

**Universidade Federal de Juiz de Fora**

**Pós-graduação em Ciências Agrárias**

**Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados**

**João Emídio Ferreira Lopes Júnior**

**CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E LIBERAÇÃO DE BACTÉRIAS DE  
QUARTOS MAMÁRIOS DE VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA**

**Juiz de Fora**

**2010**

**João Emídio Ferreira Lopes Júnior**

**CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E LIBERAÇÃO DE BACTÉRIAS DE  
QUARTOS MAMÁRIOS DE VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Nunes de Souza

Juiz de Fora

2010

Lopes Júnior, João Emídio Ferreira.

Contagem de células somáticas e liberação de bactérias de quartos mamários de vacas com mastites subclínicas / João Emídio Ferreira Lopes Júnior. – 2010.

69 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite)–  
Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.

1. Mastite animal. 2. Células somáticas. 3. Bactérias. I. Título.

CDU 619:618.19-002

**CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E LIBERAÇÃO DE BACTÉRIAS DE  
QUARTOS MAMÁRIOS DE VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA**

**João Emídio Ferreira Lopes Júnior**

Orientador: Guilherme Nunes de Souza

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Aprovada em 23/12/2010

---

**Prof. Dr. Walter Lilenbaum**

---

**Prof. Dr. Alziro Vasconcelos Carneiro**

---

**Profa. Dra. Miriam Aparecida de Oliveira Pinto**

---

**Prof. Dr. Guilherme Nunes de Souza**

Ao colega Adbel Lima Santos que já nos faz  
muita falta

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe e ao meu pai (em memória), pelo belo exemplo de vida, retidão de caráter e superação de esforços, a vocês devo tudo;

A minha amada esposa, pelo apoio e compreensão nos momentos mais difíceis;

Aos meus amados filhos, Patrícia e Gustavo, pelo carinho e motivação;

Ao meu irmão Flávio pelo auxílio no abstract;

Aos colegas do mestrado, aprendi muito com todos;

Aos professores, pela dedicação e profissionalismo;

Ao meu orientador, Dr. Guilherme Nunes de Souza, que mostrou novas perspectivas;

A Dr<sup>a</sup>. Miriam Aparecida de Oliveira Pinto e Dr. Alziro Vasconcelos Carneiro pela orientação na escrita desta dissertação;

Enfim, a todos que me auxiliaram na execução desta pesquisa e ao grupo de profissionais e empresas que contribuíram na criação do Mestrado Profissionalizante em Leite e Derivados, meu muito obrigado.

*“Se você quer transformar o mundo, experimente primeiro promover o seu aperfeiçoamento pessoal e realizar inovações no seu próprio interior.”*

Dalai Lama  
(FRASES... , 2011)

## RESUMO

Resultados de 2007 mostram a incontestável importância da cadeia produtiva do leite para o Brasil. Apesar disso, recentes publicações evidenciam um cenário de má qualidade no leite de uma significativa parte dos rebanhos. Dentro da conjuntura de economia global, a má qualidade configura um obstáculo para consolidação do País como exportador de lácteos. Na reversão deste quadro, duas iniciativas governamentais merecem destaque. A implantação da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite e a adoção de indicadores da qualidade do leite: contagem de células somáticas (CCS) e contagem total bacteriana (CTB). A CCS estima os níveis de mastite em rebanhos, refletindo a resposta inflamatória frente à invasão da glândula mamária. A CTB indica a qualidade microbiológica, estimulando os cuidados durante a ordenha e conservação do leite nas fazendas. O leite pode ser contaminado por três principais fontes bacterianas: pele dos tetos e úbere, superfície dos equipamentos e pelo interior das glândulas. A mastite consiste no estado inflamatório da glândula mamária, geralmente por etiologia infecciosa. Apresenta-se na forma clínica, com leite alterado e sintomatologia local a sistêmica, ou na subclínica, com total ausência de sinais. A forma subclínica é de grande relevância pela sua altíssima prevalência, de 15 a 40 vezes mais que a clínica, com redução da secreção láctea, aumento das bactérias e da CCS no leite. A resposta inflamatória associada às mastites classifica seus patógenos como principais, pelo grande aumento na CCS (*S. aureus*, *S. agalactiae*, coliformes, *Streptococcus* spp. que não *S. agalactiae*), e secundários, pela menor resposta inflamatória e pequena variação na CCS (*Staphylococcus* coagulase negativos e *Corynebacterium bovis*). Deste modo, a variação da CCS estima a resposta inflamatória segundo os diferentes patógenos da mastite. A quantidade de bactérias liberadas no leite também sofre variação conforme os patógenos envolvidos. Estudos nos Estados Unidos e Europa associam mastites pelo gênero *Streptococcus* spp. à repentinos picos de CTB, enquanto *S. aureus* a pequenas elevações na contagem bacteriana em rebanhos. O objetivo geral do trabalho é quantificar o efeito dos patógenos da mastite subclínica (*S. aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativos, *S. agalactiae* e *Streptococcus* spp. que não *S. agalactiae*) na variação da CCS e da liberação de bactérias pelos quartos mamários (LBQM). O objetivo secundário consta do estudo das relações entre os resultados conforme o patógeno isolado. De junho a dezembro de 2009, três amostras de 638 quartos assepticamente preparados foram colhidas para provas de bacteriológicas de identificação dos patógenos da mastite, CCS e CTB. O programa SPSS calculou as estatísticas descritivas, teste t e modelos

de regressão linear. As médias geométricas das CCS (células/mL) e CTB (UFC/mL) de acordo com os patógenos foram respectivamente: sem crescimento (52.000; 12.000), estafilococos coagulase negativa (85.000; 17.000), *Staphylococcus aureus* (587.000; 77.000), *Streptococcus* spp. que não o *S. agalactiae* (432.000; 108.000) e *Streptococcus agalactiae* (1.572.000; 333.000). Os resultados sugerem que quanto maior a intensidade do processo inflamatório, maior liberação de bactérias pela glândula mamária e que a CCS é uma ferramenta útil no controle da mastite, mais também na manutenção de baixas CTB.

Palavras-chave: Mastite. Células somáticas. Liberação de bactérias

## ABSTRACT

Results of 2007 show the importance of the milk productive chain in Brazil. In spite of this fact, recent publications indicate the poor quality of milk from a significant number of herds. Considering the global economy, the low quality of milk configures an obstacle for the consolidation of the Country as a milk exporter. In order to reverse this situation, two governmental initiatives deserve consideration. The deployment of the Brazilian Milk Quality Control Lab Net and the adoption of raw milk quality indicators: somatic cell counting (SCC) and total bacterial counting (TBC). The SCC signs the levels of mastitis in herds, reflecting the inflammatory response to the invasion of mammary gland. The TBC indicates the microbiological quality of milk, demonstrates the care of milking and the conservation of milk in the farms. Milk can be contaminated by three main bacterial sources: skin of the teats, surface of the equipment and the inner side of the glands. Mastitis is the inflammatory state of mammary glands, generally caused by infection. It is observed in clinical form, with modified milk properties and local symptoms, or in sub-clinical form, with total absence of signals. However, this last one is most relevant for its highly prevalence (from 15 to 40 times more than the clinical form), reduction of secretion, increase of bacteria and SCC in milk. The inflammatory response to mastite classifies its pathogens as principal, for great SCC (*S. aureus*, *S. agalactiae*, coliforms and *Streptococcus* spp. that not *S. agalactiae*) increase, and secondary, for less inflammatory response with small variation in the SCC (Coagulase negative staphylococci and *Corynebacterium bovis*). In this way, the SSC of milk can measure variation of the inflammatory response by the pathogens of the mastitis. The amount of bacteria released in milk also varies with the pathogens. In the United States and Europe, infections of the group *Streptococcus* spp. had caused sudden peaks while *S.aureus* caused small rises in the TBC of herds. The general goal of this work is to evaluate the effect of sub-clinic mastitis pathogens (*S. aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativos, *S. agalactiae*, *Streptococcus* spp. that not *S. agalactiae*) on the variation SCC and the magnitude of bacteria shedding by the mammary quarter (BSMQ). A secondary objective is the study of relations between the results as the pathogen isolated. From 2009, June to 2009, December, three samples of 638 mammary quarters aseptically prepared had been collected for bacteriological tests, SCC and TBC. The SPSS program calculated descriptive statistics, t test and linear regression. The SCC (cell/mL) and TBC (CFU/mL) geometric means results, according to the isolated pathogens, have been respectively: without growth (52.000; 12.000), coagulase

negative staphylococci (85.000; 17.000), *Staphylococcus aureus* (587.000; 77.000), *Streptococcus* spp. not *S. agalactiae* (432.000; 108.000) and *Streptococcus agalactiae* (1.572.000; 333.000). The results suggest that the more intense is inflammatory process the grater release of bacteria by the mammary gland will be. It also suggests that SCC is a useful tool for controlling mastitis and maintaining TBC decreases.

Key words: Mastitis. Somatic cells. Bacteria shedding

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Varição da contagem de células somáticas no leite de rebanhos de acordo com o percentual de vacas em lactação com infecção intramamária causadas por <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i>	23
Quadro 2	Varição da contagem de células somáticas de acordo com a presença de infecção intramamária e tipo de agente etiológico.	24
Quadro 3	Efeitos das infecções subclínicas na contagem de células somáticas de quartos mamários.	25

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estatísticas descritivas para contagens de CCS de quartos mamários de acordo com os resultados dos exames bacteriológicos.	46
Tabela 2	Estatísticas descritivas para a CTB do leite dos quartos mamários de acordo com os resultados dos exames bacteriológicos.	47
Tabela 3	Estatística das diferenças entre as médias da contagem de células somáticas ( $\log_{10}CCS$ ) e contagem total bacteriana de quartos mamários ( $\log_{10}CTB$ ) do leite de quartos mamários de acordo com os resultados dos exames bacteriológicos.	48
Tabela 4	Análise da correlação e regressão linear simples para CCS ( $\log_{10}CCS$ ) e CTB ( $\log_{10}CTB$ ) do leite de quartos mamários de acordo com os resultados dos exames bacteriológicos.	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C	Conforme
CBQL	Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite
CCS	Contagem de células somáticas
CTB	Contagem total bacteriana
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ESCNEG	<i>Streptococcus</i> spp. esculina negativos
ESCPOS	<i>Streptococcus</i> spp. esculina positivos
EST	estrato seco total
IIM	Infecção intramamária
IIM	Infecções Intramamárias
IN51	Instrução Normativa N°51 de 18 de setembro de 2002.
LBQM	Liberação de bactérias de quartos mamários
log <sub>10</sub> CCS	Logaritmo na base 10 da Contagem de Células Somáticas
log <sub>10</sub> CTB	Logaritmo na base 10 da Contagem Total Bacteriana
mL	Mililitro
NC	Não conforme
P/V	Peso/volume
ppm	Partes por milhão
RBQL	Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite
SCN	Estafilococos coagulase negativo
UFC	Unidades formadoras de colônias

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 CARACTERIZAÇÃO DA MASTITE BOVINA.....	18
2.1.1 Formas de apresentação da mastite em bovinos.....	18
2.2 CLASSIFICAÇÃO DOS PATÓGENOS QUANTO À RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	19
2.3 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS.....	19
2.3.1 A CCS do leite do rebanho.....	22
2.3.2 A CCS do leite de vacas.....	23
2.3.3 A CCS do leite de quartos mamários.....	24
2.4 CLASSIFICAÇÃO DOS PATÓGENOS DE ACORDO COM AS FORMAS DE TRANSMISSÃO.....	25
2.5 PATÓGENOS PRIMÁRIOS.....	26
2.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	26
2.5.2 <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	28
2.5.3 <i>Streptococcus</i> spp. que não <i>S. agalactiae</i> .....	30
2.5.3.1 <i>Streptococcus dysgalactiae</i> .....	31
2.5.3.2 <i>Streptococcus uberis</i> .....	32
2.6 PATÓGENOS SECUNDÁRIOS.....	33
2.6.1 <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase negativo e <i>Corynebacterium</i> spp.....	33
2.7 FONTES DE CONTAMINAÇÃO BACTERIANA DO LEITE.....	34
2.7.1 A influência dos patógenos da mastite na contaminação bacteriana do leite.....	35
2.7.2. Patógenos da mastite como fator da variação da resposta celular e da liberação de bactérias no leite.....	36
3 OBJETIVOS.....	38
3.1 OBJETIVO GERAL.....	38
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	38

<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA ORIGEM E PERÍODO DE COLETA DAS AMOSTRAS.....	39
4.1.1 <b>Procedimento de amostragem.....</b>	<b>39</b>
4.1.2 <b>Preparo dos tetos anterior a amostragem.....</b>	<b>39</b>
4.1.2.1 Critérios adotados no diagnóstico dos animais com mastite clínica.....	40
4.1.3 <b>Amostragem do leite dos quartos.....</b>	<b>40</b>
4.1.4 <b>Identificação, acondicionamento e transporte das amostras.....</b>	<b>41</b>
4.2 EXAMES BACTERIOLÓGICOS.....	41
4.2.1 <b>As amostras excluídas.....</b>	<b>42</b>
4.3 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS.....	42
4.4 CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS.....	43
4.4.1 <b>Estimativa da liberação de bactérias dos quartos mamários através da CTB do leite.....</b>	<b>43</b>
4.5 AS ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	44
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>66</b>

## 1 INTRODUÇÃO

No ano de 2007 o Brasil ocupou a sexta posição entre os 15 maiores produtores de leite no mundo (PRINCIPAIS, 2010), com uma produção aproximada de 26 bilhões de litros de leite, que correspondeu ao valor bruto de 15 bilhões de reais. Na geração destes resultados o agronegócio do leite envolveu cerca de cinco milhões de pessoas, dentre estas um milhão e trezentos mil produtores de leite no segmento primário da cadeia (ZOOCAL et al., 2008).

Apesar da incontestável importância da cadeia produtiva do leite para o Brasil, tanto pelos resultados econômicos como pela sua capacidade fixação de mão de obra no campo (ZOOCAL et al., 2008), estudos recentes mostram um panorama de baixa qualidade para o leite produzido em diversos rebanhos (BELOTI et al., 2010; CARVALHO et al., 2010; MEDEIROS et al., 2010; KOLLING et al., 2010; SOUZA et al., 2010; TOMAZI et al., 2010). Nos anais do III Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite (CBQL) (BARBOSA et al., 2008a), realizado no ano de 2008, foram publicados seis trabalhos sobre a qualidade do leite com fundamento nos resultados laboratoriais originados pela Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL). Destes seis trabalhos, apenas um, referente ao Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros do Paraná, apresentou um quadro satisfatório. Segundo os autores “programas de monitoramento voltados à melhoria da qualidade... ..tem tido resultados positivos na melhoria do leite de seus produtores” (HORST; VALLOTO, 2008, p. 44). Nos demais cinco estudos, MESQUITA et al. (2008), BARBOSA et al. (2008b), CASSOLI et al. (2008), FONSECA et al. (2008) e SOUZA et al. (2008), há um preocupante consenso de má qualidade no leite produzido em vários rebanhos nas diferentes regiões brasileiras (Apêndice 1).

Considerando os desafios decorrentes da conjuntura econômica global, a cadeia brasileira do leite está exposta a acirrada competição existente no mercado global de lácteos (DÜRR, 2004). Tradicionalmente, os países líderes em exportações conquistaram esta posição graças ao bom desempenho da sua cadeia produtiva, possuindo produtores com excelência no desempenho da atividade, ou como no caso de países europeus e nos Estados Unidos, com auxílio de pesados subsídios (ZOOCAL et al., 2008). Dentro deste cenário, o diagnóstico da má qualidade no leite passa a ter uma grande importância estratégica, um verdadeiro obstáculo a ser vencido para a solidificação da posição do Brasil como um exportador de lácteos competitivo (DÜRR, 2004).

Vários esforços estão sendo realizados para melhoria da qualidade do leite. O governo federal realizou duas importantes iniciativas que merecem destaque. A instituição da RBQL (DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, 2002), composta por oito laboratórios estrategicamente distribuídos pelas cinco macrorregiões do País objetivando analisar o leite produzido nos seus diversos rebanhos. A segunda medida foi a publicação da Instrução Normativa N°51 (IN51), de 18 de setembro de 2002 (BRASIL, 2002), que implementou o uso de novos indicadores para avaliação da qualidade do leite cru, a contagem de células somáticas (CCS) e a contagem total bacteriana (CTB). Estes dois indicadores conseguem avaliar a saúde da glândula mamária dos animais ordenhados e as práticas adotadas durante a obtenção e conservação do leite nas fazendas produtoras (HARMON, 1994; SOUZA et al., 2010)

Há mais de 50 anos que a CCS vem sendo utilizada como uma ferramenta na avaliação da qualidade do leite e na indicação dos índices de mastite em rebanhos (PAAPE; CONTRERAS, 1997). A invasão da glândula mamária por bactérias patogênicas resulta em uma resposta inflamatória, com o aumento da CCS, que também pode ser influenciada pelo estado nutricional, estágio de lactação, idade, stress, além do tipo de patógeno envolvido. Contudo, a maior fonte de variação celular do leite são as infecções intramamárias (IIM), uma vez que a atração dos leucócitos do leite vascular para o leite, formando as células somáticas do leite propriamente ditas, depende da liberação de citocinas pró-inflamatórias que ocorrem durante as mastites (HARMON, 1994). As altas CCS do leite afetam negativamente a sua composição, a produtividade e a qualidade dos seus derivados (KITCHEN, 1981).

A CTB é um importante indicador da qualidade microbiológica do leite cru e estima o número total de bactérias existentes em um mL de amostra de leite (JAYARO; WOLFGANG, 2003). Ela pode indicar de forma bruta a saúde do rebanho e a eficácia no armazenamento do leite nas fazendas (HAYES et al., 2001). As contaminações bacterianas do leite podem ser originadas por três as principais fontes: a pele dos tetos e úbere, a superfície dos equipamentos e utensílios e as glândulas mamárias infectadas (MURPHY; BOOR, 2010).

A mastite bovina designa o processo inflamatório da glândula mamária, que em geral, possui uma etiologia infecciosa. Diversos grupos de microrganismos foram associados a esta doença, com mais de 135 agentes etiológicos identificados (WATTS, 1988). Tradicionalmente apenas um pequeno grupo de cinco bactérias responde pela grande maioria dos casos: *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus. agalactiae* (LEIGH, 1999).

Apesar do vasto arsenal de mecanismos que o sistema imunológico apresenta, é evidente que as bactérias patogênicas conseguem causar infecções nos seus hospedeiros,

como consequência da capacidade de evitar, burlar, subverter, entre outras maneiras, o sistema de defesa (BOERLIN, 2010). Os fatores de virulência bacterianos são os mecanismos utilizados pelos patógenos na colonização e sobrevivência no úbere. (LEHTOLAINEN et al., 2003). Entre os diversos fatores de virulência conhecidos, pode-se citar o fator CAMP do *S. agalactiae* com ação citotóxica nas células mamárias, causando a liberação de mediadores da quimiotaxia de células somáticas (TIMONEY, 2010). *S. aureus* possui a capacidade de sobreviver dentro de macrófagos e formar biofilmes nos tecidos graças às propriedades da cápsula bacteriana (HERMANS et al., 2010).

Dentro do exposto, a resposta inflamatória da glândula é influenciada pelo patógeno envolvido (BOERLIN, 2010), sendo este efeito mensurável pela CCS do leite (HARMON, 1994). O quantitativo de bactérias no leite também sofre influência dos patógenos da mastite. Trabalhos nos Estados Unidos e Europa provaram que patógenos do gênero *Streptococcus* spp. foram causadores de repentinos aumentos na CTB do leite de rebanhos e *S. aureus* associado à pequena elevação na contagem bacteriana (GONZALEZ et al, 1986; HAYES et al., 2001; RYSANEK; BABAK, 2005; ZADOKS et al., 2004).

Este trabalho foca nos efeitos específicos dos patógenos da mastite subclínica na variação da CCS e na liberação de bactérias pelos quartos mamários (LBQM), com o propósito de estabelecer a magnitude da liberação celular e bacteriana, e suas possíveis relações, de acordo com os patógenos identificados.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CARACTERIZAÇÃO DA MASTITE BOVINA

A mastite bovina é definida como o processo inflamatório da glândula mamária possuindo geralmente uma etiologia infecciosa. É uma das doenças que mais geram prejuízos a cadeia produtiva do leite em todo o mundo (HARMON, 1994). Diversos grupos de microrganismos já foram associados a esta doença como bactérias, micoplasmas, leveduras e algas (BRADLEY, 2002). Já foram identificados mais de 135 patógenos causadores de IIM (WATTS, 1988). Entretanto constata-se que apenas um seletivo grupo formado por cinco bactérias responde pela grande maioria dos casos: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* (LEIGH, 1999). Trata-se de uma doença de alta complexidade com determinantes de ocorrência multifatoriais e dependentes das possíveis interações entre hospedeiro, ambiente e patógenos (LeBLANC et al., 2006).

#### 2.1.1 Formas de apresentação da mastite em bovinos

As IIM em bovinos podem variar quanto à forma de apresentação da doença. A forma clínica geralmente é evidenciada pelo leite anormal no exame dos primeiros jatos (prova do tamis ou da caneca de fundo escuro) antes da ordenha ou pelos dos sintomas de inflamação no quarto mamário, como edema e dor, que podem vir acompanhados de sintomas sistêmicos, como temperatura retal elevada, letargia e falta de apetite (HARMON, 1994).

A forma subclínica caracteriza-se pela total ausência de sintomas no quarto mamário acometido e no leite secretado. É relacionada à diminuição da capacidade secretora, liberação de bactérias no leite, alterações na contagem celular e na composição do leite (HARMON, 1994; SANTOS; FONSECA, 2007). Os casos subclínicos são de quinze a quarenta vezes mais freqüente que os casos clínicos (PHILPOT; NICKERSON, 1991).

## 2.2 CLASSIFICAÇÃO DOS PATÓGENOS QUANTO À RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Os patógenos da mastite podem ser classificados em função da intensidade da resposta inflamatória devido a uma IIM como principais e secundários. Os patógenos principais são *S. aureus*, *S. agalactiae*, os coliformes (principalmente *Klebsiella spp.* e *E. coli*), *Streptococcus spp.* que não *S. agalactiae* (principalmente *S. dysgalactiae* e *S. uberis*) e os enterococos de origem ambiental. Não comumente podem ocorrer casos isolados ou surtos de mastite por *Pseudomonas spp.*, *Actinomyces pyogenes*, *Serratia spp.* e por outros não usuais. Os processos inflamatórios nas infecções por estes patógenos causam grandes alterações na composição do leite e significativos aumentos nas CCS, por este motivo são responsáveis pelas maiores perdas econômicas entre todos os agentes etiológicos da mastite. São considerados como patógenos secundários da mastite os estafilococos coagulase negativos (SCN) e *Corynebacterium bovis* (*C. bovis*). São capazes de produzir uma moderada inflamação da glândula mamária com um pequeno aumento da CCS. Nestes casos, não há grande redução na produção de leite e são pouco associados à mastite clínica (HARMON, 1994).

## 2.3 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS

Quando bactérias invadem a glândula mamária e se multiplicam no leite, iniciam uma resposta inflamatória do sistema de defesa dos hospedeiros. A colonização bacteriana leva a produção de toxinas, enzimas e componentes da parede celular bacteriana que causam efeitos nas funções do epitélio glandular e a produção de numerosos mediadores da inflamação que induzem a quimiotaxia de leucócitos do leite vascular para a glândula. Estas células, ao migrarem do sangue para o leite passam a ser designadas com células somáticas. Estas alterações podem estar diretamente envolvidas na patogênese da mastite. (HARMON, 1994). A CCS do leite é um parâmetro usado em programas de controle e prevenção da mastite em todo o mundo. Nos últimos 50 anos ocorreu uma evolução da qualidade do leite devido ao uso do parâmetro de CCS na avaliação dos índices da mastite (PAAPE; CONTRERAS, 1997).

Desde sua introdução na década de 1960, a contagem celular do leite de vacas tem sido usada amplamente na América do Norte como ferramenta para monitorar os níveis de mastite em rebanhos leiteiros (DOHOO; LESLIE, 1991). O uso da CCS para monitorar a saúde do úbere tem provado ser uma ferramenta valiosa para identificar vacas infectadas por *S. aureus* e *S. agalactiae* (KEHRLI; SHUSTER, 1994). Vários fatores podem causar a variação da CCS, como a ordem de parto, período de lactação, mês e estação do ano, entre outros, porém o estado de infecção da glândula é o principal fator responsável pela variação da CCS (HARMON, 1994). A CCS dos animais aumenta com o avanço da idade e período de lactação, porém vacas sem IIM apresentam pouca variação (HARMON, 1994). O efeito do período de lactação e ordem de parto sobre a CCS foi observado em estudos realizados por Schepers et al. (1997) e Laevens et al. (1997). Porém, no estudo conduzido por Schepers et al. (1997), constatou-se que a presença de patógenos principais (*S. aureus*, *S. dysgalactiae* e *S. uberis*) e secundários (*Corrynebacterium bovis* e *Staphylococcus* spp. coagulase negativo) foi significativa e predominante na variação da CCS de quartos mamários.

Outros fatores que explicaram a variação da CCS foram os efeitos de rebanho, animal dentro do rebanho, mês do ano, período de lactação, ordem de parto e interação entre período de lactação e ordem de parto. Já no estudo realizado por Leavens et al. (1997), não houve efeito e diferença significativa na variação da CCS para a presença de infecção sem considerar o tipo de agente etiológico em relação a quartos mamários que não apresentaram isolamento bacteriológico. Ao avaliar o efeito do agente etiológico sobre a CCS, foi demonstrado que a presença de *C. bovis* e *Staphylococcus* spp. coagulase negativo não foi significativa em relação aos quartos mamários bacteriologicamente negativos. Porém, a presença de *Streptococcus* spp. esculina positivo foi significativa em relação a quartos mamários sem isolamento bacteriano. O efeito específico de patógenos na variação da CCS pode ser usado em programas de controle da mastite (HAAS et al., 2002).

A mastite é reconhecida como uma doença fortemente relacionada ao manejo do rebanho (RENEAU, 1986) e que 90% dos casos de mastite são controlados com o manejo (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1996). Por este motivo, estimou-se que a característica de rebanho fosse a principal fonte de variação da CCS, mas há uma grande variação de resposta entre os animais em características idênticas de manejo. Estudos mostraram que a relativa importância do rebanho para explicar a variação da CCS é menor que a variação associada à vaca individualmente (KENNEDY et al., 1982; SCHEPERS et al., 1997; VECHT et al., 1989). Schepers et al. (1997) constataram que o componente de variação da CCS explicado por vacas individuais é superior ao explicado pelo rebanho.

Para o adequado uso da CCS para o diagnóstico da mastite é importante se definir algumas características, como a sensibilidade e a especificidade do teste. Neste caso a sensibilidade é a capacidade do teste em indicar um resultado positivo quando realmente ocorre à doença, já a especificidade é a habilidade de indicar resultado negativo quando a mesma não ocorre. Na avaliação de animais ou rebanhos sempre se deseja boa especificidade e sensibilidade. No caso da CCS se utiliza um valor limite, ou ponto de corte, para identificação de animais doentes ou não, onde este valor afetará diretamente a sensibilidade e a especificidade do teste. Deste modo, o aumento do ponto de corte de 200.000 para 300.000 células/mL na identificação dos animais positivos causa redução do número de resultados falso positivos e o aumento de falsos negativos (SANTOS; FONSECA, 2007).

Animais com cultura negativa do leite para patógenos da mastite apresentaram em média 100.000 células/mL, enquanto animais com cultura positiva apresentaram 280.000 células/mL (WILSON et al., 1997). Dohoo; Leslie (1991) avaliaram a CCS de vacas em intervalos de 28 dias e observaram que o limite de 200.000 células/mL foi o melhor para prever uma nova infecção, com estimativas para sensibilidade e especificidade de 72,6% e 85,5% respectivamente. Schepers et al. (1997) consideraram como limites de referência os valores 100.000, 200.000 e 400.000 células/mL para prever quartos mamários infectados. Os valores de sensibilidade estimados foram 83,2; 74,5 e 60,8% e os valores de especificidade de 80,5; 89,6 e 95,0% para os limites de 100.000, 200.000 e 400.000 células/ml respectivamente.

A sensibilidade e especificidade para CCS tendo como limites de referência os valores de 100.000, 250.000 e 500.000 células/ml foram avaliadas por Sargeant et al. (1986) para vacas no início de lactação. Estes autores consideraram a presença de infecção intramamária por qualquer patógeno isolado e as infecções causadas por patógenos classificados como principais (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *Streptococcus* spp. que não *S. agalactiae*, *S. agalactiae* e *S. aureus*) e secundários (*Staphylococcus* spp. coagulase negativo e *Corynebacterium* spp.). Para a presença de infecção por qualquer patógeno a sensibilidade/especificidade encontrada para os valores de 100.000, 250.000 e 500.000 células/mL foram 71,2/41,3; 51,6/74,5% e 37,0/89,1% respectivamente. Para os patógenos classificados como principais, as sensibilidade/especificidade foram 78,7/39,6%; 64,0/70,1% e 49,3/84,7% e para os secundários 66,1/41,3%; 43,1/74,5% e 28,4/89,1% respectivamente. Osteras et al. (1999) encontraram uma variação de 80 a 85% para a sensibilidade e especificidade de quartos mamários infectados por patógenos principais (*S. aureus* e *S. agalactiae*), tendo como limite para CCS o valor de 200.000 células/mL.

### 2.3.1 CCS do leite do rebanho

A CCS é um bom indicador da qualidade do leite e do estado da saúde dos úberes de um rebanho (HARMON, 1994; JAYARAO; WOLFGANG, 2003; SCHUKKEN et al., 2003). A CCS do rebanho é usada para estimar o percentual de animais e quartos mamários infectados além de obedecer a uma relação diretamente proporcional com perdas de produção (EBERHART et al., 1982).

Emanuelson e Funke (1991) encontraram prevalência média de 26,7% animais infectados em 15.514 rebanhos com a média geométrica do leite com 204.000 células/mL.

No Brasil, Souza et al. (2010) estudaram as variações da CCS de rebanhos e a prevalência de animais com infecções subclínicas causadas por *S. aureus* e *S. agalactiae*. Neste estudo foi observado que nos rebanhos com prevalência de 3 a 10% de *S. aureus* a CCS dos rebanhos variou de 285.000 a 869.000 células/mL, respectivamente. No isolamento simultâneo de *S. aureus* e *S. agalactiae* todas as CCS dos rebanhos ultrapassavam o valor de 1.000.000 células/mL (Quadro 1). Costa (2008) verificou concordância com o estudo anterior, observando que maiores CCS eram de rebanhos com maiores taxas de mastite subclínica, sobretudo por *S. agalactiae*, obtendo correlação positiva e significativa entre a CCS de rebanhos e isolamento do *S. agalactiae* ( $r = 0,549$ ) e *S. uberis* ( $r = 0,352$ ) no leite.

Em rebanhos do Canadá, verificou-se que médias superiores a 700.000 e inferiores a 150.000 células/mL no leite do tanque estavam relacionadas com prevalências de 26,0% e 0,1% de quartos mamários infectados por *S. agalactiae*. No caso da erradicação desta bactéria, por *blitz* terapia em rebanhos, conseguiu-se uma redução de 918.000 para 439.000 células/mL na CCS do tanque (KEEFE, 1997).

Rebanho	Vacas em lactação	<i>S. aureus</i> (%)	<i>S. agalactiae</i> (%)	CCS (células/ml)
1	48	0 (0,0)	0 (0,0)	86.000
2	50	0 (0,0)	0 (0,0)	149.000
3	36	1 (3,0)	0 (0,0)	285.000
4	33	3 (9,0)	0 (0,0)	464.000
5	59	6 (10,0)	0 (0,0)	869.000
6	35	7 (20,0)	3 (9,0)	1.071.000
7	50	23 (46,0)	19 (38,0)	1.310.000
8	62	36 (58,0)	30 (48,0)	1.592.000
9	86	59 (69,0)	36 (42,0)	3.112.000

Quadro 1: Variação da contagem de células somáticas no leite de rebanhos de acordo com o percentual de vacas em lactação com infecção intramamária causadas por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*.

Fonte Souza et al. (2010)

### 2.3.2 A CCS do leite de vacas

A amostra para CCS de vacas é composta pela secreção de quatro quartos mamários independentes, com distintos estados de infecção e resposta inflamatória, estimando-se algum efeito de diluição na contagem celular, como resultado da mistura do leite dos quartos (SCHUKKEN et al., 2003).

No Brasil, Souza et al. (2009), demonstraram o efeito específico dos principais e secundários patógenos da mastite na variação da CCS de vacas, obtendo uma CCS média nas amostras negativas de 264.000 células/mL e com o isolamento de *S. agalactiae*, *S. aureus* e *Streptococcus* spp. que não o *S. agalactiae*, respectivamente as contagens médias de 1.520.000, 966.000 e 894.000 células/mL (Quadro.2).

Nos Estados Unidos, Wilson et al. (1997), observaram diferentes médias de CCS no leite de vacas contaminadas por *S. aureus*, SCN e *C. bovis* que foram 440.000, 640.000, 170.000 e 150.000 células/mL, respectivamente.

FV	Categoria	N	MA	DP	MG	Mediana
Presença de infecção	Não	1137	264	611	22	24
	Sim	2612	779	1.070	228	342
Agente etiológico	STAPHA	790	966	1.072	371	509
	STRAG	551	1.520	1.559	662	923
	STREP	351	894	922	449	641
	STACN	466	422	633	125	205
	DIPT	826	410	561	94	166

Quadro 2: . Variação da contagem de células somáticas (x1.000/mL) de acordo com a presença de infecção intramamária e tipo de agente etiológico.

FV: fonte de variação; MA: média aritmética; DP: desvio padrão; MG: média geométrica; STAPHA: *S. aureus*; STRAG: *S. agalactiae*; STREP: *Streptococcus* sp. que não *S. agalactiae*; STACN: *Staphylococcus* sp. coagulase negativo; DIPT: *Corynebacterium* sp. Fonte Souza et al. (2009).

### 2.3.3 A CCS do leite de quartos mamários

A relação mais precisa entre a mastite e a CCS ocorre a nível dos quartos mamários. (SCHUKKEN et al., 2003). Zadoks et al. (2004) investigaram a variação das medianas da CCS de quartos subclínicos por *S. uberis* e obtiveram a variação de 215.000 a 4.719.000 células/mL e de 65.000 a 3.412.000 células/mL em dois rebanhos.

Estudo de meta-análise categorizou os efeitos das infecções subclínicas na CCS do leite de quartos (DJABRI et al., 2002). Os resultados demonstraram diferentes padrões de elevação das contagens entre os patógenos, os principais podem multiplicar as contagens de quartos de 5,2 a 16,9 vezes, enquanto os patógenos secundários apenas de 1,5 a 2,0 vezes (Quadro 3).

Estado de infecção	Fator de multiplicação da CCS	CCS x 1.000 Média geométrica
Quartos negativos	-	68
<i>S. aureus</i>	5,2	357
<i>S. agalactiae</i>	12,6	857
<i>S. dysgalactiae</i>	5,7	388
<i>S. uberis</i>	9,1	722
Coliformes	16,9	1151
SCN	2,0	138
<i>C. bovis</i>	1,5	105

Quadro 3., Efeitos das infecções subclínicas na contagem de células somáticas de quartos mamários.

Adptado de Djabri et al. (2002)

#### 2.4 CLASSIFICAÇÃO DOS PATÓGENOS DE ACORDO COM AS FORMAS DE TRANSMISSÃO

Quanto à classificação epidemiológica dos patógenos da mastite, observam-se dois padrões distintos, os contagiosos e os ambientais (HOGAN; SMITH, 2003; BRADLEY, 2002). Os patógenos contagiosos, por essência, são os mais adaptados a sobreviver dentro da glândula mamária, sendo os quartos infectados o principal reservatório deste grupo. Podem estabelecer infecções subclínicas por longos períodos pela incapacidade do sistema imune debelar totalmente a invasão. A disseminação ocorre entre quartos e vacas susceptíveis quase que exclusivamente no momento da ordenha. Os seus principais representantes compreendem o *S. aureus*, *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae*, *C. bovis*, SCN e *Mycoplasma* spp., (BRADLEY, 2002; HOGAN; SMITH, 2003; QUINN, 2002).

Os principais patógenos ambientais são os coliformes, especialmente *E. coli* e *Klebsiella* spp., e *S. uberis*. São pouco adaptados à sobrevivência na glândula mamária e mais associados à forma clínica. Atuam como invasores oportunistas, usualmente invadem, multiplicam-se e causam uma resposta inflamatória que rapidamente debela a invasão. Como sugere o nome, os ambientes são o reservatório destes organismos e a exposição aos patógenos ocorre a todo o momento, mesmo antes da primeira lactação. As condições de higiene das instalações, a forma de estabulamento, o manejo e do tipo de material utilizado

como cama influenciam as infecções ambientais. *S. uberis* foi mais associado a camas de palha, enquanto *E. coli* e *Klebsiella spp.* ao uso de cepilho de madeira (HOGAN; SMITH, 2003). Há relatos da maior incidência de mastite ambiental em rebanhos com baixas contagens celulares, como resultado da boa gestão no controle dos patógenos contagiosos (BRADLEY, 2002; QUINN, 2002).

## 2.5 PATÓGENOS PRIMÁRIOS

### 2.5.1 *Staphylococcus aureus*

Na maioria dos países, *S. aureus* é a causa predominante de mastite subclínica e também é frequentemente isolado de mastite clínica (BRAMLEY; DODD, 1984). Em estudo realizado no Brasil em 48 rebanhos por Brito et al. (1999), *S. aureus* foi isolado de 47 rebanhos, sendo que em 37 deles havia até 20% de quartos mamários infectados.

Mastites causadas por *S. aureus* podem variar de forma hiper aguda a subclínica, tendo a forma subclínica crônica com episódios clínicos como a mais observada (QUINN et al., 2002). Casos subclínicos crônicos de mastite causada por *S. aureus* promovem atrofia do alvéolo mamário, fibrose e micro abscessos, o que limita a ação fagocítica de células e a ação de antibióticos, causando infecções profundas no tecido mamário, com episódios de liberação de bactérias dos quartos mamários infectados acompanhados de altas CCS (PYÖRÄLÄ, 1995; QUINN et al., 2002). Geralmente, os casos de mastite causada por *S. aureus* são subclínicos, crônicos e de longa duração, podendo persistir por semanas ou meses. O tratamento dos casos clínicos com antibiótico frequentemente falha em eliminar o estado de infecção, particularmente em vacas mais velhas e com histórico de episódios clínicos da doença (BRAMLEY; DODD, 1984; BRAMLEY, 1993).

A mais importante fonte de infecção para *S. aureus* dentro do rebanho são as glândulas mamárias infectadas, o duto do teto colonizado, os tetos lesionados infectados, o conjunto de teteiras do equipamento de ordenha com borrachas ressecadas e rachadas, pano comum para secar animais e mãos do ordenhador, sendo o momento da ordenha o mais importante na transmissão de *S. aureus* entre vacas (BRAMLEY; DODD, 1984). Sommerhäuser et al. (2003) mostraram que alguns tipos de *S. aureus* possuíam pouca ou nenhuma tendência de

disseminação entre quartos mamários. Fontes ambientais de *S. aureus* foram identificadas por Matos et al. (1991). Fatores ambientais, tais como procedimentos de desinfecção, reposição de camas e estado de higiene dos estábulos foram associados com o risco de mastite por *S. aureus* em rebanhos leiteiros (ELBERS et al., 1998). A identificação e eliminação das fontes ambientais *S. aureus* podem ser cruciais para o sucesso de um programa de controle (ZADOKS, 2002). As IIM em vacas primíparas, no início da lactação, sugerem também que outras fontes que não as vacas em lactação podem servir como reservatórios de *S. aureus* no rebanho (MATTHEWS et al., 1992).

No estudo realizado por Schalm (1942), citado por Roberson et al. (1994), foi sugerido que mastites em novilhas causadas por patógenos principais e contagiosos, poderiam estar associadas ao fornecimento de leite de animais mastíticos a bezerros e estes se contaminariam pelo hábito de mamarem uns nos outros. Fatores relacionados ao rebanho, como o manejo durante a ordenha, quartos mamários recuperados de infecção por *S. aureus*, estágio de lactação e calosidades nas extremidades dos tetos eram associados à presença de novas infecções por *S. aureus* (ZADOKS et al., 2001a). De acordo com Neijenhuis et al. (2001), o grande número de calosidades nos tetos aumentou o risco de IIM em vacas em lactação, podendo estar relacionados a problemas de manejo de ordenha, ordenhadeira mecânica ou ao ambiente. A prática de desinfecção dos tetos após a ordenha foi relacionada com redução de novas IIMs causadas por *S. aureus* (BODDIE; NICKERSON, 1997).

Normalmente as mastites por *S. aureus* causam maiores lesões que as infecções por *Staphylococcus* spp. coagulase negativos (SCN), associando-se também uma maior resposta inflamatória a este patógeno. Isto sugere que os fatores específicos do *S. aureus*, como a exoproteína coagulase, podem explicar a maior gravidade da doença (LEITNER et al., 2003). Vários fatores de virulência do *S. aureus* foram avaliados na determinação da forma clínica da doença, entretanto nenhum fator específico, ou combinação destes, foi suficientemente associado com a severidade da mastite (TAPONEN; PYÖLÄRÄ, 2009).

A principal estratégia de defesa do sistema imune contra *S. aureus* é a resposta fagocitária celular, mediada pelos polimorfonucleares (PMN), principalmente os neutrófilos. *S. aureus* consegue bloquear a fagocitose através de estratégias como a invasão do epitélio secretor (TAPONEN; PYÖLÄRÄ, 2009) e seu espaço subjacente, conseguindo evadir da ação dos PMN presentes no leite dos alvéolos mamários (HERMANS et al., 2010). Mesmo após a fagocitose, *S. aureus* consegue sobreviver e multiplicar-se no interior dos macrófagos, devido às propriedades de resistência proporcionada pela cápsula bacteriana, presente nas colônias com aspecto mucoide. A formação de biofilmes é outra estratégia associada à cápsula

bacteriana que impede a ação de fagócitos. Foi observado nas mastites de ruminantes que as cepas encapsuladas de *S. aureus* produziam menos sintomatologia, mais com maior capacidade de colonização (COELHO et al., 2009).

As adesinas, fibronectina, laminina, vitronectina e *collagen*, são proteínas da superfície do *S. aureus* responsáveis pela capacidade de fixação em diferentes tipos tecidos do hospedeiro (HERMANS et al., 2010). Este patógeno pode secretar uma variedade de fatores com propriedades funcionais distintas. Como a exoproteína A que consegue se ligar as imunoglobulinas G, dificultando sua fixação e a ativação do sistema complemento para opsonização e fagocitose das bactérias (TAPONEN; PYÖLÄRÄ, 2009). Os superantígenos pertencem à família das toxinas pirogênicas que induzem a ativação maciça de linfócitos T defeituosos. As hemolisinas, alfa, beta, gama e ômega, que causam a lise de hemácias e células de defesa, induzindo a liberação de mediadores inflamatórios (citocinas) e a necrose tecidual. A Coagulase que realiza a conversão do plasminogênio em plasmina, propiciando a adesão de hemácias e formação de redes de fibrina que dificultam a migração dos fagócitos até as células bacterianas. As leucocidinas com ação citotóxica em leucócitos. A toxina da síndrome do choque tóxico que induz a uma liberação de grande quantidade de citocinas que levam a inúmeras disfunções orgânicas (LEITNER et al., 2003).

### **2.5.2 *Streptococcus agalactiae***

*S. agalactiae* foi o primeiro microrganismo reconhecido como causa de mastite, em 1896 (ELVINGER; NATZKE, 1992). A infecção por este agente pode resultar em infecção clínica aguda até subclínica crônica (BRAMLEY; DODD, 1984). O curso da infecção é semelhante ao da infecção crônica subclínica causada por *S. aureus*, com ciclos de liberação de bactérias acompanhados de altas CCS (KEEFE, 1997; QUINN et al., 2002). *S. agalactiae* produz altas CCS em animais individuais, o que influencia significativamente na CCS do rebanho. Em um grupo de rebanhos com CCS maior que 700.000 células/ml, a média geométrica da CCS de vacas infectadas por *S. agalactiae* foi 2.238.700 células/ml e em outro estudo a média aritmética foi de 900.000 células/mL. Em rebanhos com CCS maiores que 800.000 células/mL, 80% das vacas com CCS maior que 500.000 células/ml estavam infectadas com *S. agalactiae* (KEEFE, 1997).

Este patógeno localiza-se somente na glândula mamária e com sobrevivência restrita fora do úbere sendo altamente sensível à penicilina. Devido a estas características tem sido erradicado da maioria de rebanhos e até mesmo de alguns países (KEEFE, 1997). Alguns países têm trabalhado em programas regionais ou nacionais com o objetivo de erradicar o *S. agalactiae* e sua presença no rebanho foi associada a penalidades relacionadas ao não atendimento dos limites mínimos para CCS do rebanho no Canadá, de outubro de 1992 a março de 1993 (KEEFE, 1997). *S. agalactiae* é disseminado principalmente no momento da ordenha por meio do equipamento usado e é um agente altamente contagioso (BRAMLEY; DODD, 1984; BARTLETT et al., 1992a). Caso o *S. agalactiae* seja isolado de um rebanho, é recomendado à chamada *blitz* terapia, ou seja, todos os animais infectados são tratados simultaneamente com o objetivo de eliminar o agente do rebanho. Quando um rebanho está infectado com *S. agalactiae*, geralmente há uma alta prevalência de animais infectados dentro do rebanho (KEEFE et al., 1997).

Entre 1976 e 1982, estudo realizado nos Estados do Mississippi e Massachusetts, Estados Unidos, mostrou que a prevalência média de animais infectados por *S. agalactiae* dentro de rebanhos variou de 39,5 a 44,7% (KEEFE, 1997). De 48 rebanhos, 27 (56%) possuíam no mínimo uma vaca infectada por *S. agalactiae* no Estado de Ohio, Estados Unidos, onde a média de quartos e vacas infectadas foi de 4,1 e 10,0%, respectivamente (BARTLETT et al., 1992a). Estudo realizado no Brasil, por Brito et al. (1999), em 48 rebanhos revelou que 29 estavam infectados com *S. agalactiae* e que em 24 destes a média de quartos infectados foi de 3,6%. Fatores associados à presença de *S. agalactiae* foram identificados como procedimentos inadequados para higiene do úbere e tetos antes da ordenha, falha na desinfecção dos tetos após a ordenha, seleção de animais para tratamento a secagem ou não realização do tratamento a secagem, limpeza inadequada do meio ambiente e uso de pano comum para limpeza dos tetos e úbere antes da ordenha (BRAMLEY; DODD, 1984; BARTLETT et al., 1992a; KEEFE, 1997). Desinfecções dos tetos após a ordenha com solução de iodo a 0,5 e 1,0% foram relacionadas com redução de novas infecções intramamárias causadas por *S. agalactiae* de 73,2 e 46,4%, respectivamente (BODDIE; NICKERSON, 1997).

Os fatores de virulência normalmente associados ao *S. agalactiae* isolados em mastites incluem as proteínas da superfície bacteriana e as secretadas, estruturas que, direta ou indiretamente impedem a fagocitose, propiciam a adesão e estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias. A maioria destes fatores está presente na superfície bacteriana e na cápsula (CORRÊA et al., 2010). O processo de colonização da glândula mamária se inicia pela

invasão do meato do teto pelo *S. agalactiae*, que através da proteína de ligação fibronectina se fixa aos tecidos internos da glândula. Em seguida, há uma intensa multiplicação bacteriana pela alta disponibilidade de nutrientes do leite que é regulada por fatores antibacterianos, como o sistema tiocianato lactoperoxidase e a lisosima, e pela ação mecânica de retirada do leite durante as ordenhas. A multiplicação bacteriana no epitélio secretor e dos seios resulta em resposta inflamatória e na morte celular. Raramente *S. agalactiae* invade o epitélio glandular, permanecendo na luz dos ductos e dos alvéolos (TIMONEY, 2010).

É marcante o processo inflamatório durante a mastite por *S. agalactiae*. Seu fator de virulência CAMP possui ação citotóxica no epitélio secretor e nos ductos mamários, causando morte celular e liberação de mediadores inflamatórios que propiciam a quimiotaxia de leucócitos ao local da agressão. Durante o processo de combate ao *S. agalactiae*, há morte de células fagocitárias, como os PMN, que liberam suas potentes enzimas lisossômicas que culminam em mais efeitos citotóxicos nas células do hospedeiro. Deste modo, se forma um ciclo de realimentação do processo quimiotático inflamatório, culminando em grande influxo de células de defesa, principalmente neutrófilos. Outros potenciais fatores associados ao *S. agalactiae* são a neuraminidase, hemolisina, toxina vasodilatadora extracelular e ácido lipoteitoico (TIMONEY, 2010).

### **2.5.3 *Streptococcus* spp. que não *S. agalactiae***

*Streptococcus* spp. encontrados no ambiente foram isolados de infecções intramamárias de vacas durante o período de lactação e o período seco. Estação do ano, ordem de parto e período de lactação influenciaram na razão de IIM causadas por estreptococos do ambiente (TODHUNTER et al., 1995). Estábulo, higiene e ambiente da vaca seca são freqüentemente associados com novas IIM durante o período seco (BARTLETT et al., 1992b; GODDEN, 2004). Vacas durante o período seco geralmente permanecem em locais molhados e sujos, resultando em alto nível de exposição das extremidades dos tetos aos patógenos do ambiente. De forma semelhante, novilhas que permanecem em ambiente molhado e sujo são mais suscetíveis a desenvolver IIM antes do parto (GODDEN, 2004). Bradley; Green (2000) apontaram que o manejo ambiental durante o período seco das vacas pode ter grande impacto na incidência de mastite causada por patógenos ambientais na lactação subsequente e que infecções crônicas foram importantes na epidemiologia da doença. Procedimentos adequados

de higiene durante a ordenha foram pontos importantes na prevenção de infecções IIM causadas por estreptococos do ambiente (BARTLETT et al., 1992b). Brito et al. (2000) demonstraram que a aplicação adequada de métodos de antissepcia dos tetos antes da ordenha reduzia a contaminação bacteriana da pele dos tetos em aproximadamente 90%. O uso de caneca ou desinfetante contaminado com bactérias do ambiente pode ser fonte de infecção para os animais (PHILPOT; NICKERSON, 1991).

A maioria dos *Streptococcus* spp. patogênicos possuem a capacidade de fixar componentes do plasma do hospedeiro, como albumina, imunoglobulinas e fibrina na superfície bacteriana para escapar da detecção pelo sistema complemento e da opsonização e fagocitose celular (TIMONEY, 2010).

#### 2.5.3.1 *Streptococcus dysgalactiae*

*S. dysgalactiae* parece ocupar uma posição intermediária entre os grupos dos patógenos contagiosos e ambientais da mastite, com amostras adaptadas aos animais e ao ambiente (AARESTRUP; JENSEN, 1996; CALVINHO et al., 1998). A disseminação do *S. dysgalactiae* entre vacas pode ocorrer diretamente pelo equipamento de ordenha ou pelo ambiente. Como a bactéria pode persistir na glândula mamária, a transmissão pode ocorrer durante a ordenha e, conseqüentemente, o controle pode ser realizado pela adoção de procedimentos higiênicos corretos no momento da ordenha (BRAMLEY; DODD, 1984). Injúrias nas extremidades dos tetos e procedimentos inadequados de ordenha promoveram a disseminação da bactéria dentro do rebanho (CALVINHO et al., 1998). Entretanto, o *S. dysgalactiae* pode ser encontrado fora da glândula mamária como o ambiente, tonsilas, boca e vagina das vacas. Infecções ocorrem com freqüência em vacas secas e novilhas, o que mostra independência do processo de ordenha e o caráter ambiental da bactéria. Sua habilidade em sobreviver e multiplicar em locais fora da glândula mamária pode ser o principal fator responsável para diferenciar a patogênese da infecção comparada ao *S. agalactiae* (BRAMLEY; DODD, 1984). Cama contaminada é considerada uma importante fonte do microrganismo, facilitando a transmissão de um animal para outro (LEIGH, 1999). A forma de apresentação não é específica variando de casos clínicos a sub-clínicos (REBHUN et al., 1995).

Ainda são muito pouco compreendidas as possíveis interações entre patógeno e hospedeiro que resultam na mastite por *S. dysgalactiae*. Foram identificados vários fatores extracelulares de virulência no *S. dysgalactiae*, mais a importância destes na patogênese da mastite ainda não foi bem compreendida (CALVINHO et al., 1998). Há várias proteínas de superfície que atuam na fixação de elementos do plasma e tecidos do hospedeiro colaborando com a redução da ação fagocítica celular do sistema imune. A liberação de hialuronidase e fibrinolisinase contribui para a penetração e disseminação deste patógeno nos tecidos glandulares (TIMONEY, 2010).

#### 2.5.3.2 *Streptococcus uberis*

*S. uberis* foi isolado em materiais orgânicos e inorgânicos usados como camas em estábulos. É a causa mais comum de novas infecções em vacas secas, ocorrendo usualmente no início da lactação e final do período seco (BRAMLEY; DODD, 1984). Estudos moleculares demonstraram que amostras de *S. uberis* apresentaram características epidemiológicas de microrganismos contagiosos (ZADOKS et al. 2001a; ZADOKS et al. 2001b; ZADOKS et al. 2003), entretanto há fortes evidências que indicam relação deste patógeno com o ambiente das vacas. A ligação entre *S. uberis*, ambiente e infecção foi altamente relacionada devido ao isolamento do agente em cerca de 50 a 60% de *swabs* da extremidade dos tetos. Vacas mantidas a pasto apresentaram risco menor de infecção em relação a vacas mantidas em confinamento (LEIGH, 1999). Infecções intramamárias causadas por *S. uberis* podem resultar em mastite clínica ou subclínica, variando o período de duração das infecções, podendo ocorrer infecções subclínicas por longos períodos (ZADOKS et al., 2003).

A gravidade da mastite por *S. uberis* pode variar com a cepa invasora. Análise do seu genoma revelou grande variedade de vias metabólicas e flexibilidade nutricional com relativamente muito poucos fatores de virulência, se comparado aos demais nos *Streptococcus* spp. Este patógeno consegue resistir à fagocitose, mesmo que a maioria das suas cepas não expresse cápsula bacteriana, permitindo verificar que a cápsula bacteriana não é um fator essencial contra a fagocitose (TIMONEY, 2010)

## 2.6. PATÓGENOS SECUNDÁRIOS

### 2.6.1 *Staphylococcus* spp. coagulase negativo e *Corynebacterium* spp.

Estudos da prevalência dos microrganismos causadores de mastite em rebanhos demonstram que *C. bovis* e *Staphylococcus* spp. coagulase negativo (SCN) são patógenos comumente isolados (BRITO et al., 1999; MATTHEWS et al., 1992). Brito et al. (1999) identificaram bactérias do gênero *Corynebacterium* em todos os 48 rebanhos estudados em Minas Gerais, Brasil, sendo o patógeno mais frequentemente isolado nos rebanhos. Neste mesmo estudo, SCN foi isolado em 45 rebanhos e destes, 43 apresentaram taxas de infecção de até 20% dos quartos.

Esses dois grupos de microrganismos são associados a discretos aumentos na CCS (HARMON, 1994). A presença de SCN e *C. bovis* no leite é um reflexo da microbiota normal da pele e da ausência de higiene, particularmente na desinfecção dos tetos. Estas bactérias podem se multiplicar na superfície e canal do teto, resultando na infecção intramamária (BRAMLEY; DODD, 1984).

A elevação da CCS do rebanho causada por SCN não é evidente como visto para *S. agalactiae* (ELVINGER; NATZKE, 1992). Quartos mamários infectados experimentalmente com SCN apresentaram média geométrica de 260.000 células/ml (NICKERSON; BODDIE, 1994). A não desinfecção dos tetos e o uso de pano comum foram associados a casos de mastite subclínica por SCN (BARTLETT et al., 1992c). Matthews et al., (1992) e Nickerson et al., (1995) observaram maior prevalência de casos de mastite causada por SCN em vacas primíparas em relação a vacas múltiparas. Diferentes estilos de manejo foram associados à prevalência de casos de mastite causados por *Staphylococcus* spp. coagulase negativo (FOX et al., 1995).

Muitos fatores de virulência foram identificados nos SCN, mais ainda não foi estabelecida uma associação razoável entre estes fatores com a gravidade dos sintomas da mastite. Parece que SCN possui pouca capacidade de provocar mastite grave, sendo claramente menos patogênico do que *S. aureus* (TAPONEN; PYÖRÄLÄ, 2009). SCN são normalmente encontrados na pele de humanos e animais, alguns autores consideram este grupo como sendo o maior componente da microbiota normal da pele e mucosas de humanos e animais (HERMANS et al., 2010).

Ensaio comparativos *in vitro* mostraram que SCN apresentam a mesma capacidade de adesão em células mamárias que *S. aureus*, entretanto com menor capacidade invasiva. Estudo das alterações histopatológicas em glândulas mamárias de novilhas, experimentalmente infectadas com *S. aureus* e SNC, identificou nos quartos infectados menor espaço na luz dos alveolares mamários, aumento do estroma das áreas interalveolares e presença de infiltração leucocitária. Os quartos com SCN apresentaram menores alterações histopatológicas que os quartos com *S. aureus* (TAPONEN; PYÖLÄRÄ, 2009).

*C. bovis* promove geralmente um quadro de mastite subclínica com aumento moderado da CCS, variando de 200.000 a 400.000 células/mL (ELVINGER; NATZKE, 1992; RADOSTITS et al., 1994). *C. bovis* é primeiramente disseminado entre os quartos mamários no momento da ordenha, apesar de haver outras fontes de infecção (BRAMLEY; DODD, 1984). A desinfecção dos tetos e a terapia da vaca seca devem fazer parte de um programa de controle e prevenção de novas infecções causadas por *C. bovis* (RADOSTITS et al., 1994).

## 2.7 FONTES DE CONTAMINAÇÃO BACTERIANA DO LEITE

O número de microrganismos presentes no leite é estimado pela CTB, ou contagem global de bactérias, que resulta da contagem do número de colônias que cresceram em placas com ágar padrão PCA (*Palte Count Agar*) após a incubação por 48 horas a 32<sup>o</sup>C de um mililitro de amostra do leite. Seu resultado é expresso em UFC/mL (ENUMERATION..., 1991).

A contagem eletrônica de bactérias no leite é um recurso amplamente difundido em diversos países, inclusive no Brasil. Apresenta grandes vantagens em relação ao método de contagem em placas, como a maior facilidade de transporte das amostras, maior precisão, baixo custo e alto rendimento analítico. Os contadores eletrônicos automatizados, como Bentley IBC (BENTLEY INSTRUMENTS INC., 2007), realizam uma contagem individual de bactérias por meio de equipamentos de citometria de fluxo e transformam estes resultados, através de uma equação matemática (curva de calibração), em UFC/mL (SANTOS; FONSECA, 2007).

A qualidade microbiológica do leite cru reflete as condições gerais de higiene na produção e na conservação do leite nas fazendas (HOLM et al., 2004). Há consenso, a nível

internacional, que a CTB no leite seja inferior a 100.000 UFC/mL (SANTOS; FONSECA, 2007). Contagens entre 5.000 e 10.000 UFC/mL podem ser alcançadas pela maioria dos produtores, como resultado da ordenha de vacas sadias e limpas sob boas condições higiênicas (JAYARAO; WOLFGANG, 2003).

De um modo geral, são três as principais fontes de contaminação bacteriana do leite nas fazendas: a glândula mamária infectada, a pele dos tetos e úbere e a superfície dos equipamentos e utensílios que entram em contato com o leite (MURPHY; BOOR, 2010). Desta maneira, a adoção de boas práticas agropecuárias como a identificação e o tratamento imediato de animais com mastite clínica, adequada higiene e manutenção de equipamentos, além da rápida refrigeração do leite abaixo de 4,0<sup>0</sup>C demonstram alta eficácia na redução da CTB nas fazendas produtoras de leite (HAYES et al., 2001).

### **2.7.1 A influência dos patógenos da mastite na contaminação bacteriana do leite**

Estudo realizado nos Estados Unidos mostrou que os estreptococos, as bactérias Gram negativas e a associação entre estas foram responsáveis pelo aumento da CTB no leite de rebanhos. As mastites causadas por bactérias do gênero *Streptococcus* spp. foram as mais significantes para aumento da CTB de rebanhos acima de 100.000 UFC/mL, sendo *S. uberis* o patógeno mais frequentemente encontrado (HAYES et al., 2001). Em rebanhos infectados com *S. agalactiae*, geralmente há uma alta prevalência de animais infectados e conseqüentemente aumento na CTB no leite do rebanho (KEEFE, 1997). Resultados de estudos mostram que os patógenos da mastite podem contribuir de forma diferenciada no aumento da CTB do leite do rebanho, dependendo basicamente do percentual de vacas em lactação com infecção intramamária, tipo de bactéria envolvida na infecção e estágio da infecção (BRAMLEY; DOOD, 1984; BRAMLEY; McKINNON, 1990; MURPHY; BOOR, 2010 ; ZADOKS et al., 2004).

Os microrganismos da mastite que mais influenciam a CTB de rebanhos são os *Streptococcus* spp., principalmente o *S. agalactiae* e *S. uberis*. O *S. aureus* apresenta baixo potencial de causar altas contagens bacterianas, normalmente atingindo valores próximo de 60.000 UFC/mL (GONZALEZ et al., 1986).

Na Holanda, Zadoks et al. (2002), estudaram a mastite causada por *S. uberis* e constaram que o número de bactérias liberadas pelos quartos infectados foi geralmente alto, com próximo de 84,0% dos quartos liberando acima de 1.000 UFC/mL.

O monitoramento do padrão de liberação de bactérias durante infecção natural por *S. aureus* revelou uma consistente presença do patógeno por longos períodos e em níveis variados, designados como intermitentes (WALKER, 2010). Em 19 quartos experimentalmente infectados, Sears et al. (1990) acompanharam a liberação de *S. aureus* observando dois padrões distintos, um de baixa liberação com média inferior a 1.000 UFC/mL em 16 quartos, e em três quartos de novilhas um padrão de alta liberação com média acima de 2.000 UFC/mL.

### **2.7.2 Patógenos da mastite como fator da variação da resposta celular e da liberação de bactérias no leite**

Em rebanhos com condições ideais de higiene na obtenção e conservação do leite, observa-se que a maior fonte de variação da contagem celular e bacteriana total no leite está relacionada às possíveis reações fisiopatológicas da glândula mamária frente aos diferentes patógenos da mastite, gerando diferentes magnitudes de respostas inflamatórias (células somáticas) e de liberação de bactérias (BRANLEY et al., 1984; HAYES et al., 2001; KEEFE, 1997; SEARS et al., 1990; ZADOKS et al., 2004).

Em Bérghamo (Itália), pesquisa da qualidade microbiológica do leite em rebanhos de cabras demonstrou que as baixas CTB dos rebanhos se relacionavam com a predominância de uma microbiota Gram positiva, sendo isto diferente nos rebanhos com altas contagens bacterianas onde havia uma prevalência de microrganismos Gram negativos. Também observaram que os altos níveis de coliformes se correlacionaram com as altas CTB do rebanho, com a higiene e com o rápido resfriamento do leite, onde as contagens significativamente maiores eram em fazendas sem resfriadores (FOSCHINO et al., 2002).

Trabalho de Zadoks et al. (2004) encontrou maior significância entre a CTB do tanque e as contagens de *Streptococcus* spp. nos rebanhos com CCS acima de 750.000 células/mL e menor correlação nos rebanhos que não ultrapassaram este limite.

A avaliação da variação conjunta da CTB e da CCS do leite de rebanhos resultou em uma alta correlação entre o nível de contaminação bacteriana e a contagem dos patógenos

principais da mastite e a CCS do tanque, permitindo realizar estimativas do isolamento dos patógenos principais em relação aos diferentes níveis de CCS, como exemplo: 63% de chances de isolamento com CCS em 400.000 células/mL e 20% de probabilidade com a CCS em 100.000 células/mL. A pesquisa das possíveis fontes de contaminação bacteriana do leite de rebanhos (leite do tanque) revelou que a constatação de altas CTB associadas às baixas CCS era sugestiva de contaminações por bactérias ambientais. Entretanto, com o isolamento de contagiosos, *S. agalactiae* e *S. aureus*, as contaminações bacterianas foram significativamente associadas a altas CCS (RYSANEK; BABAK, 2005). Murphy; Boor (2010) indicaram que simultâneos aumentos das contagens celulares e bacterianas no leite do tanque são sugestivos de uma possível origem infecciosa para aumento da CTB, notadamente mais nas IIM causadas por *Streptococcus* spp. do que nas infecções por *S. aureus* que pareceu ser liberado em menor número no leite.

Na América do Norte, Zadoks et al. (2004), realizaram o acompanhamento qualitativo e quantitativo de grupos bacterianos no leite de 48 fazendas por 5 meses e comprovaram a contribuição dos grupos bacterianos *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e Gram negativos em respectivamente 69,0 %, 3,0% e 3,0% da variabilidade da CTB do tanque, comprovando a grande importância dos *Streptococcus* spp. nestes rebanhos. Um programa de monitoramento da qualidade do leite do tanque realizado no Estado da Pensilvânia, nos Estados Unidos, relatou que as alterações na CCS refletem as contagens dos SCN e a frequência de isolamento dos patógenos, *S. aureus* e *S. agalactiae*, nas respectivas amostras (JAYARAO et al., 2004).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

O presente estudo tem como objetivo geral a quantificação da CCS e a da liberação de bactérias pelos quartos mamários (LBQM) de vacas de acordo com os patógenos da mastite subclínica.

#### **3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO**

Objetivo específico deste estudo é estabelecer as relações entre a CCS e a LBQM de acordo com os patógenos da mastite subclínica isolados.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 CARACTERIZAÇÃO DA ORIGEM E PERÍODO DE COLETA DAS AMOSTRAS**

Foram colhidas três amostras de leite em 638 quartos mamários de 124 fêmeas bovinas sem sintomas clínicos de mastite no período de junho a dezembro de 2009. As amostras foram originadas de cinco fazendas localizadas na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, Brasil. Quatro propriedades localizadas no Município de Juiz de Fora – MG, formadas por rebanhos mestiços (Holandês x Zebu), e uma em Coronel Pacheco – MG, com animais puros da raça Holandesa.

#### **4.1.1 Procedimento de amostragem**

#### **4.1.2 Preparo dos tetos anterior a amostragem**

O preparo dos tetos teve como objetivos o diagnóstico dos quartos mamários com mastite clínica e a prévia antissepcia para amostragem do leite. O preparo foi iniciado pela avaliação visual dos quartos e a realização da prova do tamis (caneca de fundo negro) nos primeiros jatos de leite de cada teto visando o diagnóstico da mastite clínica e a exclusão destes animais da coleta. Em seguida, as vacas sem sinais clínicos de mastite tiveram seus tetos lavados com água corrente e imersos (*dipping*) em solução desinfetante clorada (150ppm) ou iodada (0,5% P/V), sendo secos após 20 segundos com papel toalha descartável. Por último, era realizada uma nova antissepcia das extremidades dos tetos com gaze umedecida em álcool 70% (P/V), realizada no sentido dos tetos mais distantes para os mais próximos.

#### 4.1.2.1 Critérios adotados no diagnóstico dos animais com mastite clínica

Foram utilizados dois critérios para a identificação dos animais com mastite clínica;

- Identificação pelos próprios ordenhadores antes do início do procedimento de coleta. Os ordenhadores foram questionados sobre a ocorrência de animais com sintomas de mastite clínica e todas as vacas indicadas foram excluídas da coleta.
- Exame de todos os quartos mamários de todas as vacas durante o preparo dos tetos: animais que apresentaram sintomatologia compatível à mastite clínica, como quartos mamários doloridos e edemaciados, ou presença de leite anormal na prova do tamis foram excluídos do procedimento de amostragem dos quartos mamários.

#### 4.1.3 Amostragem do leite dos quartos

Na amostragem do leite dos quartos mamários individuais foram utilizados três frascos diferentes e identificados para a prova bacteriológica, CTB e CCS. O procedimento de amostragem, propriamente dito, foi realizado no sentido contrário ao da antissepcia dos tetos, ou seja, dos tetos mais próximos para os mais distantes. A primeira amostra colhida foi para o exame bacteriológico, descartando-se os dois primeiros jatos e colhendo de 5 a 10 mL de leite de cada teto em frascos esterilizados. A segunda e terceira amostras do leite de cada quarto mamário (30 a 40 mL) foram separadas para a CTB e CCS, respectivamente. Os procedimentos de amostragem asséptica para exame bacteriológico são descritos por Harmon (1990). Os procedimentos de amostragem para o CTB e CCS foram realizados de acordo com a Norma Internacional ISO 707 (INTERNATIONAL..., 2008). Na identificação das amostras de leite foram utilizadas fichas de coleta e etiquetas seriadas, além do padrão de coloração das tampas dos frascos utilizados para na amostragem (vermelha: CTB, azul: CCS, transparente: exame bacteriológico)

#### 4.1.4 Identificação, acondicionamento e transporte das amostras

As amostragens foram realizadas imediatamente antes da primeira ordenha nas cinco propriedades produtoras. Cada rebanho foi amostrado em um dia específico e o tempo de transporte máximo para entrega dos frascos aos laboratórios da Embrapa Gado de Leite foi de até duas horas. A conservação das amostras, durante a amostragem e transporte, foi realizada por meio de caixas isotérmicas com gelo reciclável.

#### 4.2 EXAMES BACTERIOLÓGICOS

As amostras para exames bacteriológicos foram processadas no mesmo dia de recebimento pelo Laboratório de Microbiologia do Leite, Embrapa Gado de Leite, sendo conservadas em câmaras frigoríficas refrigeradas a 7<sup>o</sup>C até o início das análises. As provas bacteriológicas foram realizadas de acordo com as normas do National Mastitis Council (HARMON, 1990). Semeou-se 0,01 mL de cada amostra de leite, com alça calibrada descartável, em cada quadrante de uma placa de ágar sangue preparado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e foi feita a primeira leitura, seguindo-se nova incubação por mais 24 horas para a segunda leitura. As colônias isoladas no ágar sangue foram observadas quanto à morfologia, tamanho, pigmentação e presença de hemólise. As colônias isoladas foram observadas ao microscópio por meio de esfregaços corados pelo método de Gram.

Os microrganismos foram identificados a partir de subcultivos em placas de ágar soja tripticaseína, de acordo com recomendações de Harmon, (1990). Bactérias do gênero *Streptococcus* foram identificadas pela ausência de produção de catalase e pelos testes de CAMP (Christie, Atkins e Munch-Peterson), hidrólise do hipurato de sódio, crescimento em meio com 6,5% de NaCl e hidrólise da esculina. A classificação foi feita de acordo com Hoblet et al. (1986) da seguinte maneira: (1) *S. agalactiae*: reação positiva nos testes de CAMP e hidrólise do hipurato de sódio, crescimento variável em meio com 6,5% de NaCl e reação negativa no teste de hidrólise da esculina, (2) *Streptococcus* spp. esculina positivos (ESCPOS): reação variável no teste de CAMP, na hidrólise do hipurato e em meio com 6,5% de NaCl e hidrólise da esculina. Neste grupo incluem-se *S. uberis*, *S. bovis*, espécies de

*Enterococcus* e outras espécies de *Streptococcus* que hidrolisam a esculina e (3) *Streptococcus* spp. esculina negativos (ESCNEG): reação negativa no teste de CAMP, de hidrólise da esculina e do hipurato de sódio e ausência de crescimento em presença de 6,5% de NaCl. Neste grupo estão incluídos *S. dysgalactiae* e outros *Streptococcus* spp. esculina negativos. Para análise estatística, os patógenos da mastite identificados como ESCPOS e ESCNEG foram agrupados como *Streptococcus* spp. que não *S. agalactiae*.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* foram classificadas em coagulase negativos (SCN) e *Staphylococcus aureus* de acordo com a produção de catalase, coagulação do plasma de coelho e produção de acetoina.

#### 4.2.1 As amostras excluídas

Ao final do cultivo primário foram excluídas dos cálculos estatísticos as amostras contaminadas e as que apresentaram crescimento de bactérias com características morfotintoriais de bastonetes Gram negativos. O critério para reconhecimento das amostras contaminadas foi o crescimento de três, ou mais colônias diferentes sem o predomínio de nenhuma delas. Adotou-se a exclusão das placas com colônias de bastonetes Gram negativos por tratar-se de agentes etiológicos da mastite clínica, como as bactérias do grupo coliforme, ou contaminação durante o processo de amostragem e falha na antissepcia dos tetos.

#### 4.3 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS

As amostras para CCS foram processadas logo após recebimento no laboratório ou conservadas em câmaras frigoríficas refrigeradas até 7<sup>0</sup>C pelo período máximo de 24 horas. A CCS foi realizada eletronicamente por citometria de fluxo utilizando o equipamento Bentley Somacount 300 (BENTLEY INSTRUMENTS INC., 2007) seguindo os procedimentos preconizados pela Norma Internacional ISO 13366-2 (IDF, 2006). Durante a análise o equipamento adiciona um corante (brometo de etídio) às amostras de leite para marcação do DNA das células. No compartimento designado por célula de fluxo, uma alíquota da amostra recebe um feixe de laser e o DNA corado das células passa a emitir uma fluorescência que

captada pelo equipamento é transformada em pulso elétrico e este convertido em CCS. O resultado é expresso em CCS/mL. O aparelho foi calibrado para o intervalo de 1.000 - 5.000.000 células/mL e regularmente o aferido por meio de amostras padronizadas fornecidas pelo Laboratório de Referência (Valacta - Quebec - Canada) e por comparação com outros ensaios organizados e avaliados pelo Laboratório de Referência Nacional (LANAGRO / MG - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento).

#### 4.4 CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS

As amostras para CTB eram processadas logo após o recebimento pelo laboratório ou conservadas em câmaras frigoríficas refrigeradas em até 7<sup>o</sup> C pelo período máximo de 24 horas. As CTB foram realizadas eletronicamente no equipamento Bentley IBC (BENTLEY INSTRUMENTS INC., 2007), seguindo os procedimentos recomendados pelo fabricante. O Bentley IBC, como no equipamento de CCS, realiza uma contagem direta do número de células bacterianas do leite através da tecnologia de citometria de fluxo. O resultado da contagem individual de bactérias é transformado em UFC/mL através de uma curva de calibração padrão, que expressa os resultados no intervalo de 1.000 a 3.000 UFC/mL. O aparelho foi regularmente verificado por meio de amostras piloto padronizadas fornecidas pelo laboratório de referência (Cecalait - Actilait, Poligny, França).

##### **4.4.1 Estimativa da liberação de bactérias dos quartos mamários através da CTB do leite**

O presente trabalho utilizou os resultados da CTB do leite de quartos assepticamente preparados para representar o número de bactérias liberadas pelas glândulas mamárias sob diferentes estados de infecção. Deste modo, a liberação de bactérias pelos quartos mamários (LBQM), correspondeu ao efeito específico, ou a contribuição de cada patógeno da mastite subclínica no quantitativo de bactérias liberadas.

A adoção deste critério foi possível devido a três estratégias empregadas no presente trabalho:

- Amostragem do leite de quartos mamários de vacas sem sintomas de mastite, associada à exclusão de todas as placas com crescimento de bactérias bastonetes Gram negativos, permitiu direcionar o presente estudo para o grupo dos patógenos da mastite subclínica.
- Amostragem pareada do leite de quartos permitiu a associação entre os resultados das provas bacteriológicas, CCS e CTB.
- A coleta do leite em de quartos mamários previamente desinfetados permitiu a eliminação de duas (pele do teto e equipamentos) das três possíveis fontes de contaminação do leite nas fazendas, restando como única fonte de variação da CTB do leite o interior da glândula mamária (MURPHY; BOOR, 2010).

#### 4.5 AS ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados brutos com os valores de CCS e CTB do leite de quartos mamários, para cada patógeno isolado nos testes bacteriológicos, foram analisados com o sistema de computação estatística SPSS<sup>®</sup>, versão 9.0, de acordo com Morgan et al. (2001). Os dados demonstraram uma grande amplitude de variação com grandes desvios padrão. Utilizando o *software* foi feita a transformação logarítmica (logaritmo na base 10) dos dados de CCS ( $\log_{10}\text{CCS}$ ) e CTB ( $\log_{10}\text{CTB}$ ) para que fossem capazes de trabalhar com a distribuição normal. Foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se os dados apresentaram distribuição normal após transformação logarítmica (RYSANEK; BABAK, 2005). Antes da transformação, o valor 1 foi adicionado a cada valor de "x" e "y" como um método de substituição dos valores iguais a zero. Utilizou-se o teste de Levene para análise da variância dos  $\log_{10}\text{CCS}$  e  $\log_{10}\text{CTB}$  de acordo com os resultados bacteriológicos e o teste t de *Student*, para amostras independentes, para a comparação entre médias a um nível de significância de 95% ( $P < 0,05$ ). A análise de regressão linear foi realizada utilizando o  $\log_{10}\text{CTB}$  de cada patógeno da mastite isolado mais  $\log_{10}\text{CTB}$  de amostras de leite sem crescimento na análise bacteriológica como variável dependente (y) e usando o  $\log_{10}\text{CCS}$  dos mesmos quartos mamários de cada patógeno isolado como variável independente (x). Assim, quatro modelos de regressão linear foram realizados para comparar os coeficientes angulares (coeficiente  $\beta$ ) de acordo com os patógenos da mastite. Os resíduos (desvios das respostas observadas a partir do previsto) foram plotados contra o número de colônias de cada patógeno de mastite isolados

por mililitro de amostra de leite de quarto mamário para determinar se o modelo obteve um bom ajuste (coeficiente de determinação  $R^2$ ). O grau de correlação entre as variáveis foi obtido pela correlação de *Pearson*. A regressão linear e o coeficiente de correlação foram avaliados pela significância estatística.

## 5 RESULTADOS

Nas Tabelas 1 e 2 são mostradas as estatísticas descritivas para CCS e CTB de acordo com os resultados dos exames bacteriológicos. Do total de 638 amostras, em 421 (66,0%) não se observou crescimento no exame bacteriológico, obtendo média geométrica e mediana da CCS de 52.000 e 70.000 células/mL, respectivamente (Tabela 1). Os patógenos isolados no leite de quartos tiveram a seguinte distribuição nos resultados bacteriológicos: *S. aureus* (69/10,8%), SCN (64/10,0%), *S. agalactiae* (45/7,1%) e outros *Streptococcus* spp. (39/6,1%). A maior média geométrica e mediana da CCS observadas foram para *S. agalactiae* (1.572.000 e 1.839.000 células/mL). Na sequência, *S. aureus* (587.000 e 742.000 células/mL) e *Streptococcus* spp (432.000 e 414.000 células/mL) apresentaram o segundo e terceiro valores mais elevados. Os SCN apresentaram os menores valores (85.000 e 133.000 células/mL).

Tabela 1. Estatísticas descritivas para contagens de CCS de quartos mamários de acordo com os resultados dos exames bacteriológicos.

Estatística descritiva	Contagem de células somáticas (1.000 células/mL)				
	SC	SCN	STA	STR	SAG
N	421	64	69	39	45
MG	52	85	587	432	1,572
MA	281	258	1,041	1,504	2,508
DP	793	492	1,138	2,468	1,792
IC (95%)	205 – 357	135 - 381	768 – 1.315	704 – 2.304	1.963 – 3.053
P10	3	3	172	67	390
P25	10	62	273	118	1,151
ME	70	133	742	414	1,839
P75	227	215	1,342	996	4,411
P90	610	595	2,175	7,426	5,248

N – número de amostras; MG – média geométrica; MA – média aritmética; DP – desvio padrão; IC (95%) – intervalo de confiança; P10 - percentil 10%; P25 - percentil 25%; ME – mediana, P75 - percentil 75%; P90 - percentil 90%; SC – sem crescimento; SCN – *Stafilococos* coagulase negativos; STA – *S. aureus*; STR – *Streptococcus* spp. que não *S. agalactiae*; SAG – *S. agalactiae*.

As médias aritméticas do  $\log_{10}$ CCS (Tabela 3), de acordo com os resultados bacteriológicos, aumentaram na seguinte ordem: sem crescimento, SCN, *Streptococcus* spp que não *S. agalactiae*, *S. aureus*, *S. agalactiae*. Análise comparando as médias aritméticas do  $\log_{10}$ CCS revelou uma diferença ( $P < 0,050$ ) entre os resultados dos exames bacteriológicos, exceto para *S. aureus* e *S. agalactiae* que não foram diferentes entre si. Os quartos bacteriológicamente negativos tiveram a menor média aritmética de  $\log_{10}$ CCS (1,71) sendo diferente das médias dos quartos infectados com SCN (1,93), *S. aureus* (2,77) e *Streptococcus* spp que não *S. agalactiae* (2,64) e *S. agalactiae* (3,20).

A média geométrica e mediana da CTB dos quartos bacteriológicamente negativos foram 12.000 e 10.000 UFC/mL, respectivamente (Tabela 2). Os maiores valores de média geométrica e mediana foram para *S. agalactiae* (333.000 e 590.000 UFC/mL). Na sequência, *Streptococcus* spp que não *S. agalactiae* (108.000 e 100.000 UFC/mL) e *S. aureus* (77.000 e 66.000 UFC/mL), apresentaram os segundo e terceiro maiores valores para CTB. SCN apresentaram os menores (17.000 e 15.000 UFC/mL).

Tabela 2. Estatísticas descritivas para a CTB do leite dos quartos mamários de acordo com os resultados dos exames bacteriológicos.

Estatística descritiva	Contagem total bacteriana (1.000 UFC/MI)				
	SC	SCN	STA	STR	SAG
N	421	64	69	39	45
MG	12	17	77	108	333
MA	10	31	260	239	759
DP	256	59	460	452	749
IC (95%)	38 – 87	16 – 46	150 - 371	92 - 385	531 – 987
P10	2	4	14	21	18
P25	6	8	23	48	174
ME	10	15	66	100	590
P75	22	35	269	189	1.028
P90	79	56	772	758	2.078

N – número de amostras; MG – média geométrica; MA – média aritmética; DP – desvio padrão; IC (95%) – intervalo de confiança; P10 - percentil 10%; P25 - percentil 25%; ME – mediana, P75 - percentil 75%; P90 - percentil 90%; SC – sem crescimento; SCN – *Staphylococcus* coagulase negativos; STA – *S. aureus*; STR – *Streptococcus* spp. que não *S. agalactiae*; SAG – *S. agalactiae*.

A análise entre as diferenças das médias aritméticas entre os  $\log_{10}$ CTB (Tabela 3) revelou diferenças entre os resultados dos exames bacteriológicos ( $P < 0,05$ ). A média aritmética dos  $\log_{10}$ CTB cresceu em ordem diferente que os  $\log_{10}$ CCS, a ordem observada foi: sem crescimento, SCN, *S. aureus*, *Streptococcus spp que não S. agalactiae* e *S. agalactiae*. Não foi observada diferença ( $P > 0,05$ ) entre as médias aritméticas  $\log_{10}$ CTB das amostras sem crescimento (1,09) e SCN (1,22). *S. aureus* e *Streptococcus spp que não S. agalactiae* também não demonstraram diferença ( $P > 0,05$ ) entre as suas médias aritméticas do  $\log_{10}$ CTB. No entanto, *S. aureus* e *Streptococcus spp. que não S. agalactiae* foram diferentes ( $P < 0,05$ ) das amostras sem crescimento, SCN e *S. agalactiae*.

Tabela 3. Estatística das diferenças entre as médias da contagem de células somáticas ( $\log_{10}$ CCS) e contagem total bacteriana de quartos mamários ( $\log_{10}$ CTB) do leite de quartos mamários de acordo com os resultados dos exames bacteriológicos.

REB	Número de amostras	Log <sub>10</sub> CCS			Log <sub>10</sub> CTB		
		Média	DP	IC	Média	DP	IC
SC	421	1,71 <sup>a</sup>	0,88	1,63 – 1,80	1,09 <sup>a</sup>	0,63	1,03 – 1,15
SCN	64	1,93 <sup>b</sup>	0,80	1,73 – 2,13	1,22 <sup>a</sup>	0,46	1,10 – 1,33
STA	69	2,77 <sup>c</sup>	0,57	2,63 – 2,90	1,88 <sup>b</sup>	0,72	1,71 – 2,06
STR	39	2,64 <sup>c</sup>	0,72	2,40 – 2,87	2,03 <sup>b</sup>	0,50	1,87 – 2,20
SAG	45	3,20 <sup>d</sup>	0,60	3,03 – 3,39	2,52 <sup>c</sup>	0,77	2,29 – 2,76

REB – resultado do exame bacteriológico; SC – sem crescimento; SCN – *Staphylococcus coagulase negative*; STA – *S. aureus*; STR – *Streptococcus spp. que não S. agalactiae*; SAG – *S. agalactiae*; DP – desvio padrão; IC – intervalo de confiança (95%). Letras iguais na mesma coluna indica que não existe diferença significativa pelo teste t bicaudal ( $P > 0,05$ ).

Os coeficientes de correlação de Pearson encontrados, entre o  $\log_{10}$ CCS e  $\log_{10}$ CTB para cada patógeno do estudo, foram moderadamente elevados ( $P < 0,01$ ): 0,677 *S. agalactiae*, 0,659 *S. aureus*, 0,654 *Streptococcus spp que não S. agalactiae* e 0,626 SCN. Os modelos de regressão linear foram significativamente elevados ( $P < 0,001$ ) e mostraram para cada patógeno da mastite diferentes coeficientes angulares (coeficiente  $\beta$ ). Em ordem, a maior inclinação foi para *S. agalactiae* (0,542), *S. aureus* (0,503), *Streptococcus spp que não S. agalactiae* (0,486) e SCN (0,440).

Tabela 4. Análise da correlação e regressão linear simples para CCS ( $\log_{10}$ CCS) e CTB ( $\log_{10}$ CTB) do leite de quartos mamários de acordo com os resultados dos exames bacteriológicos.

Análise Paramétrica			
REB	Correlação de Pearson	Equação de Regressão	Coefficiente de determinação ( $R^2$ )
SC + SCN	0.626**	$y = 0.338 + 0.440x$ ***	0,385
SC + STA	0.659**	$y = 0.263 + 0.503x$ ***	0,434
SC + STR	0.654**	$y = 0.295 + 0.486x$ ***	0,419
SC + SAG	0.677**	$y = 0.217 + 0.542x$ ***	0,459

REB – resultados dos exams bacteriológicos; SC – sem crescimento; SCN – *Staphylococcus* coagulase negative; STA – *S. aureus*; STR – *Streptococcus* spp. que não o *S. agalactiae*; SAG – *S. agalactiae*; \*\* (P<0.01); \*\*\* (P<0.001).

## 6 DISCUSSÃO

As amostras de leite de quartos mamários sem crescimento de patógenos no exame bacteriológico obtiveram médias geométrica e aritmética da CCS de 52.000 e 281.000 células/mL, respectivamente. Considerando-se o intervalo de confiança de 95%, os valores individuais da CCS dos quartos sem crescimento variaram de 205.000 a 357.000 células/mL. O estudo de meta-análise (DJABRI et al. 2002) obteve as médias geométrica e aritmética da CCS de quartos mamários sadios de 68.000 e 187.000 células/mL, respectivamente. Em ambos os estudos as médias geométricas dos quartos sem crescimento foram semelhantes.

A média geométrica da CCS encontrada no presente estudo para *S. agalactiae* (1.572.000 células/mL) também foi próxima ao valor (1.129.000 células/mL) encontrado no estudo de Djabri et al. (2002) para este patógeno. Em ambos os estudos, os valores da CCS para *S. agalactiae* foram os maiores entre os patógenos relacionados à mastite subclínica. A maior CCS encontrada no trabalho de Djabri et al. (2002) foi causada por *E. coli*, contudo este patógeno geralmente promove casos clínicos de mastite, devido aos seus fatores de virulência e processos fisiopatológicos associados a infecção (HARMON, 1994; HOGAN & SMITH, 2003).

A média geométrica da CCS para *S. aureus* (587.000 células/mL) foi duas vezes maior que a encontrada no estudo de Djabri et al. (2002) (333.000 células/mL). Situação inversa foi observada para os SCN, onde a meta-análise apresentou média geométrica de 155.000 células/mL e no presente trabalho de 85.000 células/mL. Contudo, há alta concordância entre valores encontrados no presente estudo e na meta-análise de Djabri et al. (2002), considerado o intervalo de confiança de 95% para variação da CCS segundo os patógenos identificados. A média geométrica da CCS para o *Streptococcus* spp. que não *S. agalactiae* não permite comparação com o trabalho de Djabri et al. (2002), por que o presente estudo não realizou a identificação de *S. uberis* e *S. dysgalactiae* e Djabri et al. (2002) realizaram o estudo da CCS de quartos na presença de IIM por *S. uberis* e *S. dysgalactiae*.

Embora o presente estudo não tenha identificado *S. uberis* e *S. dysgalactiae*, o valor da média geométrica da CCS para *Streptococcus* spp. que não *S. agalactiae* foi 432.000 células/mL. Dados relatados por DJABRI et al. (2002) mostraram que as CCS (médias geométricas) para *S. uberis* e *S. dysgalactiae* foram 1.024.000 e 547.000 células/mL, respectivamente. A média geométrica CCS para *Streptococcus* spp. que não *S. agalactiae* foi mais próxima de *S. dysgalactiae* do que *S. uberis*, mais há sobreposição de valores no

intervalo de confiança nos dois estudos. Deste modo, é sugestivo que a maior parte dos *Streptococcus* spp. que não *S. agalactiae* constitui-se de *S. dysgalactiae* ou *S. uberis*, com base nos resultados.

Considerando valores acima do limite de 70.000 células/mL para classificar os quartos mamários como infectados, os resultados deste estudo são consistentes com estudo o anterior (DJABRI et al., 2002). As estatísticas descritivas demonstraram uma grande variação nos resultados de CCS e CTB de acordo com os resultados dos exames bacteriológicos. Esta variação é sugestiva de que o exame bacteriológico tenha apresentado resultados falsos negativos, principalmente devido à realização de uma única amostragem do leite para determinação da mastite infecciosa subclínica. Com isso, patógenos como *S. agalactia* e *S. aureus* podem não terem sido detectados na prova bacteriológica, devido ao padrão intermitente de liberação de bactérias no leite nestas infecções crônicas. (HARMON, 1994; SEARS et al., 1990; WALKER, 2010). Considerando o exposto, os resultados da CTB de quartos sem crescimento podem ter tido um acréscimo na CTB por microrganismos de glândulas infectadas não diagnosticadas nas provas bacteriológicas. Também deve ser considerada a possibilidade de contribuição da microbiota normal da pele tetos para a CTB do leite de quartos, a despeito de todos os cuidados com a prévia antissepcia dos quartos antes da coleta das amostras.

Os resultados da liberação de bactérias pelos quartos mamários (LBQM) de acordo com os isolamentos bacteriológicos demonstraram semelhança com os resultados de CCS. A principal diferença entre os resultados da LBQM em relação à CCS foi para o *S. aureus* e *Streptococcus* spp. que não *S. agalactiae*. Neste caso, LBQM infectados por *Streptococcus* spp. que não *S. agalactiae* foi maior quando comparado com quartos infectados por *S. aureus*. Os outros patógenos isolados (*S. agalactiae* e SCN) apresentaram à maior e a menor liberação de bactérias e de CCS, respectivamente. A média geométrica encontrada para amostras com isolamento de patógenos da mastite variou de 17.000 a 333.000 UFC/mL. A variação dos resultados da LBQM estão de acordo com Keefe (1997) e Bramley; Mckinnon. (1990) que mencionam que a liberação de bactérias por vacas infectadas pode variar de 100 a 10.000.000 UFC/mL de leite. Gonzalez et al. (1986) estudaram a capacidade de predição do percentual de vacas infectadas por patógenos da mastite a partir da determinação do número UFC/mL de patógenos isolados no leite do rebanho (leite do tanque resfriador) e encontraram uma correlação moderadamente alta ( $P < 0,0005$ ) para *S. agalactiae* (0,714 Spearman; 0,680, Pearson), permitindo verificar que rebanhos com contagens de *S. agalactiae* maiores a 4.000 UFC/mL no leite do tanque possuíam, ao menos, 7% das vacas liberando esta bactéria no

rebanho. Esta correlação foi pequena para *S. aureus*, *Streptococcus* spp. que não *S. agalactiae*, SCN e bactérias coliformes. No entanto, *S. uberis* foi identificado como patógeno da mastite que pode causar picos de CTB no leite do tanque, variando 14.000-600.000 UFC/mL (HAYES et al., 2001; ZADOKS et al., 2004). Deste modo, o impacto dos patógenos na CTB do tanque depende da percentagem de quartos mamários infectados e o patógeno da mastite envolvido. O estágio da infecção também pode contribuir com um aumento da liberação de bactérias na glândula mamária (SEARS et al., 1990; KEEFE, 1997) e consequentemente com o aumento do volume da CTB do rebanho (RYSANEK; BABAK, 2005).

Os resultados da correlação demonstraram que quando o valor da CCS é elevado espera-se, também, um alto número de patógenos da mastite por mL de leite da amostra. Assim, a CCS se associa positivamente a LBQM, contudo a correlação encontrada não foi suficiente para avaliar as diferenças entre os patógenos da mastite com o aumento da CCS. Entretanto, os coeficientes angulares das regressões lineares previram que o aumento da CCS pode ser associado a diferentes valores de LBQM de acordo com o patógeno da mastite envolvido. Estes resultados demonstraram que *S. agalactiae* e *Streptococcus* spp. que não *S. agalactiae* podem causar maiores CTB no leite de rebanhos (HAYES et al., 2001; ZADOKS et al., 2004).

Infelizmente ainda há um longo caminho a ser percorrido para a compreensão de várias questões relacionadas aos fatores de virulência bacterianos (GYLES; PRESCOT, 2010). A maior parte do conhecimento sobre os mecanismos de subversão do sistema de defesa foram baseados em evidências de estudos *in vitro*, com cultivos celulares, ou pela inoculação em modelos biológicos adaptados, como ratos e coelhos, para posterior interpretação no contexto da mastite em bovinos. Estes experimentos não conseguem simular o real contexto das infecções, que corresponde ao ambiente dos tecidos mamários infectados frente às possíveis respostas do sistema imunológico. É de conhecimento que as bactérias podem atingir seus objetivos por múltiplas vias e os estudos *in vitro* não conseguem simular todos estes efeitos (HODGINS; SHEWEN, 2010).

A variação dos resultados de CCS e LBQM, conforme os patógenos da mastite subclínica, pode ser justificada pelos diferentes fatores de virulência associados aos agentes da mastite estudados. As altas CCS observadas nas IIM por *S. agalactiae* podem ser explicadas pela ação citotóxica do seu fator de virulência CAMP, que resulta em danos teciduais no epitélio secretor e pavimentar intramamários, com a consequente liberação de citocinas inflamatórias que fazem a quimiotaxia de uma expressiva taxa de células de defesa

para o sítio da infecção mamária, causando uma marcante elevação da CCS do leite de animais e do rebanho. As altas taxas de LBQM podem ser correlacionadas à característica de pouca invasividade do *S. agalactiae*. Durante as mastites, este patógeno permanece na luz dos alvéolos secretores e dos ductos mamários se multiplicando intensamente, causando lesões teciduais e uma resposta inflamatória. Durante o processo de ordenha das vacas, o fluxo mecânico originado pela retirada do leite consegue arrastar uma grande quantidade de *S. agalactiae* para o exterior da glândula, causando as altas taxas de LBQM que irão impactar a CTB do rebanho (TIMONEY, 2010).

*S. aureus* é um patógeno com grande capacidade de invasão dos tecidos da glândula mamária. Ele consegue sobreviver e se multiplicar no interior das células epiteliais e das células fagocitárias do sistema de imune, podendo ser encontrado também no tecido subjacente (estroma) dos tecidos secretores. Por apresentar esta característica, é considerado um patógeno bem adaptado a vida dentro dos hospedeiros, sendo menos reconhecido pelas táticas de defesa do sistema imunológico, originando menos estímulos para o aumento da CCS, principalmente se comparado ao *S. agalactiae*. Isto pode justificar, ao menos em parte, os resultados encontrados na comparação entre as médias destes dois patógenos. A característica invasiva também é associada à capacidade de formar biofilmes e ambas estão relacionadas à presença de cápsula bacteriana. Os resultados da LBQM relacionadas ao *S. aureus* podem ser justificadas uma vez que a capacidade de invasão de células e a formação de biofilmes impedem um grande arraste de bactérias deste patógenos durante o processo de ordenha do leite (HERMANS et al. 2010). Gonzáles et al. (1986) relatou que as IIM que mais impactaram na CTB do leite de rebanhos foram as causadas pelos *Streptococcus* spp., notadamente *S. agalactiae*, enquanto *S. aureus* causou baixas CTB de até 60.000 UFC/mL.

A capacidade do *S. aureus* de causar ciclos intermitentes de liberação de bactérias com picos de CCS durante as infecções crônicas (SEARS et al. 1990; PYÖRÄLÄ, 1995; QUINN et al. 2002) e a composição bacteriana do grupo representado pelo *Streptococcus* spp. que não *S. agalactiae* (*S. uberis*, *S. dysgalactiae* entre outros *Streptococcus* spp não citados) podem ter gerados vários efeitos de variação na CCS e CTB do leite de quartos, impedindo a diferenciação estatística entre as suas médias do  $\log_{10} \text{CCS}$  e  $\log_{10} \text{CTB}$ .

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados das análises bacteriológicas, CCS e CTB do leite de quartos mamários de vacas quantificaram a CCS e a LBQM de acordo com a identificação dos patógenos da mastite subclínica.

O estudo estatístico estabeleceu as relações entre a CCS e a LBQM dos patógenos isolados. *S. agalactiae* e SCN foram os patógenos que apresentaram as maiores e menores elevações da CCS e da LBQM, respectivamente, se diferenciando dos demais patógenos ( $P < 0,05$ ). *Streptococcus* spp. que não *S. agalactiae* e *S. aureus* apresentaram resultados próximos, não permitindo determinar uma diferença estatística ( $P > 0,05$ ). Os valores de LBQM encontrados no isolamento de SCN e dos quartos bacteriologicamente negativos também não permitiram diferenciação estatística ( $P > 0,05$ ). Foi evidenciada correlação positiva entre as maiores CCS e a LBQM.

As CCS do leite de vacas é uma ferramenta útil no controle da mastite, mais também de valor na manutenção de baixas CTB no leite do rebanho.

## REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M.; JENSEN, N. E. Genotypic and phenotypic diversity of *Streptococcus dysgalactiae* strains isolated from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n.3-4, p. 315-323, 1996.
- BARBOSA, S. B. P.; BATISTA, A. M. V.; MONARDES, H. **Anais do 3<sup>o</sup> congresso brasileiro de qualidade do leite, de 23 a 26 de setembro de 2008, 3m Recife, PE**. 1<sup>a</sup> Ed. Recife: CSS Gráfica e editora, 2008a. 373p.
- BARBOSA, S. B. P.; JATOBÁ, R. B.; BATISTA, A. M. V. A instrução normativa 51 e a qualidade do leite na região nordeste e nos estados do Pará e Tocantins. In: III CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE; 2008. Pernambuco **Anais...** Recife. Ed. CCS, 2008b, 25p.
- BARTLETT, P. C.; MILLER, G. Y.; LANCE, S. E.; HANCOCK, D. D.; HEIDER, L. E. Managerial risk factors of intramammary infection with *Streptococcus agalactiae* in dairy herds in Ohio. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 9, p. 1715-1721, 1992a.
- BARTLETT, P. C.; MILLER, G. Y.; LANCE, S. E.; HEIDER, L. E. Managerial determinants of intramammary coliform and environmental streptococci infections in Ohio dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 5, p. 1241-1252, 1992b.
- BARTLETT, P. C.; MILLER, G. Y.; LANCE, S. E.; HEIDER, L. E.; ANDERSON, C. R. Environmental and managerial risk factors of intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in Ohio dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 14, n. 1-2, p. 129-142, 1992c.
- BELOTI, V.; MÁXIMO, R. A.; ARAÚJO, J. P. A.; MARTINS, V. S.; SHECAIRA, C. L.; YAMADA, A. K.; TAMANINI, R.; DIEKMANN, M.; SILVA, R. S. Qualidade microbiológica e contagem de células somáticas do leite de pequenos produtores da região de Ivaiporã/PR. In: IV CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE; 2010. Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, 2010. CD ROM.
- BENTLEY INSTRUMENTS INC. **User manual: Bentley BactoCount IBC** User Manual Revision G, Chaska, MN, 2007,110p.
- BODDIE, R. L.; NICKERSON, S. C. Evaluation of tow iodophor teat germicides: activity against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 1846-1850, 1997.

BOERLIN, P. Evolution of bacterial virulence. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, G.; THOEM, C. O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 4<sup>a</sup> ed. Blackwell Publishing ed., Iowa, USA, v.1, 2010, p. 11-14.

BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an evolving disease. **Veterinary Journal**, v.164, n.2, p.116-128, 2002.

BRADLEY, A. J.; GREEN, M. J. A study of the incidence and significance of intramammary enterobacterial infections acquired during the dry period. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 9, p. 1957-1965, 2000.

BRAMLEY, A. J. Mastitis. In: ANDREWS, A. H.; BLOWEY, R. W.; BOYD, H.; EDDY, R. G. **Bovine Medicine: Diseases and husbandry of Cattle**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1993. p. 289-300.

BRAMLEY, A. J.; DODD, F. H. Reviews of the progress of Dairy Science: Mastitis control – progress and prospects. **Journal of Dairy Research**, v.51, n.3, p. 481-512, 1984.

BRAMLEY, A.J.; McKINNON, C.H. The microbiology of raw milk.. In: **Dairy Microbiology the Microbiology of Milk**. 2nd ed. R.K. Robinson. ed. Elsevier Science Publishers. London. United Kingdom, v.1, 1990, p.163-208.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº51 de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, do Leite Tipo B, do Leite TipoC, do Leite Pausterizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu transporte a Granel . Diário Oficial da União, Brasília, 18 de setembro de 2002. Seção 3.disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/das/dipoa/in51>. htm>.Acesso em 01 set. 2010.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P.; VERNEQUE, R. S. Contagem bacteriana da superfície de tetas de vacas submetidas a diferentes processos de higienização, incluindo a ordenha manual com participação do bezerro para estimular a descida do leite. **Ciência Rural**, v. 30, n. 5, p. 847-850, 2000.

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

CALVINHO, L. F.; ALMEIDA, R. A.; OLIVER, S. P. Potential virulence factors of *Streptococcus dysgalactiae* associated with bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 61, n.1-2, p. 93-110, 1998.

CARVALHO, G. L. O.; SILVA, J. A.; OLIVEIRA, E. F.; LOPES JÚNIOR, J. E. F.; FARIA, C. G., VICENTINI N. M.; SOUZA G. N. Avaliação dos componentes do leite e contagem de

células somáticas de rebanhos bovinos localizados na microrregião de Ji-Paraná, Rondônia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE; 2010. Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, 2010. CD ROM.

CASSOLI, D. C.; MACHADO, P. F.; CARDOSO, F. Diagnóstico da qualidade do leite na região sudoeste entre 2005 e 2008. In: III CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE; 2008. Pernambuco **Anais...** Recife. Ed. CCS, 2008, 45p.

COELHO, S. M. O; REIMOSO, E.; PEREIRA, I. A.; SOARES, L. C.; DEMO, M.; BONI, C.; SOUZA, M. M. S. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.29, n.5, p.369-374, 2009.

CORRÊA, A. B. A.; AMÉRICO, M. A.; OLIVEIRA I. C. M.; SILVA, L. G.; MATTOS, M. C.; FERREIRA, A. M. M.; COUCEIRO, J. N. S. S.; FRACALANZZA, S. E. L.; BENCHETRIT L. C. Virulence characteristics of genetically related isolates of group b Streptococci from bovines and humans **Veterinary Microbiology**, v. 143, p. 429-433, 2010.

COSTA, G. M. **Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região Sul do Estado de Minas Gerais**, 2008. 123p. In: Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. 2002 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 37, de 18 de abril de 2002. Instituir a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite, com objetivo de realizar análises laboratoriais para fiscalização de amostras de leite cru, recolhidas em propriedades rurais e em estabelecimentos de laticínios.

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

DOHOO, I. R.; LESLIE, K. E. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. **Preventive Veterinary Medicine**, v.10, n.4, p.225-237, 1991.

DÜRR, J. W. Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite: uma oportunidade única. In: DÜRR, J. W. et al. (eds.). **O Compromisso com a Qualidade do Leite no Brasil**. Passo Fundo: Ed. UPF, 2004. p. 38-55.

EBERHART, R. J.; HUTCHINSON, J.; SPENCER, S. B. Relationships of bulk tank somatic cell counts to prevalence of intramammary infection and to indices of herd production. **Journal of Food Protection**, v. 45, n. 12, p. 1125-1128, 1982.

ELBERS, A. R.; MILTENBURG, J. D.; DE LANGE, D.; CRAUWELS, A. P. BARKEMA, H. W.; SCHUKEEN, Y. H. Risk factors for clinical mastitis in a random sample of dairy herds from the southern part of The Netherlands. **Journal Dairy Science**, v. 81, n. 2, p. 420-426, 1998.

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

EMANUELSON, U.; FUNKE, H. Effect of milk yield on relationship between bulk milk somatic cell count and prevalence of mastitis. **Journal Dairy Science**, v.74, n.8, p. 2479-2483, 1991.

ENUMERATION of microorganism in milk and milk products—colony count technique at 30°C. **International IDF Standard**, n. 100B, 1991

FOSCHINO, R.; INVERNIZZI, A.; BARUCCO, R.; STRADIOTTO, K. Microbial composition including the incidence of pathogens of goat milk from bergamo region of Italy during lactation year. **Journal of Dairy Research**, v.69, n.2, p.213-225, 2002.

FONSECA L, M.; RONON, R.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; LEITE, M. O.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. Situação da qualidade do leite cru em Minas Gerais-2007/2008. In: III CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE; 2008. Pernambuco **Anais...** Recife. Ed. CCS, 2008, 53p.

FOX, L. K.; CHESTER, S. T.; HALLBERG, J. W.; NICKERSON, S. C.; PANKEY, J. W.; WEAVER, L. D. Survey of intramammary infections in dairy heifers at breeding age and first parturition. **Journal Dairy Science**, v. 78, n. 7, p. 1619-1628, 1995.

FRASES curtas. c2011. Disponível em:<<http://www.frasescurtas.com.br/2010/08/frases-dalai-lama.html>>. Acesso em: 11 maio 2011.

GODDEN, S. Put a stop to dry and fresh cow mastitis. In: REGIONAL MEETING OF NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2004, Bloomington. *Proceedings...* Verona: NMC, 2004. p. 6-18.

GONZALEZ, R.N.; JASPER, D. E.; BUSHNELL; R. B.; FARVER T. B. Relationship between mastitis pathogens numbers in bulk milk and bovine udder infections in California dairy herds. **Journal of American Veterinay Medical Association**, v.189, n.4, p.442-445, 1986.

GYLES, C. L.; PRESCOTT J. F. Themes in Bacterial Pathogenic Mechanisms. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, G.; THOEM, C. O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 4<sup>a</sup> ed. Blackwell Publishing ed., Iwoa, USA, v.1, 2010, p. 3-14.

- HAAS, Y.; BARKEMA, H. W.; VEERKAMP, R. F. The effect of pathogen-specific clinical mastitis on the lactation curve for somatic cell count. **Journal Dairy Science**, v. 85, n. 5, p. 1314-1323, 2002.
- HARMON, R.J. et al. Bacteriological procedures for diagnosis of bovine udder infection. Arlington: **National Mastitis Council**, 34p. 1990.
- HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v.77, n.7, p.2103-2113, 1994.
- HAYES, M.C. et al. Identification and characterization of elevated microbial counts in bulk tank raw milk. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.1, p.292-298, 2001.
- HERMANS, K.; DEVRIESE, L. A.; HAESEBROUCK, F. Staphylococcus. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, G.; THOEM, C. O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 4<sup>a</sup> ed. Blackwell Publishing ed., Iowa, USA, v.1, 2010, p. 75-89.
- HOBLET, H. et al. Mastitis microbiology simplified. **Bovine Practitioner**, n. 21, p. 77 – 78, 1986.
- HODGINS D. C.; SHEWEN P. E. Subversion of the Immune Response by Bacterial Pathogens In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, G.; THOEM, C. O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 4<sup>a</sup> ed. Blackwell Publishing ed., Iowa, USA, v.1, 2010, p. 15-32.
- HOGAN, J.; SMITH, K.L. Coliform mastitis. **Veterinary Research**, v.34, n.5, p.507-519, 2003.
- HOLM, C. et al. A flow cytometric technique for quantification and differentiation of bacteria in bulk tank milk **Journal of Applied Microbiology**, v.97, n.5, p.935–941, 2004.
- HORST, J. A.; VALLOTO A. A. Programa de análise de rebanhos leiteiros do Paraná: qualidade do leite analisado no laboratório do Paraná – IN51/2002. In: III CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE; 2008. Pernambuco **Anais...** Recife. Ed. CCS, 2008, 35p.
- IDF, International Standard ISO 13366-2; IDF 148-2, 13p., 2006.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Milk and milk products - Guidance on sampling. Geneva: ISO and IDF, International Standard ISO 707, 50p., 2008.
- JAYARAO B. M. et al. Guidelines for monitoring BTM somatic cell and bacterial counts **Journal of Dairy Science**, v.87, n.10, p.356-3573, 2004.

JAYARAO B. M.; WOLFGANG, D. R. Bulk tank milk analysis a useful tool for improving milk quality and herd udder, **Veterinary Clinics Food Animal**, v.19, n.1, p.75-92, 2003.

KEEFE, G. P.; DOHOO, I. R.; SPANGLER, E. Herd prevalence and incidence of *Streptococcus agalactiae* in the dairy industry of Prince Edward Island. **Journal Dairy Science**, v. 80, n. 3, p. 464-470, 1997.

KEEFE, G.P. *Streptococcus agalactiae*: a review. **Canadian Veterinary Journal**, v.38, n.7, p.429-437, 1997.

KEHRLI, JR. M. E. K.; SHUSTER, D. E. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. **Journal Dairy Science**, v. 77, n. 2, p. 619-627, 1994.

KENNEDY, B. W.; SETHAR, M. S.; TONG, A. K.; W.; MOXLEY, J. E. Environmental factors influencing test-day somatic cell counts in Holstein. **Journal Dairy Science**, v. 65, n.2, p. 275-285, 1982.

KITCHEN, B. J. Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. **Journal of Dairy Research**, v.48, n. p.167-188, 1981.

KOLLING, G. J.; SILVA, D. A. R.; FISCHER, V.; ZANELA, B. M. Avaliação da qualidade do leite produzido na região nordeste do rio grande do Sul parte II – caracterização física, ccs e ctb. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE; 2010. Florianópolis. **Anais...** Florianópolis. 2010. CD ROM.

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

LeBLANC, S.J.; LISSEMORE, K.D.; KELTON, D.F.; LESLIE, K. E. Major advances in disease prevention in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.89, n.4, p.1267-1279, 2006.

LEHTOLAINEN, T; POHJANVIRTA T., PYÖRÄLÄ, S.; PELKONEN, S. Association Between Virulence Factors and Clinical Course of Escherichia coli Mastitis. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v.44 ,p. 203-205, 2003.

LEIGH, J. A. *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis. **The Veterinary Journal**, v. 157, n.3, p.225-238, 1999.

LEITNER, G.; KRIFUCKS, O.; GLICKMAN, A.; YOUNIS, A.; SARAN, A. Staphylococcus aureus strains isolated from bovine mastitis: virulence, antibody production and protection from challenge in a mouse model. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 35 p. 99-106, 2003.

MATOS, J. S.; WIHTE, D. G.; HARMON, R. J.; LANGLOIS, B. E.; Isolation of *Staphylococcus aureus* from sites other than the lactating mammary gland. **Journal Dairy Science**, v. 74, n. 5, p. 1544-1549, 1991.

MATTHEWS, K. R.; HARMON, R. J.; LANGLOIS, B. E. Prevalence of *Staphylococcus aureus* species during the periparturient period in primiparous and multiparous cows. **Journal Dairy Science**, v. 75, n. 7, p. 1835-1839, 1992.

MEDEIROS, M. A.; COUTINHO, P. X.; OMELLAS, R. P.; LEITE, A. V. F.; RISTOW, A. M. Avaliação da qualidade do leite cru do município de São José do Barreiro- SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE; 2010. Florianópolis. **Anais...** Florianópolis. 2010. CD ROM.

MESQUITA, J. M.; NEVES, R. B. S.; BUENO, V. F. F.; OLIVEIRA, A. N. A qualidade do leite na região centro oeste e norte do Brasil avaliada no laboratório de qualidade do leite – Goiânia - GO. In: III CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE; 2008. PERNAMBUCO **Anais...** Recife. Ed. CCS, 2008, 11p.

MORGAN, G.A.; GRIEGO, O.V.; GLOECKNER, G.W.; SPSS for Windows: **An introduction to use and interpretation in research**. Lawrence Erlbaum Associates, Inc., Publishers, Mahwah, NJ., 54p., 2001.

MURPHY, S.C., BOOR, K.J. **Sources and Causes of high bacteria counts in raw milk**: an abbreviated review, 2010. Disponível em: [http://www.extension.org/pages/Sources\\_and\\_Causes\\_of\\_High\\_Bacteria\\_Counts\\_in\\_Raw\\_Milk:\\_An\\_Abbreviated\\_Review](http://www.extension.org/pages/Sources_and_Causes_of_High_Bacteria_Counts_in_Raw_Milk:_An_Abbreviated_Review)>. Acesso em : 23/07/2010.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Current concepts of bovine mastitis**. Madison: National Mastitis Council, 1996. 64 p.

NEIJENHUIS, F.; MEIN, G. A.; BRITT, J. S.; REINEMANN, D. J.; HILLERTON, J. E.; FARNSWORTH, R.; BAINES, J. R.; HEMLING, T.; OHNSTAD, I.; COOK, N. B.; MORGAN, W. F. Evaluation of bovine teat condition in commercial dairy herds: 4. Relationship between teat-end callosity or hyperkeratosis and mastitis. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MASTITIS AND MILK QUALITY, 2, 2001, Vancouver. **Proceedings**... Vancouver: NMC, 2001. p. 362-366.

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

NICKERSON, S. C.; OWENS, W. E.; BODDIE, R. L. Mastitis in dairy heifers: initial studies on prevalence and control. **Journal Dairy Science**, v. 78, n. 7, p. 1607-1618, 1995.

OSTERAS, O.; EDGE, V. L.; MARTIN, S. W. Determinants of success or failure in the elimination of major mastitis pathogens in selective dry cow therapy. **Journal Dairy Science**, v. 82, n. 6, 1221-1231, 1999.

PAAPE, M. J.; CONTRERAS, A. Historical perspective on the evolution of the milk somatic cell count. **Fleming Veterinary Journal**, v. 66, Suppl., p. 93-105, 1997.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Mastitis: counter attack**. A strategy to combat mastitis. Naperville: Babson Bros. Co., 1991. 150 p.

PYÖRÄLÄ, S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. **Veterinary Research**, v.34, n.5, p.565-578, 2003.

PYÖRÄLÄ, S. Mastitis caused by different microbes. In: SANDHOLM, M.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; KAARTINEN, L.; PYÖRÄLÄ, S. **The bovine udder and mastitis**. Helsinki: University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, 1995. p. 143-160.

PRINCIPAIS INDICADORES LEITE E DERIVADOS: boletim eletrônico mensal. Coordenadores, Glauco Rodrigues Carvalho e Alziro Vasconcelos Carneiro. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, v. 3, n. 30, 10 dez. 2010. Disponível em:< [http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2010\\_12\\_indicadores\\_leite.pdf](http://www.cileite.com.br/sites/default/files/2010_12_indicadores_leite.pdf)>. Acesso em: 22/01/2011.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Bacterial causes of bovine mastitis. In: **Veterinary Microbiology and Microbial disease**. Oxford: Blackwell, 2002. p. 465-475.

RADOSTITS, O. M.; LESLIE, K. E.; FETROW, J. In: **Herd health: food, animal, production, medicine**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1994. 629 p.

REBHUN, W. C.; GUARD, C.; RICHARDS, C. M. In: **Diseases of dairy cattle**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1995. 530 p.

RENEAU, J. K. Effective use of Dairy Herd Improvement somatic cells counts in mastitis control. **Journal Dairy Science**, v. 69, n.6. p.1708-1720, 1986.

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

RYSANEK, D.; BABAK, V. Buk tank milk somatic cell count as an indicator of the hygiene status of primary milk production. **Journal of Dairy Research**, v.72, n.4, p.400-405, 2005.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F. **Estratégias para controle da mastite e melhoria da qualidade do leite**. In: Conceitos sobre a mastite, prejuízos causados pela mastite, controle da contaminação bacteriana do leite. Ed. Malone. Barueri, São Paulo, 2007.

SARGEANT, J. M.; LESLIE, K. E.; SHIRLEY, J. E.; PULKRABEK, B. J.; LIM, G. H. Sensitivity and specificity of somatic cell count and California Mastitis Test for identifying intramammary infection in early lactation. **Journal Dairy Science**, v. 84, n. 9, p. 2018-2024, 1986.

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

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

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

SOMMERHÄUSER, J.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W.; ZSCHÖCK, M.; SOBIRAJ, A.; FAILING, K. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. **Veterinary Microbiology**, v. 96, n. 1, p. 91-102, 2003.

SOUZA, G.N., BRITO, M.A.V.P., LANGE, C.C., BRANDÃO, H.M., MENDONÇA, L.C., BRITO, J.R.F 2010. Presença de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* nos rebanhos bovinos e os limites de contagem de células somáticas e contagem total de bactérias estabelecidos na instrução normativa 51. In: IV CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE; 2010. Florianópolis. **Anais...** CD ROM.

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

SOUZA, G. N. BRITO, M.A.V.P.; LANG, C. C.; FARIA, C. G.; MORAES, L. C. D.; BRITO, J. R. F. In: III CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE; 2008. PERNANBUCO **Anais...** Recife. Ed. CCS, 2008, 71p.

- TAPONEN, S.; PYÖRÄLÄ, S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis: not so different from *Staphylococcus aureus*? **Veterinary Microbiology**, v. 134, p. 29–36, 2009.
- TIMONEY, J. F. Streptococcus. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, G.; THOEM, C. O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 4<sup>a</sup> ed. Blackwell Publishing ed., Iowa, USA, v.1, 2010, p. 51-73.
- TODHUNTER, D. A.; SMITH, K. L.; HOGAN, J. S. Environmental streptococcal intramammary infections of the bovine mammary gland. **Journal Dairy Science**, v. 78, n. 11, p. 2366-2374, 1995.
- TOMAZI, T; SILVA, C. G.; BONDAN, C.; ALVES, L. P.; GONZÁLEZ H. D.; RODEGUERI, S.C. Avaliação da qualidade microbiológica do leite produzido no estado do Rio Grande do Sul no período de janeiro de 2008 a março de 2010. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE; 2010. Florianópolis. **Anais...** Florianópolis. 2010. CD ROM.
- VECHT, U.; WISSELINK, H. J.; DEFIZE, P. R. Dutch national mastitis survey. The effect of herd and animal factors on somatic cell count. **Netherland Milk Dairy Journal**, v. 43, n.4, p. 425-435, 1989.
- WALKER et al., **Variation in daily shedding pattern of *staphylococcus aureus* in naturally occurring intramammary infections** In: NMC Annual Meeting Proceedings. The Ohio State University, Columbus, Ohio, USA, 2010.
- WATTS, J.L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.16, n.1, p.41-66, 1988.
- WILSON, D. J.; GONZALEZ, R. N.; DAS, H. H. Bovine mastitis pathogens in New York and Pensilvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. **Journal Dairy Science**, v. 80, v. 10, p. 2592-2598, 1997.
- ZADOKS, R. N.; ALLORE, H. G.; BARKEMA, H. W.; SAMPIMON, O. C.; WELLENBERG, G. J.; GRÖHN, Y. T.; SCHUKEEN, Y. H. Cow- and quarter-level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal Dairy Science**, v. 84, n. 12, p. 2649-2663, 2001a.
- ZADOKS, R. N.; ALLORE, H. G.; BARKEMA, H. W.; SAMPIMON, O. C.; GRÖHN, Y. T.; SCHUKEEN, Y. H. Analysis of an outbreak of *Streptococcus uberis* mastitis. **Journal Dairy Science**, v. 84, n. 3, p. 590-599, 2001b.
- ZADOKS, R. N.; ALLORE, H. G.; HAGENAARS, T. J.; BARKEMA, H. W.; SCHUKEEN, Y. H. A mathematical model of *Staphylococcus aureus* control in dairy herds. **Epidemiology and Infection**, v. 129, n. 2, p. 397-416, 2002.

ZADOKS, R. N.; GILLESPIE, B. E.; BARKEMA, H. W.; SAMPIMON, O. C.; OLIVER, S. P.; SCHUKEEN, Y. H. Clinical, epidemiological and molecular characteristics for *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. **Epidemiology and Infection**, v. 130, n. 2, p. 335-349, 2003.

ZADOKS. R.N.. GONZALEZ. R.N.. BOOR. K.J.. SCHUKKEN. Y.H. Mastitis-causing Streptococci are important contributors to bacterial counts in raw bulk tank milk. **Journal of Food Protection**, v.67, n.12, p.2644-2650, 2004.

ZOCCAL, R.; CARNEIRO, A.V.; JUNQUEIRA, R. ZAMAGNO, M. A nova pecuária leiteira brasileira. In: BARBOSA, S.B.P.; BATISTA, A.M.V.; MONARDES, H. (Org.). Leite: Segurança alimentar e saúde pública. Recife: **Anais...** Recife: Ed. CCS, 2008. p.85-95.

## APÊNDICE

Trechos dos seis trabalhos publicados nos anais do III CBQL (BARBOSA et al. 2008a), realizado de 23 a 26 de setembro de 2008. Foram colhidas as impressões dos autores quanto à qualidade do leite produzido segundo o atendimento da IN 51. As transcrições são encimadas pela informação do laboratório da RBQL e sua área de abrangência.

1. Laboratório de Qualidade do Leite, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, GO. Área de abrangência: Região Centro Oeste (Goiás Mato Grosso, Mato Grosso do Sul) e Norte (Tocantins, Maranhão, Pará e Rondônia) e parte do Estado Minas Gerais.

Há de se pensar urgentemente em um programa nacional de capacitação de mão de obra que envolva todos os elos da cadeia produtiva objetivando reduzir drasticamente a CTB e elevar os sólidos do leite. Soma-se a isto a necessidade das empresas e órgãos oficiais utilizarem racionalmente os resultados analíticos laboratoriais da RBQL como ferramenta indispensável na melhoria efetiva da qualidade do leite (MESQUITA et al., 2008, p. 21).

2. Programa de Gerenciamento de Rebanhos Leiteiros do Nordeste, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Pernambuco, PE. Área de abrangência: Região Nordeste e Estados do Pará e Tocantins.

Os resultados obtidos no primeiro ano de adoção da IN-51 mostra a necessidade de mudanças de atitudes urgentes, que envolvem toda a matriz leiteira, desde o produtor, passando pela indústria, até o consumidor final. Considerando a IN-51, nesse momento as maiores preocupações recaem sobre o ESD e CBT, que apresentaram valores muito altos em não conformidade. Há de se adotar medidas urgentes uma vez que a partir de julho/09 novos valores de CCS e CBT entrarão em vigor para essas regiões (BARBOSA et al., 2008b, p. 32)

3. Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros do Paraná da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa e Universidade Federal do Paraná, PR. Área de abrangência: Estado do Paraná.

Os dados apresentados nos mostram que com a implantação da IN-51/2002 houve não só um incremento no número de rebanhos monitorado, mas conhecimento da realidade da qualidade do leite produzido. Empresas/indústrias e cooperativas com programas de monitoramento voltados a melhoria da qualidade, através de assistência técnica ou em conjunto com programas de qualidade tem tido resultados positivos na melhoria do leite de seus produtores (HORST; VALLOTO, 2008, p. 44).

4. Laboratório de Qualidade e Clínica do Leite, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. Área de abrangência: Região Sudeste.

No caso da CCS e da CBT, a partir de Julho de 2008, passou a vigorar o novo limite máximo de 750.000. No caso da CCS observa-se que a % NC passou de cerca de 9% para 16% no mês de Julho/08, em função da alteração deste limite. Já no caso da CBT, não se observou aumento significativo na % NC (CASSOLI et al., 2008, p. 51).

5. Laboratório de Análise da Qualidade do Leite, Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. Área de abrangência: Estado de Minas Gerais.

Os dados de ocorrência de amostras “não conformes”, de acordo com os critérios da Instrução Normativa 51/2002 sugerem a necessidade de um monitoramento contínuo da qualidade do leite e de revisão dos procedimentos de manejo adotados nas propriedades. A contagem bacteriana do leite ainda é um dos principais fatores que influenciam o número de amostras que não apresentam padrão de qualidade compatível com a legislação em vigor (FONSECA et al., 2008, p.66, 67).

6. Laboratório de Qualidade do Leite Professor José de Alencar, EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. Área de abrangência: Estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro.

Considerando que no Brasil em julho de 2011 o limite máximo da CCS do rebanho será de 400.000 células/ml e atualmente cerca de 50% dos rebanhos apresentam CCS acima deste valor, um dos grandes desafios para a pecuária leiteira nacional é proporcionar esta redução em 4 anos. Os resultados apontam para a necessidade urgente de redução nas CTB no leite dos rebanhos analisados. O desafio de reduzir a CTB, bem como a CCS, dos rebanhos pode ser vencido se houver uma difusão e imediata adoção em massa sobre os principais pontos envolvidos no controle e prevenção da mastite e de procedimentos de higiene no processo de obtenção do leite, bem como a refrigeração imediata do mesmo (SOUZA et al., 2008, p.78, 79, 80)