,4	negativo	negativo	positivo
E	7,0	1,7	negativo	negativo	positivo
F	6,3	1,6	negativo	negativo	negativo

4 .- DISCUSSÃO

Os dados inseridos nas TABELAS 1 e 2 revelam a ocorrência da mastite bovina a níveis razoavelmente baixos , quando comparados aos valores obtidos por LANGENEGGER & cols. (1970) no Rio de Janeiro, HARROP & cols.(1975) em Pernambuco e FERREIRO & cols.(1981) em Minas Gerais, cuja prevalência foi de 20,0% , 14,5% e 14,2%, respectivamente. Este fato talvez possa ser atribuído a adoção de algumas medidas profiláticas, representadas principalmente pela realização diária da prova da "caneca telada", exigida pelo Serviço de Inspeção, nos estábulos produtores de leite tipo B. Esta prova permite a detecção de fêmeas infectadas, cujo afastamento da linha de produção, determina a eliminação de importante fonte de infecção do rebanho. A referida prova baseia-se na análise visual dos primeiros "jatos" de leite, os quais são

passados ou transvazados ã uma caneca apropriada, contendo em sua abertura uma tela metãlica, cuja função é a de reter os grumos ou flôcos presentes no leite mastítico.

A análise dos dados constantes na TABELA 3, evidencia ao teste de dupla proporcionalidade uma variação não significativa, quanto a localização do quarto afetado. Todavia, ao agrupar-se os resultados dos quartos anteriores e posteriores, observa-se maior frequência (58,3 %) de afecções nos quartos anteriores. Este dado surpreende, devido a maior capacidade secretora dos quartos posteriores e, conseqüentemente, maior probabilidade de traumatismos por ocasião da ordenha. FIGUEIREDO (1962) obteve resultados semelhantes (56,28%), mas afirmou ser esta diferença de pouco valor, devido ao pequeno número de animais examinados (129). Diante da afirmação deste autor, e considerando que o número de fêmeas mastíticas por nós analisadas foi muito menor (48), acredita-se que tais achados, devam ser atribuídos ao acaso.

A análise dos dados inseridos na TABELA 4, revela que 1,9% dos quartos examinados estavam "perdidos" em decorrência de mastite bovina. Este achado foi muito semelhante ao de FERREIRO & cols. (1981), que verificaram 1,78%, entretanto, foi inferior aos de MARTINEZ (1958), LANGENEGGER & cols. (1970) e HARROP & cols. (1975), cujas proporções observadas foram de 27,8%, 7,0% e 3,9% respectivamente. O número relativamente pequeno de quartos "perdidos" observado na região de Barretos/SP, talvez possa ser atribuído a utilização da prova da "caneca telada", que permite a identificação do quarto afetado nos estágios iniciais da doença, quando as medidas terapêuticas apresentam maior eficiência.

A análise dos dados constantes da TABELA 5, revela que a concordância entre a prova do CMT com a investigação

bacteriológica variou entre 58,33% e 100,00%, sendo esta concordância tanto maior quanto mais fortemente se apresentava a reação de positividade na prova do CMT. O valor estabelecido para o referido percentual foi de 85,71, idêntico ao obtido por LANGENEGGER & cols.(1970). FIGUEIREDO (1962) e HARROP & cols.(1975), determinaram valores inferiores, ou seja, 78,65% e 67,46%, respectivamente. Os dados desta tabela oferecem informações extremamente importantes na interpretação da prova do CMT, ou seja, considerando-se apenas as reações positivas, verifica-se que o percentual de concordância com o exame bacteriológico é muito elevado, variando de 90,91% (fracamente positivas) a 100,00% (fortemente positivas), o que confirma a eficiência desta prova na detecção de transtornos secretórios da glândula mamária não perceptíveis clinicamente. Este fato, aliado a rapidez, facilidade de execução e baixo custo, em relação a outros métodos de diagnóstico, justificam uma ampla utilização da prova do CMT a nível de campo.

A análise dos dados constantes na TABELA 6, revela que a concordância entre a prova do CMT com a contagem leucocitária variou entre 41,67% e 100,00%, sendo esta concordância tanto maior quanto mais fortemente se apresentava a reação de positividade na prova do CMT. O valor estabelecido para o referido percentual foi de 83,93. MILLER & KEARNS (1967) e PEARSON & cols.(1970), determinaram valores semelhantes, ou seja, 81,7% e 84,0%, respectivamente. Estes autores também consideraram contagens leucocitárias superiores a 500.000 leucócitos/ml, como sendo indicadores de transtornos secretórios da glândula mamária. Considerando-se apenas as reações positivas, verifica-se que o percentual de concordância entre ambas as provas é muito elevado, variando de 90,48%

(reações fracamente positivas) a 100,00% (distintamente e fortemente positivas). Este fato era esperado, uma vez que, a prova do CMT fundamenta-se entre outras alterações, no aumento do número de leucócitos presente no leite mastítico.

A análise dos dados inseridos na TABELA 7, mostra que a concordância entre a prova do CMT com a pesquisa do teor de cloretos variou entre 25,0% a 70,00%, sendo esta concordância tanto maior quanto mais fortemente se apresentava a reação de positividade na prova do CMT. O valor estabelecido para o referido percentual foi de 46,43. NADER FILHO & MIGUEL (1981)*, determinaram valores muito superiores, ou seja, 80,11%, além de verificar elevada associação positiva e altamente significativa entre ambas as provas, tendo afirmado ser indiferente o uso de uma ou outra prova, como método auxiliar de diagnóstico da mastite bovina. A elevada diferença verificada entre estes percentuais, talvez possa ser atribuída ao fato destes autores terem efetuado o estudo comparativo de ambas as provas, nas amostras de leite procedentes de fêmeas reagentes e não reagentes a prova do CMT. Assim, se consideradas apenas as amostras reagentes, o percentual de concordância entre ambas as provas diminuiria para 60,38. Deve ser assinalado ainda, que os referidos autores, analisaram o rebanho de apenas uma propriedade, na

* NADER FILHO, A. & MIGUEL, O. Estudo Comparativo entre as provas do California Mastitis Test e teor de cloretos na detecção da mastite subclínica em bovinos. Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. (Em publicação).

qual as condições de manejo, ordenha, etc., eram totalmente diferentes das observadas na região de Barretos/SP.

A análise dos dados inseridos na TABELA 8, mostra que a concordância entre a contagem leucocitária e o exame bacteriológico foi de 87,5%. Esta determinação coincide com os achados de SING & BAXI (1980), que verificaram níveis de concordância entre 87,0 e 90,0%, isto é, amostras de leite com contagens leucocitárias superiores a 500.000 leucócitos/ml e com positividade no exame bacteriológico. Entre os métodos auxiliares de diagnóstico testados neste trabalho, a contagem leucocitária foi o que apresentou maior percentual de concordância com o exame bacteriológico. Limite de confiança ao nível de 95% ou mais: 78,7 - 96,3.

A análise dos dados constantes da TABELA 9, evidencia que a concordância entre a contagem leucocitária e a pesquisa do teor de cloretos foi de 55,36%. Considerando-se que a contagem leucocitária foi a prova que apresentou maior concordância com o exame bacteriológico (87,5%), era de se esperar que o percentual de concordância entre a contagem leucocitária e a pesquisa do teor de cloretos, fosse próximo ao valor estabelecido entre a prova do teor de cloretos com o exame bacteriológico, isto é, concordância de 50,0%, conforme ilustra a TABELA 10.

A análise dos dados inseridos na TABELA 10, mostra que a concordância entre a pesquisa do teor de cloretos e o exame bacteriológico foi de 50,0%. Esta determinação foi muito semelhante a verificada por CHANDER & BAXI (1975), que utilizando vários métodos auxiliares de diagnóstico da mastite bovina, observaram que a pesquisa do teor de cloretos apresentou 52,0% de concordância com o exame bacteriológico, inferior a todos os outros testes estudados.

A análise dos dados inseridos na TABELA 11, revela que o *Staphylococcus aureus* foi o agente etiológico mais freqüentemente isolado (52,08%) no exame bacteriológico, confirmando os achados de FIGUEIREDO (1962), LANFENEGGER & *cols.* (1970), FERNANDES & *cols.* (1973) e HARROP & *cols.* (1975), que estudando as "bacias leiteiras" de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Pernambuco, verificaram 57,4% , 53,1%, 50,0% e 59,2%, respectivamente. Os *Streptococcus* *sp* aparecem na sequência de ordem de importância causuística, o que coincide com os achados de HARROP & *cols.* (1975) e SILVA & *cols.* (1977). Dentre os microrganismos pertencentes a este gênero, verificou-se a presença do *S. dysagalactiae* (14,58%), *S. agalactiae* (10,42%), *S. uberis* (8,33%) e *S. pyogenes* (6,25%). O *Staphylococcus epidermidis* ou *Staphylococcus saprophyticus* foram isolados em 6,25% dos casos. FERREIRO & *cols.* (1981) em Minas Gerais, isolaram o *Staphylococcus epidermidis* em 16,09% das amostras. Segue-se ainda a *Escherichia coli* que foi isolada de um único caso (2,08%) de mastite bovina, sendo esta prevalência muito parecida e determinada por FERNANDES & *cols.* (1973) no Rio Grande do Sul (3,0%). O *Corynebacterium pyogenes* não foi isolado em nenhuma das amostras analisadas.

Deve-se assinalar que na diferenciação das espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Streptococcus* *sp*, não foi possível a realização das provas sorológicas, devido ao equívoco ocorrido durante a escolha do meio de conservação (Agar Nutriente) das cepas isoladas, o que propiciou a perda das estirpes mais exigentes.

A análise dos dados inseridos na TABELA 12, revela que 30 amostras de leite procedentes de fêmeas reagen

tes ao CMT, apresentaram o tempo de redução na prova da redução do azul de metileno não condizente com o número de microrganismo determinado, isto é, amostras cujas contagens foram muito inferiores a 500.000 micror/ml, com tempo de redução bem abaixo de 3 1/2 horas. Este fato surpreende, pois, contraria o fundamento da prova da redução do azul de metileno, o qual estabelece uma relação entre o tempo de redução do azul de metileno e o número de microrganismos, de modo a proporcionar uma estimativa do conteúdo bacteriano do leite. Observou-se ainda que os agentes etiológicos isolados nas 26 amostras restantes que apresentaram comportamento esperado, eram praticamente os mesmos das 30 amostras anteriores, não sendo verificada, portanto, qualquer relação com a etiologia da enfermidade.

Com o intuito de encontrar justificativas para os achados da TABELA 12, realizou-se o cruzamento dos resultados obtidos na contagem leucocitária com os da prova da redução do azul de metileno, conforme ilustra a TABELA 13. A análise dos dados desta tabela, evidencia que 86,67% das 30 amostras com tempo de redução inferior a 3 1/2 horas, apresentaram contagens leucocitárias maiores que 2.500.000 leucócitos/ml, enquanto que 88,46% das 26 amostras com tempo de redução superior a 3 1/2 horas, apresentaram contagens leucocitárias iguais ou menores que 2.500.000 leucócitos/ml. Estes dados sugerem uma provável interferência dos leucócitos, quando em número elevado, na elaboração da enzima ou na alteração do potencial de oxi-redução do produto, de modo a estimular a oxidação do azul de metileno, fato este que talvez possa justificar os achados da TABELA 12.

A TABELA 14 mostra os resultados obtidos na comparação da prova da redução do azul de metileno com os da contagem padrão em placas, segundo as amostras procedentes de fêmeas ne

gativas a prova do CMT às quais inoculou-se os vários agentes etiológicos isolados na fase anterior. A análise dos dados desta tabela, evidencia que dentre as 30 amostras estudadas, 27 (90,0%) apresentaram o tempo de redução compatível com o número de microrganismos determinado. Nas 3 (10,0%) amostras discordantes, os agentes etiológicos inoculados foram os mesmos das 27 amostras que apresentaram comportamento esperado, não sendo verificada qualquer relação entre as amostras discordantes e os agentes testados. Observa-se, ainda, que nas 3 amostras discordantes, 2 apresentaram contagens inferiores a 250.000 microrg/ml., enquanto que apenas 1 apresentou contagem superior a 500.000 microrg/ml. Em vista do exposto, depreende-se que é muito pequena a probabilidade de aceitação de um produto com o número de microrganismos superior ao permitido pelo Ministério da Agricultura. Embora exista a probabilidade de rejeição de um produto que apresente o número de microrganismos dentro dos padrões normais, os valores desta tabela confirmam a eficiência da prova da redução do azul de metileno na estimativa do conteúdo bacteriano do leite, fato este que aliado a rapidez, facilidade de execução e baixo custo, quando comparado ao da contagem padrão em placas, justificam a ampla utilização desta prova a nível de estabelecimentos industriais.

Considerando que os dados inseridos na TABELA 12, evidenciam diminuição do tempo de redução do azul de metileno nas amostras oriundas de fêmeas infectadas, fato este que talvez possa ser justificado pela interferência dos leucócitos, quando em número elevado, conforme ilustra a TABELA 13, e tendo em vista a eficiência desta prova quando efetuada em amostras de leite de fêmeas não reagentes a prova do CMT, como pode ser verificado na TABELA 14, acredita-se que a prova da redução do azul de metileno deva ser utilizada rotineiramente pelo

Serviço de Inspeção, uma vez que permite classificar os vários tipos de leite com simplicidade e rapidez. As variações observadas na TABELA 12 não comprometem a eficiência desta prova, pois elas ocorrem no sentido de abreviar o tempo de redução do azul de metileno, determinando deste modo, a rejeição de um produto anormal, impróprio para o consumo humano.

A análise dos dados inseridos na TABELA 15, mostra que os resultados das provas efetuadas pelo Serviço de Inspeção no Laticínio Flor da Nata, apresentaram-se dentro dos padrões estabelecidos pelo Ministério da Agricultura. A prevalência da mastite bovina em até 20,0% das fêmeas leiteiras ou em até 5,0% dos quartos examinados, conforme ilustra a TABELA 2, não foi suficiente para colocar os quesitos analisados fora dos padrões normais. Este fato talvez possa ser justificado pela mistura do leite mastítico ao leite oriundo de fêmeas normais, cuja diluição no leite de conjunto, não determina alterações que possam colocar o produto fora dos padrões estabelecidos pelo Ministério da Agricultura. Em vista do exposto, acredita-se que estes padrões devam ser objeto de estudos posteriores.

A análise dos dados inseridos na TABELA 16, revela que dentre as provas utilizadas pelo Serviço de Inspeção na detecção da mastite bovina a nível de estabelecimentos industriais, a prova de Whiteside foi a que apresentou maior sensibilidade e especificidade, capaz de revelar a presença de leite anormal em rebanhos cuja prevalência desta doença foi igual ou superior a 7,0% das fêmeas ou 1,7% dos quartos analisados. A prova de pus, embora tenha apresentado uma sensibilidade menor que a prova de Whiteside, mostrou elevada especificidade, capaz de revelar a presença de leite anormal em rebanhos cuja prevalência da mastite foi igual ou supe

rior a 16,4% das fêmeas ou 4,1% dos quartos analisados. A pesquisa do teor de cloretos foi a prova que apresentou menor sensibilidade e especificidade, incapaz de revelar a presença de leite anormal em todos os rebanhos analisados. Entretanto, este fato não invalida a utilidade de sua aplicação nas análises de rotina do Serviço de Inspeção, pois esta prova pode ser de fundamental importância na detecção de fraudes por adição de sal ao leite, efetuado simultaneamente a adição da água. Assim, esta fraude quando realizada com habilidade, pode colocar praticamente todos os quesitos analisados dentro dos padrões normais, exceto o ponto crioscópico e a concentração de cloretos no produto. Tendo em vista o fato de que a determinação do ponto crioscópico nem sempre é realizada no leite de todos os produtores, devido ao tempo relativamente elevado necessário para a execução desta prova, a pesquisa do teor de cloretos passa a apresentar uma grande importância na detecção desta dupla fraude. Considerando que a detecção de leite fraudulento é tão importante quanto o da mastite bovina em termos de Saúde Pública, acredita-se que esta prova deva ser utilizada rotineiramente, principalmente se considerada a rapidez e facilidade de sua execução.

5.- CONCLUSÃO

- A prevalência da mastite bovina nas propriedades rurais produtoras de leite tipo B, localizadas na região do Município de Barretos, Estado de São Paulo, foi de 10,3%. O *Staphylococcus aureus* foi o agente etiológico mais isolado (52,08%) dos casos de mastite bovina verificados nesta região.
- Dentre os métodos auxiliares de diagnóstico da mastite bovina testados, a contagem leucocitária foi o que apresentou maior concordância (87,5%) com o exame bacteriológico. A elevada concordância (85,71%) verificada entre a prova do CMT e o exame bacteriológico, confirma a eficiência desta prova na detecção de trans

tornos individuais da glândula mamária, não perceptíveis clinicamente. Este fato aliado a rapidez, facilidade de execução e baixo custo em relação a outros métodos de diagnóstico, justificam a ampla utilização da prova do CMT a nível de campo.

- Os vários agentes etiológicos isolados dos casos de mastite bovina apresentaram comportamento semelhante diante da prova da redução do azul de metileno.
- A prova da redução do azul de metileno mostrou ser eficiente na estimativa do conteúdo bacteriano do leite, o que confirma a importância de sua utilização na rotina do Serviço de Inspeção. Embora haja indícios de que contagens leucocitárias superiores a 2.500.000 leuc/ml, interfiram na prova da redução do azul de metileno, de modo a abreviar o tempo de redução, este fato não compromete a eficiência desta prova. É muito pequena a probabilidade de aceitação de um produto com número de microrganismos superior ao permitido pelo Ministério da Agricultura.
- Dentre as provas utilizadas pelo Serviço de Inspeção na detecção da mastite bovina a nível de estabelecimentos industriais, a prova de White side foi a que apresentou maior valor sensibilidade e especificidade, capaz de revelar a presença de leite anormal em rebanhos cuja prevalência desta doença foi igual ou superior a 7,0% das fêmeas ou 1,7% dos quartos analisados. A prova de pūs, embora tenha apresentado menor sensibilidade e especificidade que a prova de

Whiteside, foi capaz de revelar a presença de leite anormal em rebanhos cuja prevalência da mastite foi igual ou superior a 16,4% das fêmeas ou 4,1% dos quartos analisados. A pesquisa do teor de cloretos mostrou pequena sensibilidade e especificidade, sendo incapaz de revelar a presença do leite anormal em todos os rebanhos analisados. Entretanto, este fato não invalida a utilidade de sua aplicação nas análises de rotina do Serviço de Inspeção, pois esta prova pode ser de fundamental importância na detecção de fraudes no leite.

- A prevalência da mastite bovina em até 20,0% das fêmeas leiteiras ou em até 5,0% dos quartos analisados, não foi suficiente para colocar o produto fora dos padrões estabelecidos pelo Ministério da Agricultura e, diante destes achados, acredita-se que estes padrões devam ser objeto de estudos posteriores.

6.- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - Compendium of Methods for the Microbiological Examination. Washington, 1976. 701 p.

ARANALDE, A.A.; MARTINS, L.F.; ZIEGLER, J.C. Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase-positiva no leite cru da bacia leiteira de Pelotas-RS. R. Centro Ci. Rur. Sta. Maria, 4 (2): 155-158, 1974.

ASTERMARK, S.; FUNKE, H.; ENGAN-SKEY, I. The relation ship between CMT, Whiteside test, Brabant mastitis reaction, catalase test and direct cell counting of milk. Acta Vet. Scand., 10: 166-167, 1969.

BAIRD-PARKER, A.C. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive *Staphylococci*. J. app. Bact., 25: 12-19, 1962.

BARRY, J.M. & RAWLAND, S.J. Variations in the ionic and lactose concentration of milk. Biochem. J., 54: 575 - 578, 1953.

- BEHMER, M.L.A. Tecnologia do leite. 7^a ed. São Paulo, Nobel, 1977. 320p.
- BIER, O. Bacteriologia e Imunologia. 16^a ed.; São Paulo, Ed. Melhoramentos, 1975. 1056p.
- BLAIR, J.E.; LENNETTE, E.H.; TRUANT, J.P. Manual of clinical microbiology. Baltimore, Williams & Wilkins, 1971. 727p.
- BLOOD, D.C. & HENDERSON, J.A. Medicina Veterinária. 3^a ed. México, Interamericana, 1976. 1008p.
- BRATTIE, D. Current diagnosis mastite. Nord. Med. Vet. 19 (11): 513-523, 1967.
- BRYAN, C.S. & TROUT, G.M. 1935 apud GIESECKE, W.M. & VAN DEN HEEVER, L.H. The diagnosis of subclinical mastitis in lacting cows: A comparison of citological methods and a monovalent radial immunodiffusion test. Onderstepoort J. Vet. Res., 41 (2): 51-74, 1974.
- BUCHANAN, R.E. & GIBBOUS, N.E. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1974. 1268p.
- CECIL, H.C.; BITMAN, J.; WOOD, J.R. Changes in milk glycogen during mastitis. J. Dairy Sci., 12: 1607-1611, 1965.

CECILLA, A.C. Enciclopêdia de la inspeccion veterinãria y analisis de alimentos. Madrid, Espasa-Calpe SA, 1980. 1313p.

CHANDER, S. & BAXI, K.K. Diagnosis and treatment of subclinical mastitis in cow. Indian Vet. J., 52 (4):275-281, 1975.

COLLINS, C.H. Métodos Microbiológicos. Zaragoza (Espanã) Acribia. 1969. 410 p.

CORREA, V.M. & CORREA, C.N.M. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. São Paulo, J.M. Varella, 1979. 823p.

DANIEL, R.C.W.; BARNUM, D.A.; RENNIE, J.C. Variations in modified California Mastitis Test scores in dairy cattle. J. Dairy Sci., 49: 1226-1229, 1966.

DEMETER, K.J. Lactobacteriologia. Zaragoza (Espanã) Acribia, 1969. 492p.

EDWARDS, S.J. 1933 apud THE OXOID Manual of Culture Média, Ingredients and Other Laboratory Services. 4th ed. England, Turnergraphic, 1980. 310p.

EL-NAGGAR, M.A. Una reacion sencilla para el diagnóstico de la mastite bovina. Not. Med. Vet., 3:219-225, 1973.

- FERNANDES, J.C.T.; MOOJEN, V.; FERREIRO, L. Agentes etiológicos das mastites bovina na bacia leiteira de Porto Alegre RS, Brasil. Arq. Fac. Vet. UFRGS, 1 (1): 41-46, 1973.
- FERREIRO, L. Agentes etiológicos e terapêutica da mastite bovina no Brasil. Arq. Fac. Vet. UFRGS, 6: 77-88, 1978.
- FERREIRO, L.; SANTOS, E.C.; SILVA, N. Ocorrência e etiologia da mastite bovina na "Zona da Mata" do Estado de Minas Gerais. Arq. Esc. Vet. UFMG, 33: 31-37, 1981.
- FIGUEIREDO, J.B. Estudo sobre a mastite bovina no Município de Betim/MG. Arq. Esc. Vet. UFMG, 15: 258-294, 1962.
- FOSTER, E.M.; NELSON, F.E.; SPECK, M.L., DOETSH, R.N.; OLSON, J.C. Dairy microbiol. New Jersey, Prentice Hall, 1957.
- GIESECKE, W.H. & VAN DEN HEEVER, L.W. Losses caused by mastitis to industrial and fresh milk in the Republic of South Africa. J.S.Afr.Vet.Med. Assoc., 42: 73-79, 1974.
- GIESECKE, W.M. Bovine mastitis. Pretoria (South Africa) Departament of Agricultural technical Services, 1979. 37p. (Technical communication).

- GOUDKOV, A.V. & SHARPE M.E. A preliminary investigation of the importãnce of Clostridia in the production of rancid flavour in cheddar cheese. J. Dairy Res., 33: 139-145, 1966.
- GUILLES, R. 1966 apud EL-NAGGAR, M.A. Una reacion sensilla para el diagnõstico de la mastite bovina. Nor. Med. Vet., 3: 219-225, 1973.
- HAMMER, B.O. & BAILEY, D.E. 1977 apud EL-NAGGAR, M. A . Una reacion sensilla para el diagnõstico de la mastite bovina. Not. Med. Vet., 3: 219-225, 1973.
- HARRIGAN, W.F. & McCANCE, M. Laboratory methods in microbiology. 4th ed. New Jersey, Prentice-Hall, 1969. 492p.
- HARROP, M.H.V.; PEREIRA, L.J.V.; BRITO, J.R.F.; MELO, A.M. B. Incidência da mastite bovina na bacia leiteira da zona meridional agreste PE. Pesq. Agrop. Bras., 10 (8): 65-67, 1975.
- HAYDEN, C.E. 1932 apud EL-NAGGAR, M.A. Una reacion sensilla para el diagnõstico de la mastite bovina. Not. Med. Vet., 3: 219-225, 1973.
- HEIDRICH, H.J. & RENK, M. Enfermidades de la glandula mamãria. 3^a ed. Barcelona, Labor, 1969. 502p.

- ITO, I. Y.; BARACHINI, O.; POTO, S. Emprego da gema de ovo na produção de lecitinase por *Staphylococcus aureus*. Anal. Microbiol., 16: 189-192, 1969.
- JANSEN, J.J. Economic losses resulting from mastitis: a review. J. Dairy Sci., 53 (9): 1151-1161, 1970.
- JACQUET, J. & NIR, Y. 1e 1952 apud EL-NAGGAR, M.A. Una reacion sencilla para el diagnõstico de la mastite bovina. Not. Med. Vet., 3: 219-225, 1973.
- KASTLI, P. Definition of mastitis. A Bull. Int. Dairy Fed., 3: 1-5, 1967.
- LACERDA JUNIOR, P.M.G.; ZANI NETO, L.; FREITAS, D.C. Estudos sobre mastites bovinas. I-Contribuição ao estudo dos agentes etiológicos das mastites bovinas. Rev. Fac. Med. Vet. São Paulo, 5: 55-64, 1954.
- LANDREY, J.S.A. The effect on mastitis on herd milk production and composition. J. South Afr. Vet. Med. Assoc., 36: 515-520, 1966.
- LANGENEGGER, J.; COELHO, M.M.; LANGENEGGER, C.H.; DE CASTRO, R.P. Estudo de incidência da mastite bovina na bacia leiteira do Rio de Janeiro. Pesq. Agrop. Bras., 5: 437-440, 1970.
- LEITE, R.C.; BRITO, J.R.F.; FIGUEIREDO, J.B. Alterações da glândula mamária de vacas tratadas intensivamente,

via mamária, com penicilina em veículo aquoso. Arq. Esc. Vet. UFMG., 28 (1): 27-31, 1976.

LITTLE, R.C. & PLASTRIDGE, W.N. 1946 apud GIESECKE, W.H. & VAN DEN HEEVER, L.W. Diagnosis of bovine mastitis with particular reference to mastitis subclinical. On destepoort. J. Vet. Res., 41 (4): 169-212, 1974.

LOEFFLER, F. 1887 apud THE OXOID Manual of Culture Média, Ingredients and Other Laboratory Service. 4th ed., England, Turnergraphic, 1980. 310p.

LOPES. C.F.; SILVA FILHO, F.S.; PORTO, R. Contribuição para o estudo da redutase do leite, pelo emprêgo da re sazurina e do azul de metileno. Bol. Ind. An., 22: 145-151, 1964.

MARTINEZ, F.S. Doenças do úbere nas vacas leiteiras do P.Z.C. Dipan. Bol. Ind. Anim. Porto Alegre, 10: 5-11, 1958.

MILLER, D.D. & KEARMS, J.V. Effectiveness of California mastitis test as a measurement of the leucocyte content of quarter samples of milk. J. Dairy Sci., 50: 683-686, 1967.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Método analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. Brasília. Métodos Físico-químicos, 1981.

- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. Brasília, Métodos microbiológicos, 1981. 44p.
- MULDOON, P.J. & LISKA, B.J. A modified Whiteside test for the detection of chronic bovine mastitis. Cornell Vet., 31 (1): 47-55, 1971.
- MURPHY, J.M. & HANSON, J.J. Chloride ion activity electrode for the detection of abnormal milk. J. Dairy Sci., 54: 117-119, 1971.
- NARAYANAN, I. & YIA, K.K. Studies on bovine mastitis. II. Methods of diagnosis. Indian J. Dairy Sci., 17: 147-158. 1954.
- NEWSTEAD, D.F. Effects of mastitis on milk composition and properties. New Zealand J. Dairy Sci. Technol., 8 (2) : 52-55, 1973.
- O'DONAVAN, L.; DODD, F.H.; NEAVE, F.J. The effect of udder infections on the lactation yield of milk and milk solids. J. Dairy Sci., 27: 115-120, 1966.
- OSHIMA, M.; FUSE, H.; ISHII, T. Interrelationship between increase sodium and chloride contents and changes in other constituents in abnormal milk. Jap. J. Zoot. Sci., 46 (10): 543-550, 1974.

- PESSOA, G.V.A. & SILVA, E.A.M. Milieu pour l'identification presumptive rapide des bactéries, des aeromonas et des vibrios. Ann. Microbiol., 125 A (1): 341-347, 1974.
- PLASTRIDGE, W.N. Bovine mastitis: a review. J. Dairy Sci., 41: 1141-1181, 1958.
- PREVOT, A. & FREDETTE, V. Manual for the classification and determination of the anaerobic bacteria. Philadelphia, Lea & Febiger, 1966, 402p.
- RAWLAND, S.J.; NEAVE, F.K.; DOOD, F.H.; OLIVER, J. The effect of *Staphylococcus pyogenes* infection on milk secretion. In: INTERNATIONAL DAIRY CONGRESS, 150, 1959 Proceedings. 121p.
- ROOK, J.A.F. Variations in the chemical composition of milk in the cows. Dairy Sci Abstr., apud 23: 251-258, 1961.
- ROSSEL, J.M. 1931 apud GIESECKE, W.H. & VAN DEN HEEVER, L.H. Diagnosis of bovine mastitis with particular reference to mastitis subclinical. Onderstepoort J. Vet. Res., 41 (4): 169-212, 1974.
- SANTOS, E. C. & MOREIRA, H.H. Influência da mastite induzida por enterotoxina estafilocócica no teor de gordura do leite bovino. Arq. Esc. Vet. UFMG, 28(2) : 181-187, 1976.

- SANTOS, E.C. & MOREIRA, H.H. Influência da mastite induzida por enterotoxina estafilocócica na produção de leite bovino. Arq. Esc. Vet. UFMG, 29 (1): 11-17, 1977.
- SCHALM, O.W. A syllabus on the mamary glands in health and disease. Davis, USA University of California, 1956 167p.
- SCHALM, O.W. & NOORLANDER, D.D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. J. Amer. Vet. Med. Res., 130 (5): 199-204, 1957.
- SCHMIDT, G.H. Biologia de la lactacion. Zaragoza (Espanã) Acribia, 1971. 307p.
- SILVA, F.S. & PORTO, E. The value of Whiteside test in detecting chronic mastitis. II-Efficiency of the Whiteside and other indirect tests in detecting udder infections. Bol. Ind. Animal., 22: 181-190, 1964.
- SINGH, K.B. & BAXI, K.K. Studies on the incidence and diagnosis of subclinical mastitis in milk animals. Indian Vet. J., 57:723-729, 1980.
- SJOLLEMA, B. & VAN DEN ZANDE, J.E. 1922 apud EL-NAGGAR, M. A. Una reacion sencilla para el diagnóstico de la mastite bovina. Not. Med. Vet., 3:219-225, 1973.
- SOARES FILHO, F. Valor da prova de Hotis para evidenciar no leite a presença de estreptococos da mastite. Bol. Ind. Animal., 7:57-63, 1944.

- SPERBER, E.H. & TATINI, S.R. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *S.aureus*. Appl. Microbiol., 29: 502-505, 1975.
- STANDARD Methods for the Examination of Dairy Products. 13th ed. Washington, DC., Willian & Hausler, 1972, 345p.
- SUBCOMMITTEE on Screening Tests National Mastitis Council. Direct microscopic somatic cell count in milk. J.Milk. Food Techn., 31 (11): 350-354, 1968.
- TAPERNOUX, A.; MAGAT, A.; FERNEY, J.; SAINT-AUBERT, G. Sodium and potassium content of mastitis milk. Rev.Med. Vet., 118: 185-196, 1967.
- THOMPSON, D.J. & POSTLE, D.S. The Wisconsin mastitis test: an indirect estimative of leucocytes in milk. Rev.Milk Food Techn., 27:271-275, 1964.
- TOLLE, A. A monograph on bovine mastitis. A. Bull. Int. Dairy Fed., 1-23, 1971.
- VEISSEYRE, R. Lactologia técnica. Zaragoza (Espanã), Acribia, 1972. 643p.
- WAHBY, A.M. & NARS, S. A rapid laboratory method for diagnosis of bovine mastitis. Zbl. Vet. Med., 4: 341-358, 1957.
- WAITE, A.R. & BLACKBURN, P.S. The chemical composition and cell count of milk. J. Dairy Res., 24: 328-339, 1957.

WHELLOCK, J.V.; ROOK, J.A.F.; NEAVE, F.K.; DODD, F.H. The effect of bacterial infection of the udder on the yield and composition of cow's milk. J. Dairy Sci., 33:119-215, 1966.

WILLIS, A.T. Anaerobic bacteriology. London, Butterworth. 1960. 305p.

WITTLESTONE, W.G. Behavioral stress and the cell count of bovine milk. Can. Public Health J., 30: 44-56, 1970.

A N E X O S

Meios de cultivo utilizados e seu preparo

Agar para contagem padrão em placas

Eram adicionadas 23,5 gramas de meio em 1000ml de água destilada fria. Em seguida, aquecia-se a mistura até o ponto de ebulição, de modo a dissolver o meio completamente e, esterilizava-se em autoclave, durante 15 minutos a 121°C. O pH final do meio era de, aproximadamente, 7,0.

Agar *Staphylococcus* 110 (Difco)

Adicionavam-se 149 gramas do meio em 1000 ml de água destilada fria. Em seguida, aquecia-se a mistura até o ponto de ebulição, de modo a dissolver o meio completamente e, esterilizava-se em autoclave, durante 15 minutos a 121°C. O pH final do meio era de, aproximadamente, 7,0. Após sua esterilização e enquanto ainda quente, o meio era vertido em placas de Petri em volume de, aproximadamente, 10,0 ml. Após a solidificação do ágar em temperatura ambiente, as placas eram mantidas em geladeira a 4°C.

Agar Baird-Parker (Oxoid)

Adicionavam-se 63 gramas do meio em 1000 ml de água destilada fria. Em seguida, aquecia-se a mistura até o ponto de ebulição, de modo a dissolver o meio completamente e, esterilizava-se em autoclave, durante 15 minutos a 121°C. Após a esterilização, o meio era resfriado a 50°Ce, assépticamente, adicionavam-se 50 ml de emulsão de gema de ovo a 50% (BAIRD-PARKER, 1962) e 3,0 ml de solução aquosa de telurito de potássio a 3,5%, esterilizada por filtração em filtro Seitz. Após a mistura, vertia-se o meio em placas de Petri em volume de, aproximadamente, 10,0 ml. Após a solifi-

cação do ágar em temperatura ambiente, as placas eram mantidas sob refrigeração. O pH final do meio era de, aproximadamente, 6,8.

Caldo infusão com cérebro e coração

Eram adicionados 37 gramas de caldo desidratado de infusão de cérebro e coração em 1000 ml de água destilada. Após a homogeneinização, distribuía-se o meio em volumes de 2,0 ml em tubos de ensaio (12x120mm) e, em seguida, esterilizava-se em autoclave, durante 15 minutos a 121°C. O pH final do meio era de, aproximadamente, 7,4.

Meio para o teste de oxidação e fermentação da glicose (O-F)

Fórmula:

triptona-----	10 g.
extrato de levedura-----	1 g.
glicose-----	10 g.
púrpura de bromocresol-----	0,04 g.
ágar-----	2 g.

Preparo:

Estes ingredientes eram adicionados a 1000 ml de água destilada. Em seguida, aquecia-se a mistura até o ponto de ebulição, de modo a dissolver o meio completamente. Após a agitação, distribuía-se o produto em tubos de ensaio (10x150 mm), enchendo-os até dois terços de sua capacidade e, esterilizava-se em autoclave, durante 15 minutos a 121°C. O pH do meio era de, aproximadamente, 7,0. Este meio, após o seu preparo era mantido sob refrigeração a 4°C.

Agar DNase (Oxoid)

Eram adicionados 39 gramas do meio em 1000 ml de água destilada. Em seguida, aquecia-se a mistura até o ponto

de ebulição, de modo a dissolver o meio completamente e, esterilizava-se em autoclave, durante 15 minutos a 121°C. O pH final do meio era de, aproximadamente, 7,3. Depois da esterilização, vertiam-se cerca de 10,0 ml do meio ainda quente, em placas de Petri, as quais, após a solidificação do ágar em temperatura ambiente, eram mantidas em geladeira a 4°C.

Agar manitol salgado (Difco)

Adicionavam-se 111 gramas do meio em 1000 ml de água destilada fria. Em seguida, aquecia-se a mistura até o ponto de ebulição, de modo a dissolver o meio completamente e, esterilizava-se em autoclave, durante 15 minutos a 121°C. O pH final do meio era de, aproximadamente, 7,4. Após a esterilização, vertiam-se cerca de 10,0 ml do meio ainda quente em placas de Petri que, após a solidificação do ágar em temperatura ambiente, eram mantidos em geladeira a 4°C.

Agar sangue básico (Oxoid)

Dissolviam-se 40 gramas do meio em 1000 ml de água destilada. Em seguida, aquecia-se até o ponto de ebulição, de modo a dissolver o meio completamente e, esterilizava-se em autoclave durante 15 minutos a 121°C. Após a esterilização, resfriava-se o meio base a 50°C e, adicionavam-se 5% de sangue de carneiro desfibrinado. Em seguida, efetuava-se a homogeneização do meio e a sua distribuição em placas de Petri, em volume de 10,0 ml, aproximadamente. Após a solidificação do ágar em temperatura ambiente, as placas eram mantidas em refrigeração a 4°C. O pH final do meio era de, aproximadamente, 7,3.

Agar NI (ITO & cols., 1969)

Eram adicionadas 8 gramas de caldo nutriente(Difco) em 1000 ml de água destilada, sendo este meio esteriliza

do em autoclave durante 15 minutos a 121°C. O pH final do meio era de, aproximadamente, 6,8. Posteriormente, a cada 100 ml de caldo nutriente, juntavam-se 5,0 gramas de cloreto de sódio e 1,5 gramas de ágar e, efetuava-se, a seguir, a esterilização em autoclave durante 20 minutos a 121°C. Após a esterilização, adicionava-se, assépticamente, ao meio resfriado a 50°C, 1,0 ml de emulsão de gema de ovo a 50% (10,0 ml de gema adicionados a 10,0 ml de solução fisiológica fenicada a 0,2%). Em seguida, o meio era distribuído em placas de Petri, as quais, após a solidificação do meio em temperatura ambiente, eram mantidas em refrigerador a 4°C.

Meio de Edwards (Oxoid)

Adicionavam-se 41 gramas do meio em 1000 ml de água destilada. Em seguida, aquecia-se até o ponto de ebulição, de modo a dissolver o meio completamente e, esterilizava-se em autoclave, durante 20 minutos a 115°C. Após a esterilização, o meio era resfriado a 50°C e, assépticamente, adicionavam-se 5% de sangue de carneiro desfibrinado. Em seguida, efetuava-se a homogeneização do meio e a distribuição em placas de Petri, em volumes de 10,0 ml, aproximadamente. Após a solidificação do ágar em temperatura ambiente, as placas eram mantidas em geladeira a 4°C.

Ágar sangue azida básico (Difco)

Adicionavam-se 30 gramas do meio desidratado em 1000 ml de água destilada. Em seguida, aquecia-se até o ponto de ebulição, de modo a dissolver o meio completamente e, esterilizava-se em autoclave, durante 15 minutos a 121°C. Após a esterilização, o meio era resfriado a 50°C e, assépticamente, adicionavam-se 5% de sangue de carneiro desfibrinado. Em seguida, efetuava-se a homogeneização do meio e a

distribuição em placas de Petri, em volume de 10,0 ml, aproximadamente. Após a solidificação do meio em temperatura ambiente, as placas eram mantidas em geladeira a 4°C. O pH final do meio era de, aproximadamente, 7,2.

Meio para hidrólise do hipurato de sódio (BIER, 1975).

Adicionavam-se 0,8 gramas de caldo simples (Difco) em 100 ml de água destilada. Em seguida, aquecia-se até o ponto de ebulição, de modo a dissolver o meio completamente e, esterilizava-se em autoclave, durante 15 minutos a 121°C. Após a esterilização, juntava-se a este meio, 1,0 grama de hipurato de sódio, sendo esta mistura submetida a esterilização através de membrana filtrante ("Millipore"). Em seguida, o meio era distribuído em tubos de ensaio (10x100 mm), previamente esterilizados, os quais eram mantidos em geladeira a 4°C.

Meio para hidrólise da esculina (DEMETER, 1969)

Fórmula:

peptona-----	1,5 g.
bile-----	0,5 g.
esculina-----	0,1 g.
citrato de ferro-----	0,05 g.

Preparo:

Estes ingredientes eram adicionados a 100 ml de água destilada e, a mistura aquecida até o ponto de ebulição, de modo a dissolver o meio completamente. Em seguida, esterilizava-se este meio através de membrana filtrante ("Millipore"). Posteriormente, o meio era distribuído em tubos de ensaio (10x100 mm), previamente esterilizados, os quais eram mantidos em geladeira a 4°C.

Meio basal com vermelho de fenol para fermentação de carboidratos e álcoois (Difco)

Adicionavam-se 16 gramas do meio basal com vermelho de fenol em 1000 ml de água destilada. Em seguida, aquecia-se a mistura até o ponto de ebulição, de modo a dissolver o meio completamente e, distribuía-se em balões volumétricos de 100 ml. Posteriormente, efetuava-se a esterilização em autoclave, durante 15 minutos a 121°C. Após a esterilização, adicionava-se 1,0 ml das soluções de carboidratos e álcoois (arabinose, maltose, sacarose, trealose, rafinose, inulina, glicerina, manitol, sorbitol, salicina e amido) a 10% nos balões respectivos, sendo estas soluções esterilizadas previamente, através da filtração em membrana filtrante ("Millipore").

Ágar eosina azul de metileno (Difco)

Adicionavam-se 27,5 gramas do meio em 1000 ml de água destilada fria. Em seguida, aquecia-se a mistura até o ponto de ebulição, de modo a dissolver o meio completamente e, esterilizava-se em autoclave, durante 15 minutos a 121°C. O pH final do meio era de, aproximadamente, 7,0. Após sua esterilização e enquanto ainda quente, o meio era vertido em placas de Petri em volumes de, aproximadamente, 10,0 ml. Após a solidificação do ágar em temperatura ambiente, as placas eram mantidas a 4°C.

Ágar MacConkey (Difco)

Adicionavam-se 50 gramas do meio em 1000 ml de água destilada fria. Em seguida, aquecia-se a mistura até o ponto de ebulição, de modo a dissolver o meio completamente e, esterilizava-se em autoclave, durante 15 minutos a 121°C. O pH final do meio era de, aproximadamente, 7,1. Após sua esterilização e enquanto ainda quente, o meio era vertido em placas de

Petri em volumes de, aproximadamente, 10,0 ml. Depois da solidificação do meio em temperatura ambiente, as placas eram mantidas em geladeira a 4°C.

Meio de Loëffler (Difco)

Adicionavam-se 80 gramas do meio em 1000 ml de água destilada aquecida (42-45°C). Em seguida, retirava-se por filtração, os componentes insolúveis do meio e, efetuava-se a distribuição da mistura em tubos de ensaio rosqueáveis, os quais eram colocados na autoclave em posição inclinada. Fechava-se a tampa e os orifícios da autoclave, antes de dar o vapor, de modo a manter a mistura de ar a vapor, necessária para a coagulação do meio, efetuada durante 10 minutos sob uma pressão de 10 libras. Posteriormente, purgava-se a mistura de ar e vapor e, aumentava-se o vapor de modo a atingir 121°C, sendo esta temperatura mantida durante 15 minutos. O resfriamento era efetuado na própria autoclave. O pH final do meio era de, aproximadamente, 7,2.

Ágar dextrose-proteose nº 3 com sangue e telurito de potássio (Difco)

Adicionavam-se 40 gramas do meio em 1000 ml de água destilada fria. Em seguida, aquecia-se a mistura até o ponto de ebulição, de modo a dissolver o meio completamente e, esterilizava-se em autoclave, durante 15 minutos a 121°C. Após a esterilização, o meio era resfriado a 50°C e, assépticamente, adicionavam-se 5,0 ml de solução de sangue com telurito de potássio (sangue de bovino desfibrinado com 1% de telurito de potássio) a cada 100 ml de meio ágar dextrose-proteose. Em seguida, aquecia-se a mistura a 75-80°C, até o aparecimento da tonalidade do ágar chocolate e, resfriava-se a 50°C. Após este resfriamento, vertia-se o meio em placas de Petri em vólu

mes de, aproximadamente, 10,0 ml. Depois da solidificação do
ágar em temperatura ambiente, as placas eram mantidas em ge-
ladeira a 4°C.