

Breno de Oliveira Silva

**REBANHOS LEITEIROS COM MASTITE CAUSADA POR *STAPHYLOCOCCUS*
AUREUS: DIAGNÓSTICO E CONTROLE**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da UFMG como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor Ciência Animal.

Área: Produção Animal.

Orientador: Ronaldo Braga Reis.

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2006**

Silva, Breno de Oliveira, 1976-
S586r Rebanhos leiteiros com mastite causada por Staphylococcus aureus: diagnóstico e controle / Breno de Oliveira Silva. – 2006.
137 p. : il.

Orientador: Ronaldo Braga Reis
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Bovino de leite – Doenças – Teses. 2. Mastite – Teses. 3. Estafilococos áureos – Teses. 4. Vacina veterinária – Teses. I. Reis, Ronaldo Braga. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.089 692

Dissertação defendida e aprovada em 29 de Maio de 2006 pela comissão examinadora composta por:

Ronaldo Braga Reis
Orientador

Andrey Pereira Lage

Isabella Bias Fortes Ferraz

Marcos Veiga dos Santos

Mônica Maria de Oliveira Pinho Cerqueira

DEDICATÓRIA

À vovó nívea, fonte de alegria e união de toda a família.

AGRADECIMENTOS

Fico até emocionado quando me recordo de todos que contribuíram com esse trabalho.

Com muito carinho, obrigado a todos:

Luciana, minha família, Prof. Ronaldo, Dra Pamela, Dra Cida, Mike, Carol Hlland, Carol Rodrigues, Daniel, the Tauchens', Robson, Dr. Lúcio, Marcel, Mozair, Telma, Prof. Andrey, Profa Ângela e Danilo.

SUMÁRIO

	RESUMO	12
	CAPÍTULO 1. REVISÃO DE LITERATURA	13
1.	INTRODUÇÃO	13
2.	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1.	CLASSIFICAÇÃO E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA MASTITE.....	14
2.2.	PRINCIPAIS AGENTES ETIOLÓGICOS DA MASTITE.....	16
2.2.1.	<i>Staphylococcus</i> sp.....	17
2.2.2.	<i>Streptococcus</i> sp.....	24
2.2.3.	Coliformes.....	32
2.3.	INVESTIGAÇÃO DA MASTITE EM REBANHOS.....	36
2.3.1.	Contagem de células somáticas (CCS).....	37
2.3.2.	California Mastitis Test (CMT).....	43
2.3.3.	Deteção e registro dos casos de mastite clínica.....	43
2.3.4.	Cultivos microbiológicos.....	46
2.4.	CONTROLE DA MASTITE.....	51
2.4.1.	Ambiente limpo e seco.....	53
2.4.2.	Higiene de ordenha.....	53
2.4.3.	Procedimentos de ordenha e funcionamento adequado do equipamento de ordenha.....	54
2.4.4.	Vacas em pé após a ordenha.....	55
2.4.5.	Segregação e linha de ordenha.....	55
2.4.6.	Terapia da mastite durante a lactação.....	56
2.4.7.	Manejo de vaca seca para o controle da mastite.....	65
2.4.8.	Status imunológico dos animais.....	69
3.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
	CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO DO PETRIFILM® PARA O ISOLAMENTO DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EM AMOSTRAS DE LEITE	85
1.	INTRODUÇÃO	85
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	86
2.1.	Experimento 1.....	86
2.2.	Experimento 2.....	88
2.3.	Experimento 3.....	89
2.4.	Experimento 4.....	89
2.5.	Análise estatística.....	91
3.	RESULTADOS	92
3.1.	Experimento 1.....	92
3.2.	Experimento 2.....	93
3.3.	Experimento 3.....	94
3.4.	Experimento 4.....	95
4.	DISCUSSÃO	97
5.	CONCLUSÕES	100
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 3. UTILIZAÇÃO DE UMA VACINA COMERCIAL DURANTE A LACTAÇÃO EM VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA CAUSADA POR <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	103
1.	INTRODUÇÃO	103
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	105
2.1.	Animais e instalações.....	105
2.2.	Período experimental.....	105
2.3.	Delineamento estatístico e tratamentos.....	105
2.4.	Coletas e análises laboratoriais.....	106
2.5.	Critérios e definições de “status”.....	107
2.6.	Análises estatísticas.....	107
3.	RESULTADOS	109
4.	DISCUSSÃO	116
5.	CONCLUSÕES	120
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
	 CAPÍTULO 4. UTILIZAÇÃO DE UMA VACINA COMERCIAL EM ASSOCIAÇÃO À TERAPIA ANTIBIÓTICA INTRAMAMÁRIA NA SECAGEM EM VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA CAUSADA POR <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	123
1.	INTRODUÇÃO	123
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	124
2.1.	Animais e período experimental.....	124
2.2.	Delineamento estatístico e tratamentos.....	125
2.3.	Coletas e análises laboratoriais.....	125
2.4.	Critérios e definições de “status”.....	126
2.5.	Análises estatísticas.....	127
3.	RESULTADOS	127
4.	DISCUSSÃO	133
5.	CONCLUSÕES	135
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1.

Tabela 1.	Estimativas de perdas anuais na produção de leite devido à mastite subclínica.....	16
Tabela 2.	Diferenciação das espécies de <i>Streptococcus</i> mais freqüentemente isoladas em amostras de leite.....	31
Tabela 3.	Diferenciação das espécies de bactérias Gram-negativas mais freqüentemente isoladas em amostras de leite.....	36
Tabela 4.	Prevalência estimada de infecção e perdas na produção de leite associadas a alta CCS do tanque de expansão.....	38
Tabela 5.	Comparação de contagem de células somáticas do tanque e a prevalência de mastite subclínica de dois rebanhos hipotéticos constituídos de 10 vacas cada.....	39
Tabela 6.	Distribuição da contagem de células somáticas em um rebanho com problema diagnosticado por <i>Streptococcus agalactiae</i>	41
Tabela 7.	Relação entre contagem de células somáticas e escore de CMT.....	43
Tabela 8.	Tabela de significância de concentração (UFC/mL) de diversos tipos bacterianos em amostras de tanque de expansão da Universidade de Minnesota (EUA).....	47
Tabela 9.	Sensibilidade relativa de diferentes metodologias de amostragem e técnicas de cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i>	50
Tabela 10.	Taxa de cura de infecções intramamárias de <i>Staphylococcus aureus</i> mediante diferentes tratamentos durante a lactação.....	58
Tabela 11.	Classificação da mastite clínica quanto a severidade dos casos.....	60
Tabela 12.	Resumo do modelo de três compartimentos alvos para patógenos da mastite.....	60
Tabela 13.	Taxas de cura de mastite clínica causada por <i>Streptococcus</i> ambientais.....	62

CAPÍTULO 2.

Tabela 1.	Prevalência e sensibilidade relativa de isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> de diferentes métodos microbiológicos.....	92
Tabela 2.	Prevalência de isolamentos bacterianos de amostras de quartos mamários de um rebanho comercial (Fazenda A) de acordo com diferentes métodos microbiológicos (n = 360).....	93
Tabela 3.	Prevalência de <i>Staphylococcus aureus</i> determinada por diferentes métodos microbiológicos em amostragem composta ou por quarto mamário.....	94
Tabela 4.	Resultados microbiológicos de amostras de leite mostrando evidência de zonas róseas fracas ou distintas no Petrifil.....	95
Tabela 5.	Interpretação de resultados de intensidade de zona rósea do Petrifilm Staph Express por três leitores independentes.....	96
Tabela 6.	Associação entre leitor e interpretação do Petrifilm.....	97

CAPÍTULO 3.

Tabela 1.	Modelo da análise de variância para variável número de colônias.....	108
Tabela 2.	Modelo da análise de variância para dados de produção e composição do leite.....	109
Tabela 3.	Número de vacas e quartos mamários avaliados durante o experimento.....	109
Tabela 4.	Freqüência de diagnóstico de <i>Staphylococcus aureus</i> e taxa de cura aos 120 dias, de quartos mamários infectados ao início do experimento.....	110
Tabela 5.	Freqüência de diagnóstico de <i>Staphylococcus aureus</i> e taxa de novas infecções aos 120 dias, de quartos mamários negativos ao início do experimento.....	111
Tabela 6.	Freqüência de novas infecções por <i>Staphylococcus aureus</i> e taxa de cura de quartos mamários aos 120 dias.....	111
Tabela 7.	Produção e composição do leite de vacas positivas para <i>Staphylococcus aureus</i> ao início do experimento e submetidas ou não à vacinação.....	115
Tabela 8.	Freqüência de diagnósticos microbiológicos em amostras de quartos mamários coletadas em 8 períodos durante 127 dias.....	116

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 4.		
Tabela 1.	Número de vacas e quartos mamários avaliados na secagem.....	128
Tabela 2.	Frequência de diagnóstico de <i>Staphylococcus aureus</i> e taxa de cura, pós-parto, de quartos mamários infectados na secagem.....	128
Tabela 3.	Frequência de diagnóstico de <i>Staphylococcus aureus</i> e taxa de novas infecções, pós-parto, de quartos mamários negativos na secagem.....	129
Tabela 4.	Frequência de diagnóstico de <i>Staphylococcus aureus</i> e taxa de cura, pós-parto, de vacas positivas na secagem e submetidas à terapia de vaca seca associada ou não à vacinação para <i>S. aureus</i>	129
Tabela 5.	Frequência de diagnóstico de <i>Staphylococcus aureus</i> e taxa de cura, pós-parto, de vacas negativas na secagem e submetidas à terapia de vaca seca associada ou não à vacinação para <i>S. aureus</i>	130
Tabela 6.	Produção de leite e de sólidos do leite na lactação, de vacas positivas para <i>Staphylococcus aureus</i> submetidas à terapia de vaca seca associada ou não à vacinação para <i>S. aureus</i> na secagem anterior.....	131
Tabela 7.	Produção de leite e de sólidos do leite na lactação, de vacas negativas para <i>Staphylococcus aureus</i> submetidas à terapia de vaca seca associada ou não à vacinação para <i>S. aureus</i> na secagem anterior.....	132
Tabela 8.	Frequência de diagnósticos microbiológicos em amostras de quartos mamários coletadas na secagem e no pós-parto.....	132

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1.

Figura 1.	Perdas econômicas médias por caso de mastite clínica.....	15
Figura 2.	Classificação dos patógenos da mastite.....	18
Figura 3.	Patogenia do <i>Staphylococcus aureus</i> em infecções intramamárias.....	22
Figura 4.	Procedimentos para o diagnóstico microbiológico de <i>Staphylococcus</i> sp em amostras de leite.....	24
Figura 5.	Patogenia do <i>Streptococcus agalactiae</i> em infecções intramamárias.....	26
Figura 6.	Patogenia dos <i>Streptococcus</i> ambientais em infecções intramamárias.....	29
Figura 7.	Classificação quanto ao comportamento de <i>Streptococcus</i> sp.....	30
Figura 8.	Procedimentos para o diagnóstico microbiológico de <i>Streptococcus agalactiae</i> em amostras de leite.....	31
Figura 9.	Patogenia dos coliformes em infecções intramamárias.....	34
Figura 10.	Procedimentos para o diagnóstico microbiológico de coliformes em amostras de leite.....	35
Figura 11.	Gráfico de plotagem de contagem de células somáticas para dois meses consecutivos.....	42
Figura 12.	Fórmulas para cálculos e metas de índices epidemiológicos da mastite subclínica.....	42
Figura 13.	Ficha mensal para o acompanhamento de casos de mastite clínica.....	45
Figura 14.	Cálculos de índices de mastite clínica em rebanhos.....	45
Figura 15.	Fatores responsáveis pela mastite em rebanhos leiteiros.....	52
Figura 16.	Prevalência de diagnósticos microbiológicos de casos clínicos de mastite em nove rebanhos bem manejados.....	59
Figura 17.	Efeito da terapia de vaca seca nas novas infecções de <i>Streptococcus</i> ambientais da glândula mamária durante o período seco.....	68
Figura 18.	Eficácia do uso de selante interno dos tetos na prevenção de novas infecções intramamárias durante o período seco.....	69
Figura 19.	Padrões de resposta imune em consequência à invasão da glândula mamária.....	71

CAPÍTULO 3.

Figura 1.	Média ponderada de escore de CMT de quartos mamários em diferentes períodos de coleta.....	113
Figura 2.	Contagem média de colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> em quartos mamários em diferentes períodos de coleta.....	114

CAPÍTULO 4.

Figura 1.	Contagem de células somáticas (CCS) média da lactação de vacas positivas para <i>Staphylococcus aureus</i> submetidas à terapia de vaca seca associada ou não à vacinação para <i>S. aureus</i> na secagem anterior.....	131
-----------	--	-----

RESUMO

Duas ferramentas disponíveis comercialmente, Petrifilm[®] Staph Express e a vacina Lavac[®] Staph, foram avaliadas para o suporte no diagnóstico e controle de mastite causada por *S. aureus* em rebanhos leiteiros. Petrifilm[®] Staph Express são “cartelas” contendo meios de cultivo seletivo para o diagnóstico de *S. aureus*. Para detecção de *S. aureus* em amostras de leite, Petrifilm[®] foi altamente sensível, porém a especificidade variou de acordo com o critério interpretativo e o nível de treinamento das pessoas que lidaram com o método. Resultados foram obtidos de forma mais fácil e rápida, se comparado ao método tradicional de cultivo, demonstrando potencial para utilização do Petrifilm[®], dentro da fazenda, em programas de tratamento ou controle de *S. aureus*. A vacina Lavac[®] Staph foi avaliada durante a lactação ou na secagem de vacas com histórico de infecção por *S. aureus*. A vacinação aumentou a taxa de cura de infecções causadas por *S. aureus* quando utilizada em associação à terapia de vaca seca, demonstrando eficácia no controle do agente em um rebanho com alta prevalência. Durante a lactação a vacinação não influenciou as taxas de cura para *S. aureus*, não justificando o seu uso. A incidência não foi reduzida pela vacinação em nenhuma das fases estudadas.

Palavras-Chave: Mastite, Petrifilm, vacina, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Petrifilm[®] Staph Express and the Lavac[®] Staph vaccine, were evaluated to support *S. aureus* infections diagnosis and control in dairy herds. For detection of *S. aureus* in milk samples, Petrifilm[®] was highly sensitive but varied in specificity according to interpretive criteria and training level of the person who reads the plates. Results were easier and faster achieved, if compared to standard culture techniques, showing potential for on-farm use in *S. aureus* treatment or control programs. The Lavac[®] Staph vaccine was evaluated in cows with *S. aureus* infections during lactation or at dry-off. Vaccination increased *S. aureus* infections cure rates when associated to the dry cow therapy, showing efficacy on pathogen control of a high prevalence herd. During lactation, vaccination had no impact on *S. aureus* cure rates and its use was not justified. The *S. aureus* incidence was not decreased in any of the studied phases.

Keywords: Mastitis, Petrifilm, vaccine, *Staphylococcus aureus*.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1. Introdução:

O leite é um dos alimentos mais saudáveis e nutritivos sendo sua recomendação de consumo superior à média brasileira atual (200 l/habitante/ano recomendado vs 130 l/habitante/ano consumidos em 2005) (Ministério da Saúde, 2005). A qualidade de qualquer produto ofertado aos consumidores exerce influência marcante no padrão de consumo da população. Nos produtos lácteos não é diferente. Quanto melhor atender aos anseios da população, melhor será a satisfação do cliente e maior o consumo.

A qualidade do leite produzido e armazenado nas propriedades leiteiras influi de maneira determinante na qualidade dos produtos processados. É nesse sentido que se insere a necessidade de padronização e mensuração das características microbiológicas e físico-químicas do leite captado nas fazendas leiteiras. Além disso, para efeito de manutenção de um bom padrão de qualidade é fundamental que o produtor seja recompensado pela obtenção de bons resultados.

Mastite é o termo utilizado para definir a inflamação da glândula mamária (do grego *mastos* = mama e *itis* = inflamação). Por provocar impacto no órgão diretamente responsável pela produção de leite, a mastite altera de maneira significativa tanto a quantidade quanto a qualidade do leite produzido. É, portanto, uma doença responsável por grandes perdas econômicas tanto aos produtores quanto à indústria de laticínios.

Os objetivos dos trabalhos desta tese foram de avaliar duas tecnologias disponíveis comercialmente, o Petrifilm[®] Staph Express Count Plate e a vacina Lavac[®] Staph, para o suporte no diagnóstico e controle de infecções causadas por *S. aureu*, respectivamente.

2. REVISÃO DE LITERATURA:

Em função do grande impacto negativo da mastite no setor leiteiro serão abordados nessa revisão a etiologia, as formas de investigação, diagnóstico e controle em rebanhos leiteiros.

2.1. CLASSIFICAÇÃO E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DA MASTITE

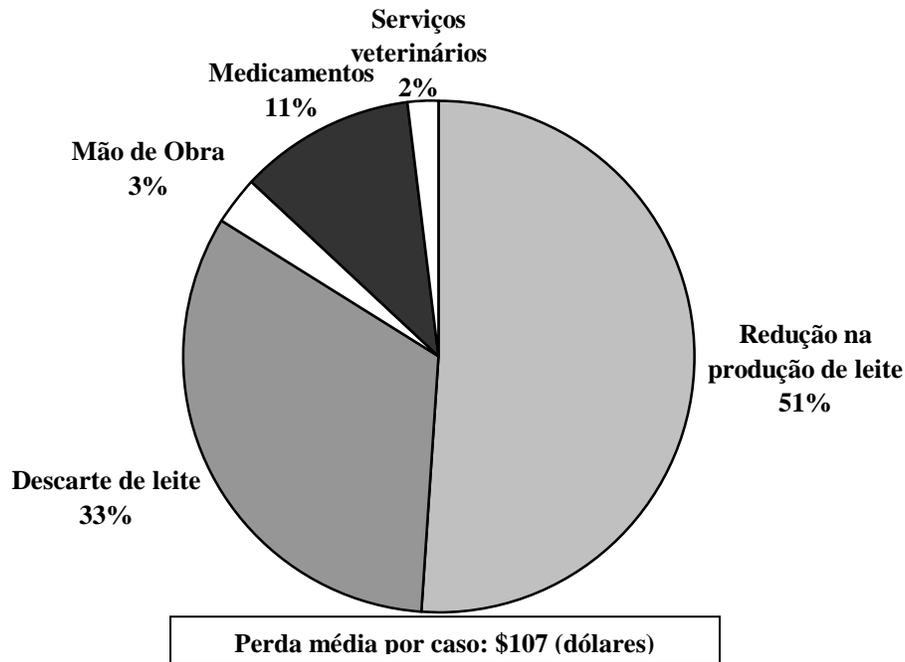
A mastite é geralmente causada pela infecção bacteriana da glândula mamária, porém, outros microrganismos ou mesmo lesões traumáticas e/ou irritação química podem ser agentes determinantes. O grau de inflamação é bastante variável e define o tipo da mastite presente: clínica ou subclínica. A mastite clínica é a forma de infecção intramamária caracterizada por anormalidades visíveis no úbere e/ou no leite, cuja gravidade pode variar muito durante o curso da doença. Já a mastite subclínica, apesar de ser a forma mais predominante da doença, não pode sequer ser detectada através de observações visuais do úbere ou do leite, pois ambos apresentam aparência normal. O aumento da contagem de células somáticas (CCS) no leite, devido a migração de leucócitos para combater o agente da infecção, é a principal alteração alvo de métodos diagnósticos para mastite subclínica (Philpot e Nickerson, 2000).

A mastite é a enfermidade de maior frequência e que ocasiona os maiores prejuízos em rebanhos leiteiros (Ruegg e Reinemann, 2002). Alguns itens que compõem as perdas são o descarte de leite, medicamentos, mão de obra, serviços veterinários e morte ou descarte precoce de animais. Porém, o principal item de custo, a redução na produção de leite, é o mais difícil de ser observado e mensurado e geralmente passa despercebido, sendo negligenciado pelos produtores.

Miller et al. (1993) estimaram o custo médio de US\$107,00 por caso de mastite clínica e 51% foi associado a redução na produção de leite (Figura 1). Bartlett et al. (1991) e Hoblet et al. (1991) estimaram as perdas por mastite clínica em US\$40,00 a 50,00 por vaca /rebanho/ano. No entanto, para maioria dos criadores, a mastite subclínica

é a mais importante, devido a maior prevalência e redução na produção de leite, a longo prazo (Ruegg , 2003). Raubertas e Shock (1982) estimaram que as perdas de produção para primíparas e multíparas foram respectivamente de 91 e 182 kg de leite para cada vez que a CCS dobrava a partir de 50.000 até 1.600.000/mL (Tabela 1).

Figura 1. Perdas econômicas médias por caso de mastite clínica



Adaptado de: Miller et al. (1993).

Adicionalmente ao impacto econômico da mastite aos produtores de leite, perdas econômicas significativas ocorrem na indústria de laticínios devido a alteração da qualidade do leite (Cerqueira et al., 2004). Altas concentrações de ácidos graxos livres conferem ao leite um “flavor” de rancidez que pode ser detectado no leite de rebanhos com CCS tão baixas quanto 400.000 / mL (National Mastitis Council (NMC), 1987). Alto teor de ácidos graxos livres no leite inibe culturas lácteas usadas em produtos fermentados já o menor conteúdo de caseína e o pH alcalino causam perdas significativas na fabricação de queijos (NMC, 1987).

Tabela 1. Estimativas de perdas anuais na produção de leite devido à mastite subclínica.

CCS / mL ¹	Perda na produção de leite, kg	
	Primíparas	Pluríparas
50.000	0	0
100.000	91	182
200.000	182	364
400.000	273	546
800.000	364	728
1.600.000	455	910

¹Contagem de células somáticas por mL de leite.

Adaptado de: Raubertas e Shock (1982).

2.2. PRINCIPAIS AGENTES ETIOLÓGICOS DA MASTITE

As bactérias são os principais microrganismos causadores da mastite, porém outros microrganismos como fungos, leveduras, algas e micoplasmas podem estar envolvidos. A infecção intramamária ocorre, na maioria das vezes, quando os microrganismos atravessam o canal do teto e multiplicam-se dentro do quarto afetado. As lesões causadas ao tecido mamário estão diretamente ligadas a fatores tanto do microrganismo quanto da reação inflamatória desencadeada por eles. As perdas de produção e de qualidade de leite estão intimamente associadas à extensão dessas lesões.

As bactérias possuem diferentes nichos e capacidades de provocar lesões e de permanecer na glândula mamária e por isso são classificadas de diferentes maneiras. Quanto à gravidade da doença, os patógenos são classificados como patógenos de maior ou menor importância. Patógenos de maior importância provocam forte reação inflamatória no úbere, o que proporciona uma CCS alta. Patógenos de menor importância causam simplesmente pequena elevação na CCS (Philpot e Nickerson, 2000).

Microrganismos podem ainda ser classificados como contagiosos, ambientais, oportunistas e outros (Philpot e Nickerson, 2000). O reservatório principal dos microrganismos contagiosos é a glândula mamária infectada. Esses microrganismos são bem adaptados à sobrevivência no úbere e geralmente estabelecem infecções subclínicas de longa duração. A transmissão ocorre principalmente no momento da ordenha (NMC, 1987). Os patógenos ambientais estão presentes no ambiente freqüentado pelas vacas.

Invadem o úbere geralmente no intervalo entre ordenhas, quando os tetos ficam expostos à lama, fezes e sujidades (Philpot e Nickerson, 2000). Em contraste à mastite contagiosa, mastite ambiental associa-se primariamente com casos clínicos de mastite, ao invés de infecções subclínicas (Bramley , 1990; Erskine et al., 1988; Hogan et al., 1988; Smith, 1983, Smith et al., 1985b). Patógenos oportunistas são aqueles normalmente encontrados na pele de tetos sadios e na mão de ordenhadores e que, sob determinadas condições, colonizam o canal do teto e invadem os tecidos produtores de leite do úbere. Causam geralmente resposta inflamatória branda. Em diversas situações, outros microrganismos mais raramente encontrados como patógenos da glândula mamária podem invadir e determinar a doença (Figura 2).

2.2.1. *Staphylococcus* sp.

Staphylococcus sp. estão entre os microrganismos mais comumente isolados de amostras de leite. Os *Staphylococcus* patogênicos são divididos em duas classificações de acordo com o comportamento (contagiosos ou oportunistas) e pela identificação laboratorial (coagulase positivos e coagulase negativos). *Staphylococcus aureus*, um *Staphylococcus* coagulase positivo, se diferencia dos demais *Staphylococci* por ser um patógeno contagioso (Sears e McCarthy, 2003). Outros *Staphylococci* são geralmente chamados de *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) e se comportam como microrganismos oportunistas compreendendo mais de 20 espécies de *Staphylococcus* (Philpot e Nickerson, 2000).

Figura 2. Classificação dos patógenos da mastite.

Quanto a severidade da doença:			
Patógenos maiores		Patógenos menores	
<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Corynebacterium</i> sp.	
<i>Streptococcus agalactiae</i>		<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	
<i>Streptococcus</i> sp. (não agalactiae)			
<i>Enterococcus</i> sp.			
Coliformes			
Quanto ao comportamento do patógeno:			
Contagiosos	Ambientais	Oportunistas	Outros
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus</i> sp. (não agalactiae)	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	Fungos
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Coliformes		Leveduras
<i>Mycoplasma</i> sp	<i>Enterococcus</i>		Algas
<i>Corynebacterium</i> sp			<i>Pseudomonas</i> sp
			<i>Bacillus</i> sp
			<i>Nocardia</i> sp
			<i>Mycobacterium</i> sp
			<i>Arcanobacterium</i>

Staphylococcus aureus

O *Staphylococcus aureus* é um patógeno contagioso da glândula mamária de grande importância. Causam na maioria das vezes mastite subclínica de longa duração com ocorrência de casos clínicos esporádicos. Reduzem significativamente a quantidade e a qualidade do leite produzido e podem causar, ainda que raramente, mastite superaguda gangrenosa.

O reservatório principal do *S. aureus* são glândulas infectadas. São transmitidos principalmente de glândulas infectadas a não infectadas durante o processo de ordenha. Colonizam eficientemente o orifício do teto, o canal do teto e o epitélio danificado, porém *S. aureus* não colonizam a pele íntegra e saudável (NMC, 1999). Podem ser também encontrados em narinas e vagina, mas tais localizações representam fontes menores, de pouco risco de transmissão (NMC, 1999). *S. aureus* também são encontrados em novilhas que podem ser fonte de introdução em rebanhos. Matos et al. (1991) isolaram *S. aureus* em bezerras (3 a 12 meses) que foram mais expostas a moscas quando

mantidas em pastejo e sugeriram que esta seja uma forma de transmissão do agente a novilhas. *S. aureus* não sobrevivem por longos períodos no meio ambiente (NMC, 1999). Pessoas podem ser carreadoras de *S. aureus*, e já tendo sido isolado da mão de ordenhadores e sobrevivido entre as ordenhas (Bramley e Dodd, 1984).

Fatores de virulência são as características de qualquer patógeno que permitam que causem infecção e doença (Fox et al., 2000). Capacidade de colonização do epitélio, invasão, aderência e fixação ao tecido invadido e evasão à resposta imune do hospedeiro são características do *S. aureus* conferidas por seus inúmeros fatores de virulência que o tornam patógeno eficiente na mastite. Abaixo segue uma lista dos fatores de virulência do *S. aureus* e suas respectivas funções (Fox e Gay, 1993, Fox et al., 2000, Sears e McCarthy, 2003):

. Proteínas de ligação:

Permite com que se fixem ao epitélio da superfície da glândula, promovendo a colonização, principalmente de epitélios lesados.

. Adesinas:

Responsável pela aderência e fixação ao tecido mamário. A principal é o “Clumping factor A”.

. FBP (“fibronectin binding protein-cell bridge”):

Ligação estreita à membrana das células epiteliais da glândula mamária e consequente internalização. Favorece evasão ao sistema imune e proteção à ação de antibióticos. Induzem também o processo de apoptose (morte celular), podendo ser responsável em parte pela queda de produção associada à mastite.

. Leucocidina:

Toxina que causa o rompimento da membrana de neutrófilos.

. Proteína A:

Proteína responsável por se ligar à porção Fc de imunoglobulinas, prevenindo então a ligação dessas imunoglobulinas a fagócitos. Portanto, o processo de opsonização é bloqueado.

. Pseudocápsula:

Fina camada polissacarídea que envolve o *S. aureus* impedindo o encaixe de imunoglobulinas. Tem, portanto, função antifagocítica (Fox et al., 2000).

. Formação de microabcessos:

Proteção física aos polimorfonucleares.

. Interação de fatores de virulência:

Sobrevivência e até multiplicação dentro de neutrófilos após ser fagocitado (White et al., 1980).

. Compostos pirogênicos (enterotoxinas e outros):

Afetam a resposta imune alterando a relação da população de linfócitos T. Promovem o aumento da população de linfócitos T CD8+ supressores. Devido a esta característica, *S. aureus* são algumas vezes nomeados “super-antígenos” (Fox et al., 2000).

. Alpha toxina:

Hemolisina que danifica vasos sanguíneos resultando em necrose isquêmica coagulativa. Fator responsável pela mastite superaguda gangrenosa.

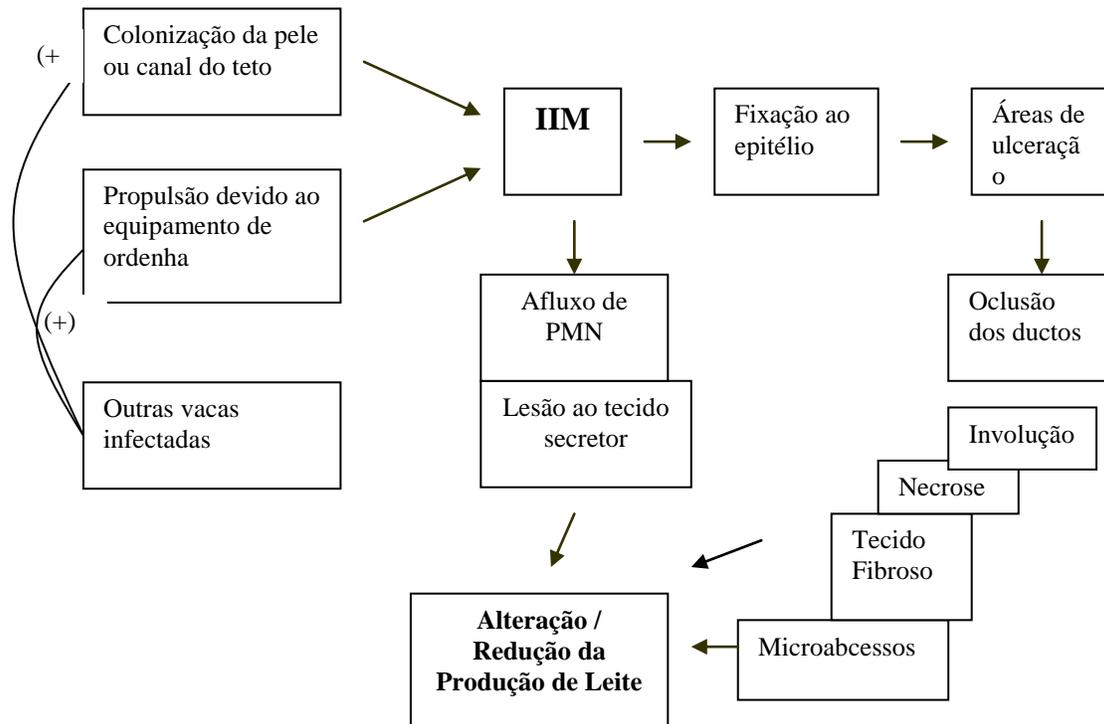
. β -lactamase:

Promovem resistência a antibióticos β -lactâmicos como as penicilinas.

S. aureus causa mais danos aos tecidos secretores de leite do que os *Streptococcus* sp. (Fox e Gay, 1993). A patogenia do *S. aureus* já foi estudada e revisada por muitos pesquisadores (Forbes e Hebert, 1968; Anderson, 1976; Nickerson e Heald, 1981; Gudding et al., 1984; Haraldsson e Jonsson, 1984; Fox et al., 1985; Hoblet et al., 1988; Fox e Gay, 1993; Shoshani et al., 2000;). Para estabelecer infecção, o *S. aureus* precisa invadir a glândula através do canal do teto. Uma condição predisponente à invasão bacteriana é a colonização da superfície do teto (Forbes e Hebert, 1968). A grande eficácia da desinfecção do teto pós ordenha (“post dipping”) no controle da mastite por *S. aureus* comprova esse mecanismo. Porém, nem toda infecção intramamária é precedida por colonização do teto mostrando que outros mecanismos, como a propulsão induzida pelo equipamento de ordenha, podem estar envolvidos (Fox e Gay, 1993).

Uma vez instalada a infecção intramamária, os tecidos parenquimal e ductular são afetados. *S. aureus* são agentes invasivos e geralmente atingem toda a glândula mamária, inclusive as regiões mais profundas do parênquima mamário (Erskine et al., 2003). *S. aureus* adere ao epitélio e danifica o tecido induzindo a formação de áreas ulcerativas (Gudding et al., 1984). As células secretoras de leite da área afetada podem degenerar e, juntamente com os leucócitos, obstruir os ductos lactíferos que drenam as áreas glandulares (Philpot e Nickerson, 2000). Essa obstrução pode levar a uma involução de alvéolos, necrose, substituição por tecido fibroso e formação de microabscessos. A formação de áreas de necrose tecidual e de microabscessos favorece ainda mais o patógeno. O menor suprimento sanguíneo na área afetada pode minimizar a resposta imune, além de impedir a difusão de antibióticos (Fox e Gay, 1993). Além desses mecanismos de danos aos tecidos, outros danos ocorrem mediados pela migração dos leucócitos pelo parênquima mamário (Fox e Gay, 1993). Alguns leucócitos, provenientes da circulação sanguínea, penetram entre as células secretoras de leite e liberam enzimas que são responsáveis pela destruição dessas células ou redução de sua capacidade secretora. Todos esses danos são, portanto responsáveis pela redução da quantidade e da qualidade do leite produzido (Philpot e Nickerson, 2000). O esquema da Figura 3 demonstra os principais mecanismos de patogenia abordados.

Figura 3. Patogenia do *Staphylococcus aureus* em infecções intramamárias.



IIM= infecção intramamária; PMN = polimorfonucleares

Staphylococcus coagulase negativos (SCN)

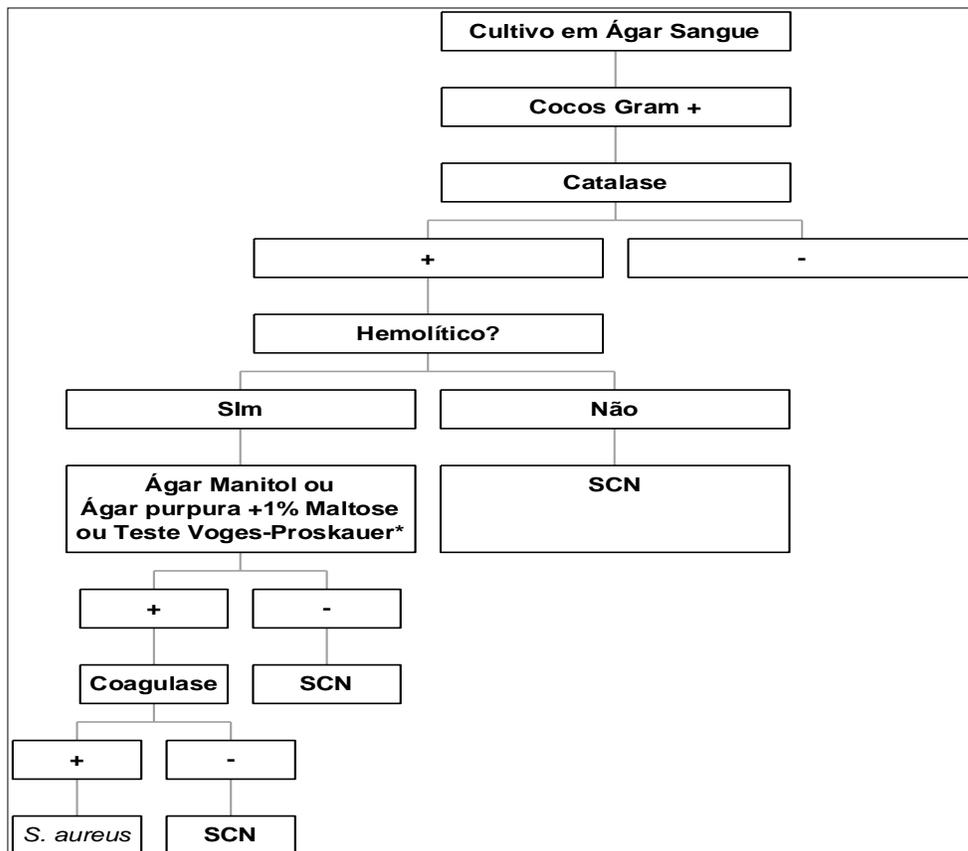
Staphylococcus coagulase negativos são os principais causadores de infecção intramamária (IIM) em rebanhos onde os patógenos maiores tenham sido controlados. São ainda a causa primária de IIM em novilhas ao parto (Sears e McCarthy, 2003). SCN fazem parte da microbiota normal da pele do teto, colonizam o canal do teto e penetram de forma oportunista a glândula mamária causando mastite. São, portanto, geralmente classificados como agentes oportunistas (Harmon e Langlois, 1989). Geralmente elevam pouco a CCS (patógenos menores), mas em infecções crônicas podem elevar a CCS aos milhões, produzindo lesões inflamatórias e atrópicas (Sabenfeldt e Spencer, 1966). Se a prevalência no rebanho é alta, vacas infectadas se tornam a principal fonte de bactéria, com transmissão vaca a vaca (Sears e McCarthy, 2003).

As espécies mais importantes de SCN por ordem de prevalência são *Staphylococcus chromogenes*, *S. hyicus*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. hominis* e *S. xylosus* (Hogan et al., 1987). A prevalência de SCN é alta ao parto, reduzindo significativamente com o início da lactação. Mathews et al. (1991) mostraram uma redução de 80% na prevalência de SCN no canal do teto após a primeira semana de lactação (46,7 e 9% ao parto e após 1 semana, respectivamente). Como SCN são habitantes normais da pele e do canal do teto, cultivos positivos de quartos mamários nem sempre significam infecção intramamária (falso-positivos). Portanto, atenção especial deve ser tomada na coleta e interpretação dos resultados obtidos. Segundo Sears et al. (1991), infecções intramamárias causadas por SCN devem ser confirmadas por cultivos subsequentes e aumento na contagem de células somáticas. Em casos em que essa confirmação é positiva, a cura espontânea é pouco freqüente.

Diagnóstico microbiológico

Staphylococcus sp. são cocos Gram positivo, catalase positiva. A principal preocupação no diagnóstico desses agentes em amostras de leite deve ser a correta diferenciação entre *S. aureus* e outros *Staphylococcus* comumente denominados SCN (NMC, 1999). A prova de coagulase não deve ser a única utilizada para diferenciar essas espécies visto que outros *Staphylococcus* também podem ser positivos nessa reação. *Staphylococcus intermedius* são coagulase positivos enquanto *S. hyicus* são coagulase variáveis (Quinn et al., 1994). *S. hyicus* são agentes encontrados em glândulas mamárias enquanto *S. intermedius* são raramente isolados de amostras de bovinos (NMC, 1999). *S. aureus* são colônias pigmentadas, hemolíticas produtoras de acetoina e fermentam tanto o manitol quanto a maltose, características essas que podem ser utilizadas para diferenciação do *S. hyicus*. O esquema da Figura 4 demonstra o método sugerido para diagnóstico de *Staphylococcus* (NMC, 1999; Quinn et al., 1994).

Figura 4. Procedimentos para o diagnóstico microbiológico de *Staphylococcus sp.* em amostras de leite.



* Teste para verificação da capacidade de produção de acetoína.

SCN = *Staphylococcus* coagulase negativo; *S. aureus* = *Staphylococcus aureus*

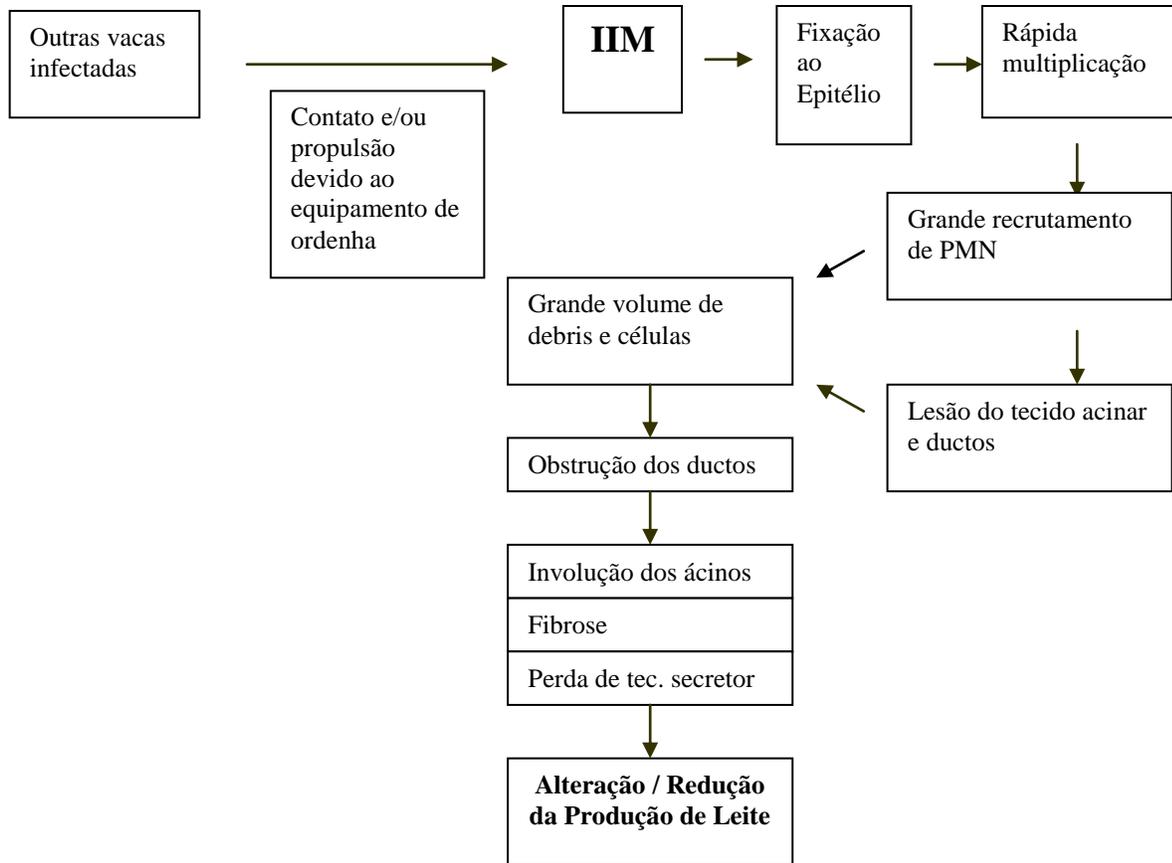
2.2.2. *Streptococcus sp*

Bactérias do gênero *Streptococcus* têm comportamento contagioso e/ou ambiental. No passado, *Streptococcus* não eram diferenciados dos gêneros *Enterococcus* e *Lactococcus*, hoje corretamente separados. As espécies de *Streptococcus* mais frequentemente envolvidas na mastite bovina são o *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. uberis*. Tradicionalmente, *S. agalactiae* são classificados como agentes contagiosos e *S. dysgalactiae* e *S. uberis* como ambientais. Outras espécies ambientais isoladas em menor frequência incluem *S. acidominimus*, *S. alactolyticus*, *S. canis*, *S. equi*, *S. equinus* (antigo *S. bovis*) e *S. parauberis*.

Streptococcus agalactiae

S. agalactiae é considerado um patógeno obrigatório do úbere de vacas de leite sendo a ordenha o principal momento de disseminação desses agentes (NMC, 1999). Não é um microrganismo invasivo. Habita principalmente o leite e a superfície dos ductos lactíferos da glândula. Causam principalmente infecção subclínica crônica com alta CCS, casos clínicos esporádicos e eliminação de grande número de bactérias no leite (Philpot e Nickerson, 2000). Assim como na patogenia de *S. aureus*, mas em menor grau de severidade, restos de tecidos e leucócitos podem obstruir os ductos, bloqueando a drenagem do leite dos alvéolos, induzindo a involução e subsequente formação de tecido fibroso nessas áreas com conseqüente diminuição da produção de leite (Philpot e Nickerson, 2000) (Figura 5). São microrganismos geralmente bastante sensíveis às penicilinas e podem ser erradicados do rebanho leiteiro (NMC, 1999). *S. agalactiae* são eficientemente controlados por procedimentos que previnem a disseminação de bactérias na ordenha. Esses procedimentos incluem sanitizar e secar os tetos com papel toalha individual desinfecção do teto após a ordenha (“post dipping”), terapia de vaca seca e boa higiene de ordenha. Identificação de animais positivos para *S. agalactiae* e segregação para que sejam ordenhados por último e/ou tratamento até que se apresentem negativos aceleram o processo de controle e erradicação.

Figura 5. Patogenia do *Streptococcus agalactiae* em infecções intramamárias.



IIM = Infecção intramamária; PMN = polimorfonucleares.

Streptococcus ambientais

Streptococcus ambientais incluem diversas espécies de *Streptococcus*, mas *S. uberis* é a espécie mais frequentemente isolada (Smith e Hogan, 1993). *S. uberis* aparecem de forma abrangente no ambiente de vacas leiteiras. Podem ainda ser isolados da vulva, trato intestinal e fezes de vacas de leite (Kruze e Bramley, 1982). Porém, *S. uberis* infectam e causam doença somente na glândula mamária e parece não serem capazes de colonizar o teto ou o canal do teto (Lacy-Hulbert e Hillerton, 1995, Hillerton e Berry, 2003).

A invasão e o estabelecimento de infecção intramamária é dependente de fatores do ambiente e da vaca e influenciam na epidemiologia da doença. A prevalência de infecções aumenta com o calor e umidade do ambiente devido a maior exposição a esses agentes (Hillerton e Berry, 2003). Camas de palha são frequentemente associadas a *S. uberis* (Bramley et al., 1989). Características individuais dos tetos como capacidade de fechamento do canal após as ordenhas, tempo para formação do tampão de queratina após secagem, tamanho do canal e quantidade de queratina no epitélio influem na taxa de infecção por *Streptococcus* ambientais (Lacy-Hulbert e Hillerton, 1995, Williamson et al., 1995). Além disso, a taxa de novas infecções é mais elevada durante o período seco do que no período lactante (Smith et al., 1985b) e infecções adquiridas no período seco persistem e podem contribuir significativamente para mastite clínica ao início da lactação (Smith et al., 1985a). Infecções no período seco foram responsáveis por 23% de todos os casos clínicos causados por *Streptococcus* ambientais na lactação e 56% dos casos até os 76 dias de lactação (Smith e Hogan, 1993).

Aproximadamente 40 a 50% das infecções por *Streptococcus* ambientais são associadas a sintomas clínicos (Smith et al., 1985b). A maioria das infecções duram menos que 30 dias. Em torno de 20 a 40% das infecções duram menos de 10 dias e 18% das infecções se tornam crônicas (>100 d) (Smith e Hogan, 1993, Philpot e Nickerson, 2000). Portanto, infecções causadas por *Streptococcus* ambientais apresentam uma média de duração superior àquelas causadas por coliformes (Smith et al., 1985b).

Durante a lactação, a invasão do úbere ocorre tanto no período entre ordenhas como durante a ordenha (Smith e Hogan, 1993). Entre as ordenhas as bactérias podem passar através do canal dos tetos, multiplicando dentro do canal (maior risco logo após a ordenha enquanto o esfíncter do teto ainda se encontra aberto). Os microrganismos também podem entrar através da pressão física exercida na extremidade do teto à medida que a vaca se movimenta. Durante a ordenha, os microrganismos podem ser empurrados mecanicamente ou por impactos provocados por flutuações de vácuo contra o orifício do teto. Podem ainda ser empurrados fisicamente através do canal do teto durante a inserção de uma cânula (Philpot e Nickerson, 2000). A gravidade da infecção e a extensão das

lesões provocadas na glândula serão dependentes de fatores como a patogenicidade do microrganismo, a eficiência da resposta inflamatória e a eficiência do tratamento antibiótico quando utilizado (Figura 6). Existe uma grande variação de fatores de virulência entre espécies de *Streptococcus* e também entre cepas da mesma espécie (Potter, 2002). Alguns dos fatores de virulência do *S. uberis* e do *S. dysgalactiae* foram descritos (Schaufuss et al., 1989, Almeida e Oliver, 1993, Leigh 1994, Oliver et al., 1998, Rosey et al., 1999, Fang e Oliver, 1999):

. Aderência e invasão de células epiteliais:

Via endocitose mediada por receptor (*S. uberis* persiste na célula sem prejudicá-la).

. Produção de hialuronidase e proteína ativadora de plasminogênio (PauA):

Disseminação de bactérias em tecidos próximos (*S. uberis*).

. Cápsula de ácido hialurônico e toxina neutrofílica:

Resistência à fagocitose.

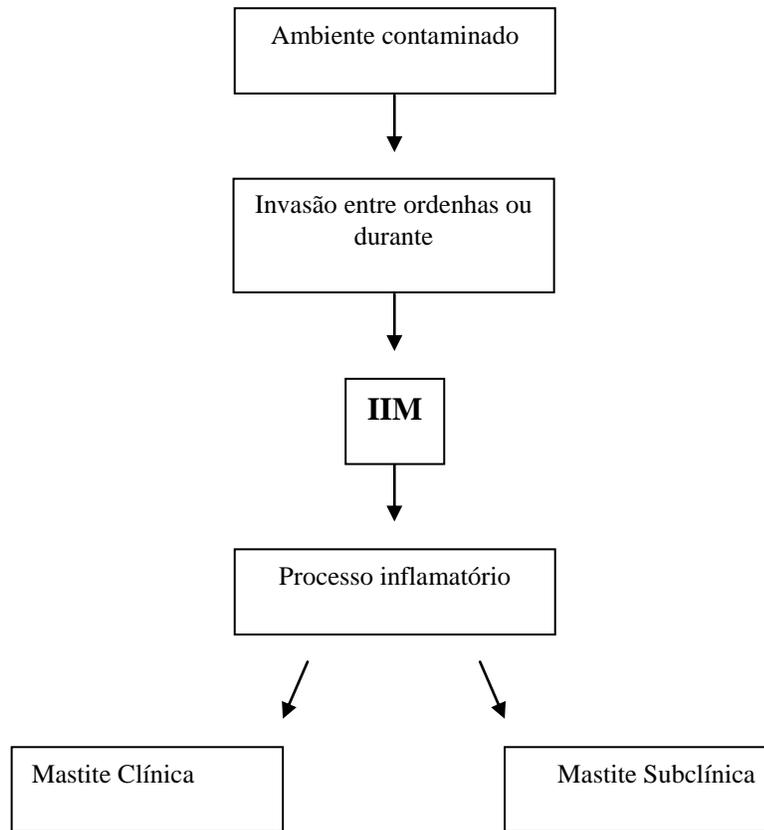
. Proteína MIG:

Receptor da porção Fc de anticorpos que bloqueia o processo de opsonização (*S. dysgalactiae*).

. Proteína ligadora de lactoferrina:

Impede a ação da lactoferrina.

Figura 6. Patogenia dos *Streptococcus* ambientais em infecções intramamárias.

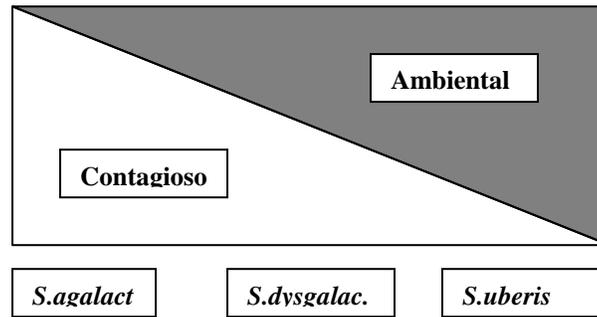


IIM = infecção intramamária.

Em espécies de origem ambiental, uma vez estabelecida a IIM, a passagem de quartos infectados para quartos ou vacas não infectadas pode ocorrer (NMC, 1987). Isto é particularmente importante em se tratando de espécies de *Streptococcus*. Estratégias direcionadas ao controle de microrganismos contagiosos como desinfecção dos tetos após a ordenha (“post dipping”), terapia de vaca seca e tratamento ou descarte de vacas infectadas contribuem para o controle de *Streptococcus* ambientais e previnem a ocorrência de surtos em rebanhos (Neave et al., 1969, Robinson et al., 1983, Zadoks et al., 2001). Portanto, estudos recentes sugerem que *S. dysgalactiae* e, em menor grau, *S. uberis* sejam reconhecidos como espécies de caráter dual (ambiental e contagioso), podendo este reconhecimento esclarecer melhor problemas de mastite se comparado a

classificação simplificada como micorganismos ambientais (Zadocks e Schukken, 2003) (Figura 7).

Figura 7. Classificação quanto ao comportamento de *Streptococcus* sp*.



S.agalact. = *Streptococcus agalactiae*: transmissão somente de vaca para vaca.

S. dysgalac. = *Streptococcus dysgalactiae*: intermediário, sendo classificado como contagioso para alguns e ambiental para outros.

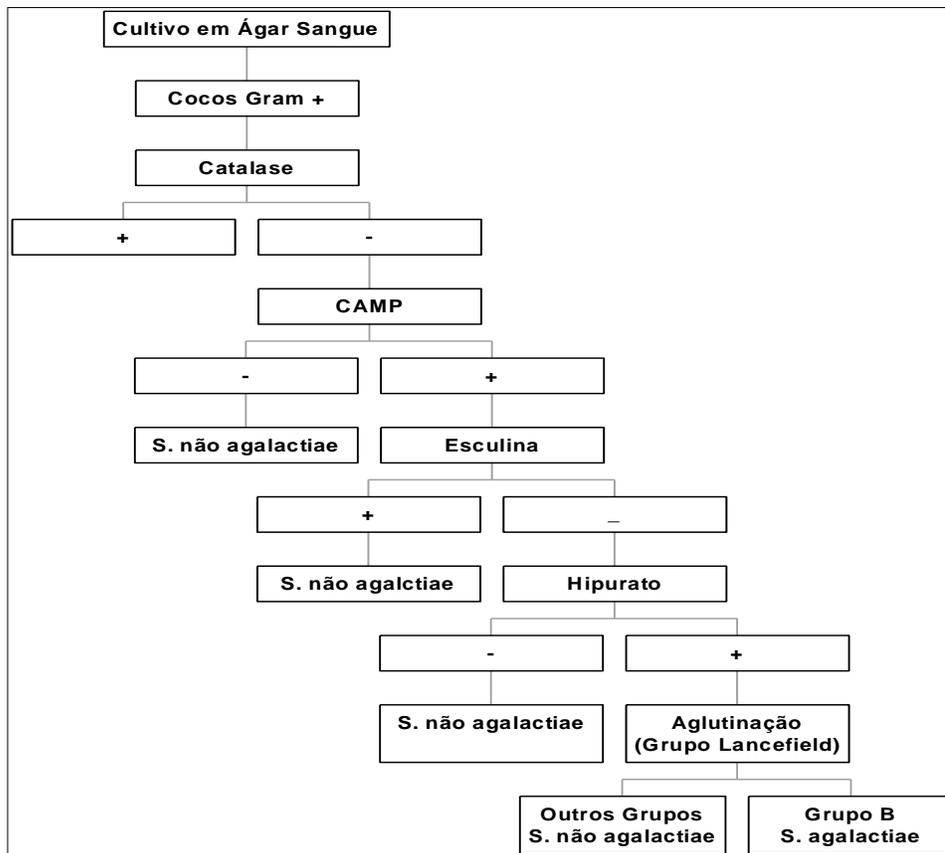
S. uberis = *Streptococcus uberis*: amplamente ambiental, parcialmente contagioso.

*Adaptado de: Zadocks e Schukken (2003).

Diagnóstico microbiológico

Streptococcus sp e *Enterococcus* sp são cocos Gram positivo catalase negativa. Colônias de *Streptococci* e *Enterococci* em ágar sangue são pequenas (1-3 mm de diâmetro), lisas, translúcidas e convexas. Colônias podem ser α -hemolíticas, β -hemolíticas ou não hemolíticas (NMC, 1999). O objetivo central no diagnóstico microbiológico de amostras de leite, com relação às espécies de *Streptococcus*, deve ser a diferenciação entre o *S. agalactiae* de outros *Streptococcus* sp. Em ocasiões específicas, a diferenciação das espécies de *Streptococcus* ambientais pode ser requisitada. A Figura 8 demonstra as provas sugeridas para o diagnóstico microbiológico de *S. agalactiae* e a Tabela 2 propõe um método simplificado de diferenciação das espécies mais comuns de *Streptococcus* (NMC, 1999).

Figura 8. Procedimentos para o diagnóstico microbiológico de *Streptococcus agalactiae* em amostras de leite.



S. não agalactiae = *Streptococcus* não agalactiae; S. agalactiae = *Streptococcus agalactiae*.

Tabela 2. Diferenciação das espécies de *Streptococcus* mais frequentemente isoladas em amostras de leite.*

Espécies	Serogrupo Lancefield	CAMP	Esculina	Hipurato
<i>S. agalactiae</i>	B	+	-	+
<i>S. dysgalactiae</i>	C	-	- / +	-
<i>S. uberis</i>	Nenhum	- / +	+	+

+ significa que >90% das cepas são positivas.

- significa que >90% das cepas são negativas.

+ / - significa maior proporção de cepas positivas do que negativas.

- / + significa maior proporção de cepas negativas do que positivas.

*Adaptado de: NMC, 1999.

2.2.3. Coliformes

O termo “coliforme” não tem significância taxonômica, mas é comumente utilizado para se referir às bactérias da família Enterobacteriaceae que fermentam a lactose como as espécies de *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp e *Enterobacter* sp (Quin et al., 1994). São bastonetes Gram negativos, sendo a *Escherichia coli* e a *Klebsiella* sp as principais espécies associadas à mastite bovina (Smith e Hogan, 1993). Estão sempre presentes no ambiente freqüentado pelas vacas leiteiras, seja nas camas, esterco, solo, água, alimentos e plantas, sendo esse a fonte de infecção (Burton et al., 2002).

As características principais das infecções causadas por coliformes na glândula mamária são alta taxa de casos clínicos e a curta duração da infecção. De acordo com Smith et al. (1985b), 80 a 90% das infecções intramamárias por microrganismos Gram-negativos resultaram em mastite clínica. Aproximadamente 41% das infecções por Gram-negativos duraram menos que 7 dias, demonstrando assim a alta taxa de cura espontânea (Smith et al., 1985b, Todhunter et al., 1991). Somente 2 a 5% das infecções se tornaram crônicas (>200 dias) sendo mais associadas à *Klebsiella* spp ou outros agentes Gram-negativos como *Serratia* spp (Todhunter et al., 1990, Todhunter et al., 1991).

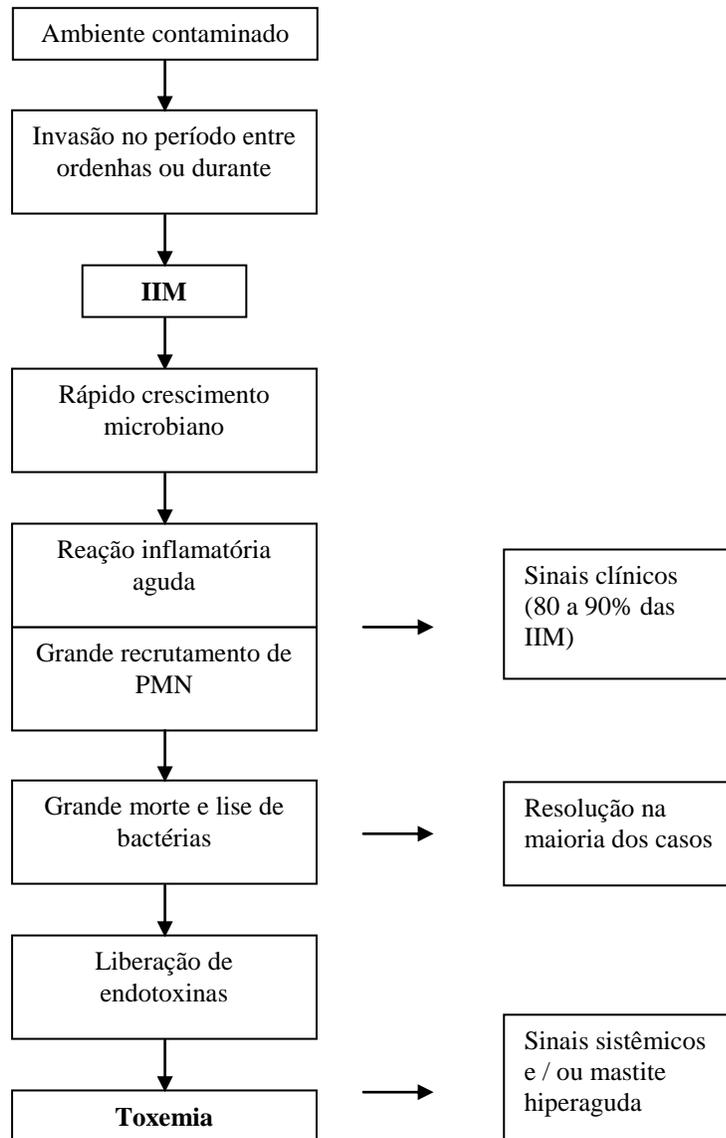
Bactérias coliformes são a principal causa de mastite hiperaguda em rebanhos leiteiros, porém a maioria das infecções por coliformes não está associada a sintomas sistêmicos. Segundo Hogan et al. (1989), a maioria dos casos por coliformes está associado somente a presença de grumos no leite e pouco ou inexistente inchaço na glândula mamária. Aproximadamente 30% dos casos foram associados ao aparecimento de sintomas sistêmicos no animal e somente 10% das infecções por coliformes durante a lactação resultaram em mastite clínica hiperaguda (Smith et al., 1985a, Hogan et al., 1989).

Relativo à epidemiologia dos casos de mastite por coliformes, sua incidência é influenciada sazonalmente sendo maior durante os meses de verão devido às condições de maior temperatura e umidade (Smith et al., 1985b, Hogan et al., 1989). A taxa de

novas infecções é superior durante o período seco em relação ao período da lactação, e muitas infecções adquiridas durante esse período persistem até a lactação e contribuem significativamente para mastite no período inicial da lactação (Smith et al., 1985a, Smith et al. 1985b). Devido a esse padrão de infecções no período seco e aliado a maior susceptibilidade do animal no início da lactação, a taxa de casos clínicos é mais alta no período inicial e diminui progressivamente com o avanço da lactação (Hogan et al., 1989). Segundo Smith e Hogan (1993), infecções por coliformes adquiridas no período seco representaram aproximadamente 34% de todos os casos clínicos por coliformes durante a lactação sendo que 65% dos casos por coliformes ocorreram durante os primeiros 76 dias da lactação.

Todas as bactérias Gram-negativas têm lipopolissacarídeos (LPS) na superfície externa da parede celular que são potentes endotoxinas. Endotoxinas são liberadas quando as bactérias morrem e, quando atingem a circulação, podem causar o processo chamado de toxemia sendo responsáveis por efeitos sistêmicos nos animais como febre e outras alterações metabólicas e vasculares podendo evoluir para o choque letal (Quin et al., 1994). A reação inflamatória da glândula mamária após a invasão de bactérias Gram-negativas é geralmente associada a uma rápida proliferação bacteriana no leite, ativação de várias reações inflamatórias com conseqüente produção de citocinas e migração massiva de anticorpos e neutrófilos do sangue para o leite (Riollet et al., 2000) (Figura 9). Essa resposta inflamatória aguda contribui expressivamente para a alta taxa de cura das infecções por coliformes (Hill, 1981, Shuster et al., 1996). Portanto, a cura espontânea é o resultado normal da maioria dos casos de mastite por coliforme, mas perdas significativas são verificadas com o descarte de leite e a menor produção de leite dos quartos infectados (Burton et al, 2002). A bacteremia é pouco freqüente e, segundo Smith et al. (1985a), ocorreu em 48% dos casos hiperagudos de mastite.

Figura 9. Patogenia dos coliformes em infecções intramamárias.



IIM = infecção intramamária; PMN = polimorfonucleares

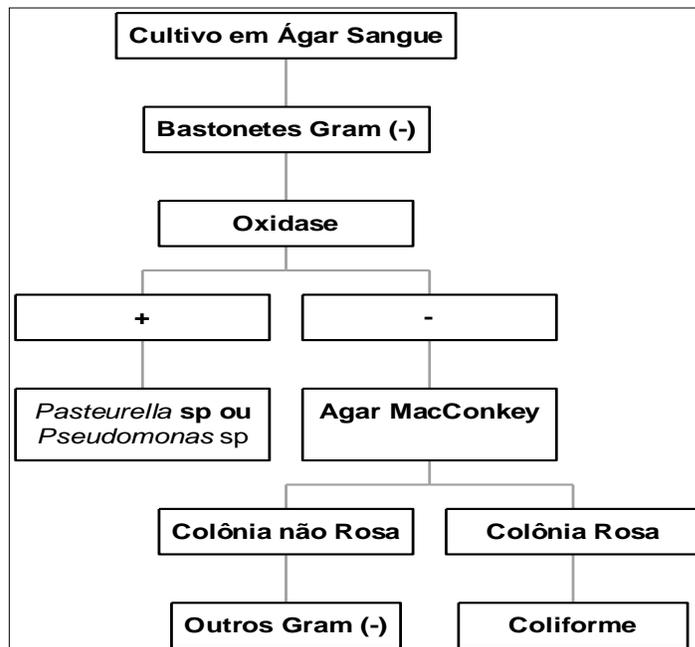
Diagnóstico microbiológico

O diagnóstico microbiológico das infecções por coliformes pode ser complicado pelo fato de muitas infecções existirem com menos que 100 unidades formadoras de

colônias (UFC / mL), o limite mínimo de detecção quando o método padrão é utilizado, semeando 0,01 mL de leite em ágar sangue (Smith, 1983). Portanto, não são raros os diagnósticos negativos em infecções por coliformes mesmo quando a coleta é realizada logo após a detecção do caso clínico de mastite. Ainda, o isolamento de coliformes pode ser resultado de contaminação das amostras durante a coleta.

Coliformes são bastonetes Gram-negativos fermentadores de lactose da família Enterobacteriaceae (Quin et al., 1999, NMC, 1999). Na execução de um diagnóstico rápido e mais econômico, o principal objetivo deve ser a diferenciação dos coliformes de outras bactérias Gram-negativas (Figura 10). Em situações de grande ocorrência de casos clínicos de mastite ou em casos refratários a tratamentos, métodos mais elaborados para diferenciação das espécies bacterianas devem ser utilizados (Tabela 3).

Figura 10. Procedimentos para o diagnóstico microbiológico de coliformes em amostras de leite.*



*Fonte: Sears et al. (1993)

Tabela 3. Diferenciação das espécies de bactérias Gram-negativas mais frequentemente isoladas em amostras de leite.*

Microrganismo	Lactose	Citrato	Motilidade	Oxidase	TSI
<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	-	A/A,G
<i>Klebsiella spp.</i>	+	+	-	-	A/A,G
<i>Enterobacter spp.</i>	+	+	+	-	A/A,G
<i>Serratia spp.</i>	-	+	+	-	K/A
<i>Pseudomonas spp.</i>	-	+/-	+	+	K/K
<i>Proteus spp.</i>	-	-/+	+	-	K/AS+
<i>Pasteurella spp.</i>	-	-	-	+	A/A

+ significa que >90% das cepas são positivas.

- significa que >90% das cepas são negativas.

+ / - significa maior proporção de cepas positivas do que negativas.

- / + significa maior proporção de cepas negativas do que positivas.

A = ácido; K = alcalino; G = produção de gás; S+ = produção de sulfato de hidrogênio

*Adaptado de: NMC, 1999.

2.3. INVESTIGAÇÃO DA MASTITE EM REBANHOS

Para uma correta atuação na prevenção e controle da mastite dentro de um rebanho, a identificação da existência de problemas e a correta definição desses problemas é essencial (Ruegg, 2003). A mastite é uma doença de causa multifatorial e a interação dos múltiplos fatores envolvidos tornam a doença bastante complexa (Philpot e Nickerson, 2000). Como regra também em outras doenças, quanto mais cedo o diagnóstico de problemas relacionados à mastite no rebanho maiores são as chances de reversão e controle da situação. Perdas decorrentes de casos clínicos de mastite são rapidamente identificadas, porém, perdas com a mastite subclínica são geralmente superiores e passam despercebidas em muitos casos (Ruegg, 2003). Portanto, é nesse sentido que uma investigação eficiente e rotineira da situação da mastite no rebanho é necessária e fundamental para garantir um melhor status do rebanho com relação à doença que mais prejuízos causa à atividade.

A erradicação da mastite em rebanhos leiteiros é impossível sendo sua prevenção e controle fundamentais. A mastite é uma doença bastante dinâmica e, portanto a obtenção de dados epidemiológicos da doença é de grande importância para melhor visualização e interpretação de sua dinâmica (Ruegg, 2003). Dois tipos gerais de medidas são utilizados para determinação da extensão da doença da glândula mamária de um

rebanho (Thurmond, 1993). A prevalência é o primeiro e se refere à quantidade de mastite em um tempo específico. A incidência seria a medida da taxa de novas infecções em um determinado período de tempo. Vários métodos diagnósticos podem ser empregados com o intuito de acompanhar a prevalência e incidência da mastite no rebanho. Geralmente, a mastite clínica é detectada por observações visuais dos próprios ordenhadores sobre condições anormais do leite e /ou do úbere das vacas. California Mastitis Test (CMT), Winsconsin Mastitis Test (WMT) e a Contagem de Células Somáticas (CCS) são métodos empregados para o diagnóstico da mastite subclínica. A forma e frequência de realização e a organização dos dados provenientes desses métodos diagnósticos são fundamentais para gerar informações úteis aos veterinários e proprietários de rebanhos no intuito de inferir sobre a real situação da fazenda. Esses dados, por consequência, podem auxiliar na correta tomada de decisões na resolução dos problemas eventualmente enfrentados.

2.3.1. Contagem de células somática (CCS)

O termo “somática” significa “derivado do corpo”. As células somáticas presentes no leite são compostas por células da descamação do tecido mamário e leucócitos provenientes da circulação sanguínea. Em um quarto infectado, aproximadamente 99% das células presentes são glóbulos brancos sanguíneos e 1% são células da descamação. Os leucócitos tem como função combater agentes infecciosos e, além disso, participar dos processos reparatórios da glândula após o término da infecção (Philpot e Nickerson, 2000).

Vários fatores afetam a contagem de células somáticas de um animal. Estádio de lactação, idade da vaca e nível de produção são alguns desses fatores, mas a infecção intramamária é o fator que mais afeta a CCS do leite (Philpot e Nickerson, 2000). A CCS pode ser mensurada em diferentes níveis, porém a CCS do tanque de expansão e a CCS individual do animal são as formas mais frequentes e necessárias para o acompanhamento do status infeccioso dos rebanhos.

a) CCS no tanque de expansão (CCSTQ)

A CCSTQ é geralmente a referência mais freqüente para identificação de problemas de mastite. Geralmente a CCSTQ correlaciona bem com a prevalência de infecções intramamárias no rebanho e pode ser considerada como bom parâmetro para detecção de problemas de mastite (NMC, 1987) (Tabela 4).

Tabela 4. Prevalência estimada de infecção e perdas na produção de leite associadas a alta contagem de células somáticas do tanque de expansão.*

CCSTQ (1.000 cél. / mL)	Porcentagem de quartos infectados no rebanho	Percentual de perda na produção ¹
200	6	0
500	16	6
1.000	32	18
1.500	48	29

¹Perda de produção calculada como porcentagem da produção esperada a 200.000 cél. / mL.

CCSTQ = contagem de células somáticas do tanque de expansão.

*Fonte: NMC, 1987.

No entanto, a CCSTQ é influenciada pela CCS e produções individuais e pode ser considerada somente como um indicativo de mastite subclínica sendo que seus valores geralmente agregam pouco para definição do problema no rebanho. É muito difícil para o proprietário ou o consultor do rebanho reconhecer problemas emergentes de mastite mediante os aumentos lentos ou esporádicos da CCSTQ (Ruegg, 2003). Como exemplo das limitações da CCSTQ, Ruegg (2003) exemplificou dois rebanhos hipotéticos, A e B, ambos compostos por 10 animais (Tabela 5). O rebanho A possui 10% de prevalência de mastite subclínica (% de vacas acima de 250.000 céls / mL) e o rebanho B possui 90% de prevalência. Ao contrário do que se esperava, o rebanho A possui uma CCS do tanque de expansão bastante superior ao rebanho B (825.000 vs 250.000 céls. / mL) devido a grande contribuição do animal 10 para o pool de células somáticas do tanque. Por mais que esse exemplo seja extremo, demonstra que nem sempre podemos confiar na CCSTQ como único parâmetro, sendo de grande importância a realização da CCS individual para melhor definição dos problemas.

Tabela 5. Comparação da contagem de células somáticas do tanque e a prevalência de mastite subclínica de dois rebanhos hipotéticos constituídos de 10 vacas cada.*

Rebanho hipotético A				Rebanho hipotético B			
Vaca	CCS (x1.000)	Leite (Kg)	Contribuição para o tanque (CCS x Kg)	Vaca	CCS (x1.000)	Leite (Kg)	Contribuição para o tanque (CCS x Kg)
1	100	25	2.500	1	300	25	7.500
2	100	25	2.500	2	300	25	7.500
3	100	25	2.500	3	300	25	7.500
4	100	25	2.500	4	300	25	7.500
5	100	25	2.500	5	300	25	7.500
6	100	25	2.500	6	300	25	7.500
7	100	25	2.500	7	300	25	7.500
8	100	25	2.500	8	300	25	7.500
9	100	25	2.500	9	300	25	7.500
10	3.000	75	225.000	10	100	75	7.500
% de vacas com CCS>250.000			10%				90%
CCSTQ aproximada			825.000				250.000

CCSTQ aproximada = Contagem de células somáticas do tanque de expansão calculada pela soma da contribuição de células de cada animal dividida pela produção total de leite.

*Adaptado de: Ruegg, (2003).

Por mais problemas que a CCSTQ apresente, metas devem ser definidas baseadas nas prioridades e capacidades de manejo de cada fazenda. No entanto, a produção consistente de leite com CCSTQ inferior a 200.000 céls. / mL deve ser uma meta exequível para maioria das fazendas leiteiras que almejem eficiência e rentabilidade.

b) CCS individual

Definir a prevalência e a incidência de uma determinada doença no rebanho é fundamental para a definição de seu “status” e visualização de sua dinâmica. O diagnóstico da mastite subclínica pode ser realizado pelo isolamento do agente infeccioso da glândula ou através da verificação da reação inflamatória advinda da infecção. Em acompanhamentos epidemiológicos, a fácil execução do método diagnóstico e o custo acessível são de grande importância para permitir que avaliações rotineiras sejam realizadas. Equipamentos de contagem eletrônica de células somáticas permitem a análise rápida e em grandes volumes de amostras. O custo relativamente acessível dessa análise permite que criadores façam o acompanhamento individual dos animais gerando informações essenciais para um eficiente programa investigativo.

O nível de infecção em um rebanho depende da frequência de ocorrência de novos casos e do tempo de persistência desses casos até que sejam eliminados (Philpot e Nickerson, 2000).

Portanto, a prevalência da mastite em um rebanho é uma função da incidência e do tempo de duração das infecções. Metas para prevalência de mastite subclínica em rebanhos devem ser de possuir menos que 15% das vacas com CCS maior que 250.000 céls. / mL, ou seja, prevalência menor que 15% (Ruegg, 2003).

Em rebanhos com problemas de mastite causados por microrganismos contagiosos, a prevalência de mastite é geralmente alta devido à natureza crônica das infecções. Além disso, como a exposição a esses agentes se dá no momento da ordenha, a mastite aumenta de prevalência em categorias de animais expostos por maiores períodos. Por exemplo, a prevalência de mastite subclínica geralmente aumenta com o avançar da lactação e com o número de parições. Em casos de problemas com patógenos ambientais clássicos, a duração das infecções é tipicamente curta e a incidência, prevalência e taxa de cura são geralmente similares. *Streptococosi* de origem ambientais (*S. dysgalactiae* e *S. uberis*) podem exibir padrões sugestivos de ambos patógenos, ambientais e contagiosos (Ruegg, 2003). A organização dos dados de CCS em tabelas para diferenciação das categorias de animais auxiliam muito no processo investigativo (Tabela 6).

Tabela 6. Distribuição da contagem de células somáticas em um rebanho com problema diagnosticado por *Streptococcus agalactiae*.*

Estágio de lactação (DEL)	Primíparas				Pluríparas				Todas as vacas			
	No. Vacas	EL Médio	Novos EL >4	Total EL >4	No. Vacas	EL Médio	Novos EL >4	Total EL >4	No. Vacas	EL Médio	Novos EL >4	Total EL >4
1-100	60	3,0	13	14	35	5,3	10	25	85	3,9	23	38
			22%	23%			29%	71%			24%	41%
101-240	39	2,7	0	10	42	5,0	1	28	81	3,9	1	38
				26%			2%	67%			1%	47%
>240	18	4,2	0	7	38	5,4	2	28	56	5,0	2	35
				39%			5%	74%			4%	63%
Total	117	3,1	13	31	116	5,2	13	81	232	4,2	26	112
			11%	26%			11%	70%			11%	48%


 Aumento de Prevalência

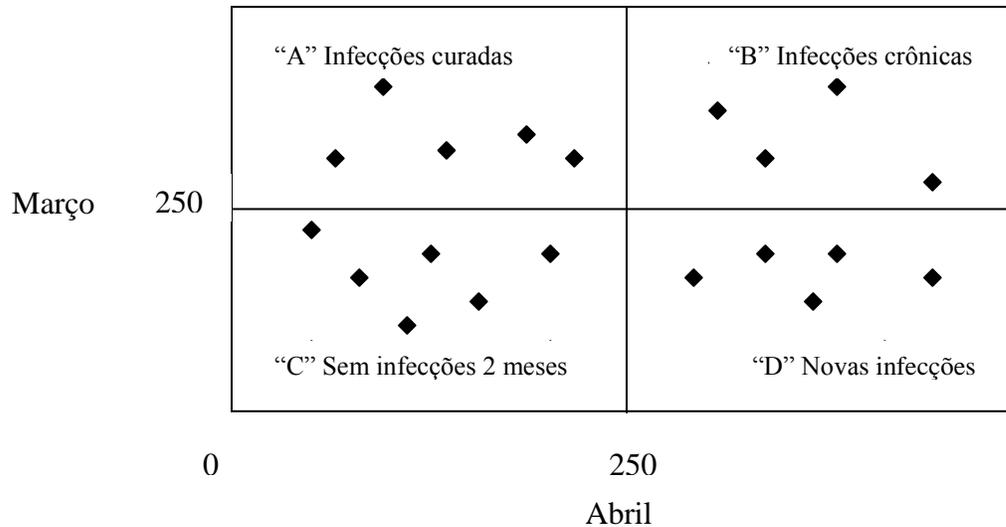
EL = Escore Linear. Transformação linear da contagem de células somáticas (200.000 céls. / mL , EL = 4).
 DEL = Dias em lactação.

*Adaptado de: Ruegg, (2003).

Há duas maneiras de se calcular a incidência de mastite em um rebanho. A primeira é a “incidência clássica” que leva em consideração os dados de CCS de toda a lactação e a segunda, a “incidência dinâmica” que se baseia nas duas contagens, mais recentes, de células somáticas. Para o cálculo da incidência clássica, um novo caso de mastite é definido quando uma vaca apresenta CCS acima de um determinado ponto de corte (200.000 ou 250.000 cél / mL) pela primeira vez na lactação. Por essa definição, as taxas de novas infecções são subestimadas, pois assumem que um animal só pode apresentar uma única nova infecção por lactação. Meta para incidência clássica é menor que 5% ao mês (Ruegg, 2003). Na incidência dinâmica, a contagem de células somáticas atual é comparada à contagem anterior, e um novo caso de mastite é considerado se uma vaca com CCS abaixo do ponto de corte no controle anterior se apresenta com CCS acima do ponto de corte na amostragem atual. Ao contrário da incidência clássica o denominador para o cálculo não seria composto por todas as vacas em lactação, mas somente por aquelas que se apresentam com baixa CCS no controle anterior. Portanto a incidência dinâmica é a taxa de novos casos em relação a vacas potencialmente sujeitas. Essa seria a melhor forma de visualizar a dinâmica de infecções no rebanho e a meta seria de uma incidência menor que 12% ao mês (Machado e Cassoli, 2002).

Um método que auxilia na definição da incidência dinâmica é a criação de gráficos de plotagem usando CCS de dois meses consecutivos (Figura 11). Além da melhor visualização da incidência dinâmica, outros dados importantes como taxa de cura e/ou taxa de infecções que permanecem crônicas podem ser extraídos (Figura 12).

Figura 11. Gráfico de plotagem de contagem de células somáticas para dois meses consecutivos.*



*Adaptado de: Ruegg, 2003.

Figura 12. Fórmulas para cálculos e metas de índices epidemiológicos da mastite subclínica.

<p>Prevalência = Vacas >250.000 CCS ÷ Vacas em Lactação (Meta <15%)</p> <p>Incidência Clássica = Vacas >250.000 CCS pela primeira vez na lactação ÷ Vacas em Lactação (Meta <5% ao mês)</p> <p>Incidência Dinâmica = Vacas >250.000 CCS teste atual ÷ Vacas <250.000 no teste anterior (D ÷ (C+D)) (Meta <12%).</p> <p>Taxa de cronicidade de infecções = Vacas >250.000 CCS teste atual ÷ Vacas >250.000 CCS no teste anterior (B ÷ (A+B)) (Meta <50%).</p>
--

2.3.2. Califórnia Mastitis Test (CMT)

O CMT é um método fácil e confiável para o diagnóstico de mastite subclínica. O reagente CMT é simplesmente um detergente associado a um indicador de pH (púrpura de bromocresol). O nível de reação entre o detergente e o DNA nucléico das células é a medida do número de células somáticas no leite. A relação entre os valores de CCS e CMT não é precisa devido ao alto grau de variabilidade de valores de CCS para cada escore de CMT (Tabela 7).

O CMT foi desenvolvido para testar amostras de leite de quartos individuais, mas também foi utilizado em amostras compostas de quartos mamários e em amostras de tanque de expansão (Schalm e Noorlander, 1957). A reação de CMT deve ser lida dentro de 15 segundos após a mistura do leite com o reagente, pois reações fracas desaparecem com o tempo.

Em amostras de quartos mamários, quando o objetivo for minimizar a taxa de falso negativos, o teste deve ser lido como negativo versus positivo, com a reação “traço” classificada como positiva. Se o CMT for utilizado como uma ferramenta para decisões de descarte, talvez um ponto de corte com uma menor taxa de falso positivos seja desejável (Ruegg, 2003).

Tabela 7. Relação entre contagem de células somáticas e escore de CMT.*

Score do CMT	Reação visível	Faixa de CCS (1.000 céls/mL)
Negativo	Mistura permanece líquida; sem evidência de precipitado	0-200
Traço	Leve precipitação; desaparece com movimento contínuo	150-500
1	Precipitação distinta; sem tendência a formação de gel	400-1.500
2	Mistura engrossa imediatamente e se concentra	800-5.000
3	Formação de gel e superfície se torna convexa	>5.000

Adaptado de: Ruegg, 2003.

2.3.3. Detecção e registro dos casos de mastite clínica

A retirada dos primeiros jatos de leite e a observação da secreção advinda, anterior à ordenha, é uma rotina fundamental para a detecção eficiente de casos de mastite clínica. O monitoramento da mastite clínica pode ajudar na detecção recente de

problemas e, portanto, tornar a vigilância ainda mais eficiente na prevenção de perdas devido à mastite (Sears et al., 1993). Não são raros os casos em que falhas de manejo, como má conduta na limpeza de camas em sistemas de confinamento ou excesso de lama e sujidades em áreas de descanso dos animais, são detectadas pela crescente incidência de casos de mastite clínica. Esse aumento de incidência pode refletir em aumentos na contagem de células somáticas, porém, só seriam verificados no determinado período de coleta para análise caso não estivessem sendo detectados e devidamente anotados os casos de mastite clínica.

Estudos divergem com relação à definição de mastite e aos cálculos das taxas de mastite clínica (Ruegg, 2003). A prevalência de qualquer doença no rebanho é uma função de sua incidência e duração nos animais, portanto, acompanhar diariamente a prevalência da mastite clínica é uma boa forma de monitorar essa doença. Em um rebanho de 100 vacas, duas vacas com sintomas clínicos de mastite em um determinado dia representam uma prevalência de 2% de mastite naquele dia. Ao final do mês, a média aritmética desse índice é a prevalência média diária de mastite clínica naquele determinado mês. Esse dado seria mais bem coletado e visualizado em tabelas de anotação diária que poderiam servir inclusive para o acompanhamento de tratamentos e de descarte de leite residual (Fonseca e Santos, 2001) (Figura 13). Meta factível seria de possuir uma prevalência média diária de mastite clínica $<1\%$.

Figura 13. Ficha mensal para acompanhamento de casos de mastite clínica.*

Num. Vaca	Mês: Dezembro														Total de vacas-dia						
	Dia																				
	01		02		03		04		05		06		07			08		09		10	
	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	M	T	
191	G	G	G																		2
221			G	G	G																2
222					G	G															1
245													G	G							2
Num. vacas	1		2		2		0		0		0		1		1		0		0		7
Vacas em lactação	100		100		100		100		100		100		100		100		100		100		100
Prevalência (%)	1		2		2		0		0		0		1		1		0		0		0,7

M = Manhã; T = Tarde; G = Grumos (secreção anormal da glândula).

Prevalência média diária de mastite clínica = ((total de vacas-dia de mastite ÷ num. médio de vacas em lactação) ÷ total de dias no mês) x 100.

*Adaptado de: Fonseca e Santos (2001).

Outros índices importantes para um bom sistema de investigação medem a recorrência de casos clínicos, o número médio de quartos acometidos e a duração dos casos e devem ser calculados a cada trimestre e de forma sazonal (Reneau, 1993) (Figura 14). Para uma melhor padronização desses números, adota-se uma regra estipulando-se que um novo caso é contado, na mesma vaca e quarto acometidos anteriormente, quando esse caso ocorre distante em pelo menos 14 dias do primeiro caso. Se esse intervalo for menor, considera-se como parte do mesmo caso já anteriormente computado (Ruegg, 2003).

Figura 14. Cálculos de índices de mastite clínica em rebanhos.*

<p>% de vacas com >1 caso clínico = Núm. vacas com 2 ou mais casos clínicos ÷ Núm. médio de vacas em lactação durante o período.</p>
<p>Probabilidade de recorrência = Núm. vacas com 2 ou mais casos clínicos ÷ Núm. vacas com 1 caso durante o período</p>
<p>Média de quartos por caso = Núm. quartos afetados ÷ Núm. vacas com mastite no período</p>
<p>Média de duração dos casos = Total de dias de mastite ÷ total de casos no período</p>

*Adaptado de: Reneau, 1993.

2.3.4. Cultivos microbiológicos

A identificação dos agentes microbiológicos responsáveis pelos casos de mastite no rebanho auxilia de maneira essencial na determinação das estratégias de manejo a serem adotadas para o controle da doença (Sears et al., 1993). O uso de ferramentas de diagnóstico da mastite subclínica como a CCS e o esforço na correta detecção de casos de mastite clínica junto à organização dos dados obtidos geralmente pressupõe a natureza do problema enfrentado, porém uma definição mais segura, na maioria dos casos, exige a recuperação e o conhecimento do agente etiológico no rebanho. Como no caso da CCS, as análises microbiológicas também podem ser feitas no tanque de expansão ou individual por animal ou quarto mamário.

Cultivo microbiológico do tanque de expansão

No intuito de agregar informação para programas investigativos, além da contagem bacteriana total (CBT) do tanque, a contagem diferenciada por tipo bacteriano é fundamental. Ao contrário da CBT, métodos eletrônicos rápidos de análise não são disponíveis para a contagem diferenciada por espécies. Portanto, métodos tradicionais de cultivos são empregados demandando cuidados extras na forma de coleta e envio das amostras. O uso de procedimentos assépticos e de utensílios estéreis para coleta é essencial e, de acordo com Farnsworth (1993), amostras compostas de 4 dias são necessárias para a obtenção de resultados mais consistentes. As amostras não devem ser congeladas e devem ser enviadas resfriadas ao laboratório (Jayarao e Wolfgang, 2003). A constante agitação durante o resfriamento do leite propicia uniformidade adequada ao produto no tanque e, portanto o melhor momento para a coleta seria ao término da ordenha. Um utensílio simples e de fácil acesso e que poderia auxiliar na coleta seria uma pipeta estéril de inseminação acoplada a uma seringa (Farnsworth, 1993).

O nível de contaminação ou de presença de determinados agentes no leite pode ser indicativo de falhas em diversas etapas da produção do leite ou na saúde da glândula mamária dos animais. Ainda não existem dados brasileiros que estabeleçam níveis

adequados de contaminação dos diferentes tipos bacterianos e, com certeza, seriam bem variados de acordo com o modelo de produção e de manejo adotados em cada propriedade. Farnsworth (1992) demonstrou a classificação em níveis de contaminação de diversos tipos bacterianos em fazendas do estado de Minnesota (EUA) (Tabela 8).

Tabela 8. Tabela de significância de concentração (UFC / mL) de diversos tipos bacterianos em amostras de tanque de expansão da Universidade de Minnesota (EUA).*

Tipo de bactéria	Níveis de contaminação			
	Baixo	Moderado	Alto	Muito alto
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0-50	50-200	200-400	>400
<i>Staphylococcus aureus</i>	<50	50-150	150-250	>250
<i>Streptococcus</i> não <i>agalactiae</i>	500-700	700-1200	1200-2000	>2000
Coliformes	<100	100-400	400-700	>700
SCN	<300	300-500	400-750	>750

SCN = *Staphylococcus coagulase* negativos

*Adaptado de: Farnsworth, 1992.

Se as amostras forem bem manipuladas e não permitirem a multiplicação bacteriana, o aparecimento de *S. aureus* e de *S. agalactiae* significam a presença de animais infectados no rebanho (Farnsworth et al., 1977). No entanto, devido a grandes variações de eliminação, flutuações breves de contagem não devem ser usadas como medida de sucesso ou fracasso em um programa de controle.

Streptococcus não *agalactiae* são encontrados em grandes quantidades no ambiente da vaca. Portanto, a maioria dos *Streptococcus* sp. encontrados no tanque são provenientes da pele do teto das vacas e, somente em situações raras, infecções intramamárias contribuem significativamente para esse número (Farnsworth, 1993). *Streptococcus* sp indicam a presença de vacas sujas na ordenha e/ou falhas na preparação dessas para ordenha como, por exemplo, o uso excessivo de água na ordenha (Philpot e Nickerson, 2000).

Coliformes são geralmente eliminados em pequenos períodos quando participam de infecções intramamárias. Portanto, os níveis de contaminação no tanque são quase inteiramente relacionados à contaminação da pele do teto das vacas no momento da

ordenha, também sugerindo a presença de vacas sujas e/ou falhas na preparação dessas para ordenha (Farnsworth, 1993).

Staphylococcus coagulase negativos são habitantes normais da pele dos tetos e sua presença em grandes números no leite do tanque de expansão geralmente está associada à falta de desinfecção dos tetos após a ordenha (pós-dipping) ou mesmo pós-dipping incompleto ou ineficaz (Farnsworth, 1993).

Cultivos microbiológicos individuais

Das ferramentas investigativas propostas até então, o mais trabalhoso e caro seria o cultivo microbiológico individual dos animais. Procedimentos assépticos de coleta e frascos estéreis são necessários e amostras obtidas anterior à ordenha são preferidas devido a maior recuperação de patógenos (maior sensibilidade) se comparada a amostras obtidas após a ordenha (Sears et al., 1991). Para a investigação da mastite subclínica, geralmente amostras compostas são preferidas em relação a amostras de quartos mamários no intuito de reduzir custos analíticos (Ruegg, 2003). Para a investigação dos patógenos determinantes de casos clínicos, a coleta do leite do quarto mamário logo após a detecção do caso é recomendada.

Resultados de cultivos microbiológicos individuais correlacionam bem à CCS dos animais quando o problema em questão está associado a microrganismos contagiosos. Esses microrganismos comumente produzem infecções de longa duração e que persistem em lactações subseqüentes (Sears et al., 1993). A identificação de vacas positivas para *S. agalactiae* via cultivo microbiológico é bastante eficiente (Ruegg, 2003). A sensibilidade e a especificidade do método de cultivo é superior a 95% e diferenças nas técnicas de cultivo como o volume do inóculo utilizado ou na amostragem por quarto mamário ou composta não influenciam os resultados (Dinsmore et al., 1991). Ao contrário, vacas infectadas por *S. aureus* eliminam o microrganismo de forma cíclica e cultivos de amostras compostas de leite podem resultar em uma taxa de falso-negativos de até 37% (63% de sensibilidade) (Lam et al., 1996). A taxa de isolamento desse agente pode

aumentar via amostragem de quartos mamários ao invés de amostras compostas, uso de coletas múltiplas consecutivas e ainda pelo aumento do volume do inóculo ou o emprego de técnicas como centrifugação e pré-incubação de amostras (Tabela 9) (Sears et al, 1990, Lam et al., 1996, Zecconi et al., 1997, Sol et al., 2002).

Microrganismos ambientais geralmente produzem infecções de curta duração e a prevalência de infecção determinada pelo cultivo microbiológico de todos animais, na maioria dos casos, não retrata a dinâmica da situação no rebanho. Para uma melhor investigação de problemas relacionados a patógenos ambientais, o cultivo de casos clínicos e o cultivo do leite do tanque de expansão são recomendados (Smith e Hogan, 1993). Em casos clínicos, 30 a 35% das amostras enviadas para cultivo podem não crescer nenhum patógeno, gerando resultados negativos. As infecções por coliformes são responsáveis por uma porção considerável desses casos, pois ao detectar o caso clínico, muitas infecções intramamárias já foram resolvidas (Erskine et al., 2003). Além disso, o cultivo de casos clínicos também auxilia significativamente na identificação de vacas portadoras de agentes contagiosos, pois nesses casos, eventos de casos clínicos esporádicos são normais.

Tabela 9. Sensibilidade relativa de diferentes metodologias de amostragem e técnicas de cultivo de *Staphylococcus aureus*.

Técnica / Amostragem	Sensibilidade	Pesquisador
Método padrão / Amostra composta		Lam et al., 1996
Coleta única	63	
2 coletas consecutivas	86	
3 coletas consecutivas	95	
Método padrão / Quarto mamário		Sears et al, 1990
Coleta única	75	
2 coletas consecutivas	94	
3 coletas consecutivas	98	
Volume aumentado do inóculo / Amostra composta		Lam et al., 1996
Inóculo 0,01 mL	78	
Inóculo 0,05 mL	86	
Inóculo 0,10 mL	90	
Centrifugação / Quarto mamário		Zecconi et al., 1997
Sedimento de 10 mL	Aumento em 86,6% na recuperação de <i>S. aureus</i> se comparado ao método padrão.	
Pré-Incubação / Quarto mamário		Sol et al., 2002
Método padrão	19	
Pré-incubação por 24h a 37°C	88	
Padrão + Pré-incubação	91	

Uma prática comum em cultivos laboratoriais de casos clínicos é a associação de resultados de testes de susceptibilidade dos microrganismos encontrados, principalmente em cultivos de casos clínicos de mastite. De acordo com Constable e Morin (2003), testes “in vitro” de sensibilidade podem não prever a eficácia do antibiótico “in vivo”, não sendo, portanto recomendados para guiar decisões de tratamentos de casos individuais. Os motivos apresentados para isso são que o teste “in vitro” pode usar um antibiótico diferente do ingrediente ativo presente em formulações comerciais, antibióticos específicos podem deprimir os mecanismos normais de defesa da glândula e/ou a distribuição do antibiótico na glândula com inflamação pode ser irregular. Testes de sensibilidade podem gerar informações importantes quanto ao perfil de susceptibilidade das infecções do rebanho quando *S. aureus* produtores de β -lactamase são os microrganismos envolvidos. No entanto, o perfil de susceptibilidade de microrganismos ambientais tem pouca validade já que infecções são originadas de fontes diversas (Constable e Morin, 2003).

2.4. CONTROLE DA MASTITE

Os métodos aplicados para o controle da mastite devem focar os dois eixos principais que definem o binômio saúde vs doença que são: PRESSÃO DE PATÓGENO X RESISTÊNCIA DO ANIMAL (Smith, 1983). Para uma maior eficiência dos métodos de controles, o conhecimento do reservatório de patógenos, da via de infecção e dos comportamentos desses agentes após a infecção, entre outros, é fundamental. É por diferirem em quase todos esses aspectos que se deve sempre dividir a mastite em dois grupos: MASTITE AMBIENTAL E MASTITE CONTAGIOSA, para o efeito de formulação de programas de controle específicos para cada um.

Alguns pontos de controle são comuns tanto para a mastite ambiental quanto para a contagiosa. Abaixo seguem enumerados os pontos de controle importantes em cada tipo de mastite e, logo a seguir, uma discussão unificada desses tópicos.

Métodos recomendados para o controle da mastite ambiental:

1. Locais limpos e secos para os animais seja durante a lactação ou no período seco.
2. Rotina de ordenha higiênica focando a utilização da desinfecção dos tetos prévia à ordenha (pré-dipping), visando ordenhar tetos limpos e secos.
3. Tratamento de vaca seca em todos os quartos mamários.
4. Deixar vacas em pé uma hora após o término da ordenha.
5. Funcionamento adequado do equipamento de ordenha.
6. Tratamento de casos clínicos
7. Melhoria do status imunológico dos animais via redução de stress, suplementação adequada de vitaminas e minerais ou mesmo vacinações.

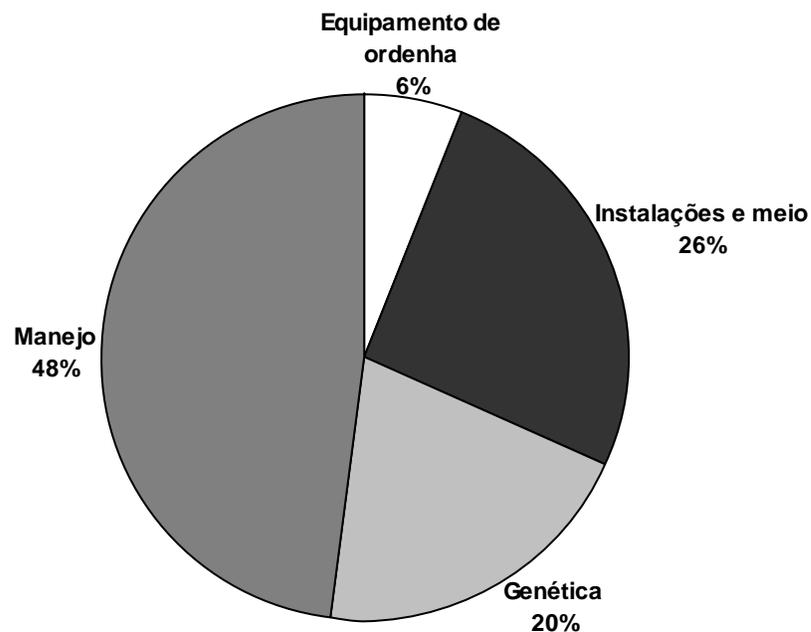
Métodos recomendados para o controle da mastite contagiosa:

1. Rotina higiênica de ordenha focando a desinfecção dos tetos após a ordenha (“post dipping”).

2. Funcionamento adequado do equipamento de ordenha.
3. Tratamento de vaca seca em todos os quartos mamários.
4. Segregação e/ou linha de ordenha
5. Tratamento de casos clínicos e alguns subclínicos
6. Descarte de animais crônicos
7. Melhoria do “status” imunológico dos animais via redução de stress, suplementação adequada de vitaminas e minerais ou mesmo vacinações.

A necessidade de todos esses pontos de controle reforçam a natureza multifatorial da mastite. De todos os pontos abordados, o manejo é o principal fator responsável pela mastite (Philpot e Nickerson, 2000). A avaliação e a adoção de práticas rotineiras importantes nesse aspecto são fundamentais para um bom controle da doença e requer um comprometimento considerável de todos os envolvidos na produção do leite sendo uma consultoria profissional fundamental nesse momento (Figura 15).

Figura 15. Fatores responsáveis pela mastite em rebanhos leiteiros.



*Adaptado de: Philpot e Nickerson (2000). Dados provenientes da Dinamarca.

2.4.1. Ambiente limpo e seco

Visa atuar principalmente no reservatório de patógenos ambientais reduzindo a exposição dos tetos aos agentes. Em sistemas confinados tipo “free-stall”, camas orgânicas são fontes freqüentes desses microrganismos sendo *Streptococcus uberis* geralmente associados a camas de palha e *Escherichia coli* e *Klebsiella* sp associados a camas de serragem (NMC, 1999). Camas de material inorgânico como areia devem ser preferidas. Outras fontes comuns desses microrganismos são esterco, lama, sujeiras, poças de água paradas, panos e esponjas utilizadas para limpeza do úbere, áreas de cocho e de sombras úmidas e sujas ou mesmo seringas, cânulas ou agulhas contaminadas.

A patogenia complexa dos microrganismos ambientais exige ampla atuação e acompanhamento de todo o ambiente da fazenda já que as infecções ocorrem durante todo o tempo, seja durante a ordenha ou nos intervalos entre elas. Outro aspecto importante é a manutenção de ambientes adequados em momentos de maior susceptibilidade dos animais para a aquisição de infecções de patógenos ambientais (duas semanas pós-secagem e pré-parto e fase inicial da lactação) (Smith et al., 1985a).

2.4.2. Higiene de ordenha

Uma boa qualidade de ordenha se resume em ordenhar vacas calmas, sadias, bem estimuladas, com tetos limpos e secos, pelo menor tempo possível, sem deixar leite residual ou exercer sobre-ordenha e desinfetar os tetos após esse procedimento (Ruegg e Reineman, 2002).

A desinfecção dos tetos anterior à ordenha (pré-dipping) diminui de maneira significativa a presença de microrganismos nos tetos resultando em 50% de redução de infecções por microrganismos ambientais em alguns casos (Smith e Hogan, 1993). Atua, portanto na redução da exposição a patógenos em um momento de risco para infecções que seria o processo de ordenha. Segundo Bramley (1990), aproximadamente 70% dos tetos estavam contaminados com *Streptococcus* ambientais anterior à ordenha.

A desinfecção dos tetos após a ordenha (pós-dipping) age principalmente na defesa a patógenos contagiosos evitando que esses colonizem o teto ou o canal. Diminui assim a pressão de patógeno e conseqüentemente as novas infecções. Além disso, logo após a ordenha quando o canal do teto está aberto e a pressão interna é mínima constitui o momento ideal para entrada direta de patógenos que estavam ali colonizando ou que chegaram via equipamento, utensílios ou mãos contaminadas. Novas infecções por microrganismos contagiosos são reduzidas em aproximadamente 50% através do uso eficiente do pós-dipping (NMC, 1987).

2.4.3. Procedimentos de ordenha e funcionamento adequado do equipamento de ordenha

Um bom equipamento de ordenha, associado a boas práticas de conduta do pessoal envolvido na ordenha precisam garantir que processos importantes sejam eficientemente executados (Philpot e Nickerson, 2000):

- Estimular tetos durante 12 a 15 segundos e verificar o status sanitário da glândula via retirada e observação dos primeiros jatos.
- Ordenhar tetos limpos e secos permitindo uma ação de 30 segundos do produto de pré-dipping.
- Acoplar conjuntos 40 a 90 segundos após o início da estimulação.
- Ajustar conjuntos com saída paralela e para baixo.
- Permitir maior fluxo e ordenhar no menor tempo possível.
- Retirar teteiras suavemente quando o fluxo do leite estiver abaixo de 0,5 kg por minuto.
- Permitir leite residual de no máximo 400 g por vaca.
- Desinfetar os tetos (“post dipping”) logo após o processo de ordenha cobrindo toda a superfície dos mesmos com a solução desinfetante.

2.4.4. Vacas em pé após a ordenha

A extremidade do teto é considerada a primeira linha de defesa contra a mastite visto ser a rota pela qual os patógenos invasores têm acesso à glândula mamária. O canal do teto possui músculos esfíncteres que mantêm um fechamento estreito entre ordenhas e evita a penetração bacteriana. Uma maior latência do esfíncter é diretamente associada à maior incidência de mastite (Sordillo e Streicher, 2002).

O canal do teto permanece dilatado durante até duas horas após a ordenha. Portanto, alimentar as vacas durante esse período faz com que elas se mantenham em pé, dando tempo ao músculo esfíncter de se fechar em volta do canal do teto, evitando a penetração bacteriana (Philpot e Nickerson, 2000).

2.4.5. Segregação e linha de ordenha

As teteiras representam uma grande fonte de transmissão de microrganismos contagiosos. A correta identificação de vacas infectadas e a ordenha desses animais após os animais sadios são de grande importância para a redução da transmissão de patógenos contagiosos. Ordenhar vacas infectadas com unidades de ordenha separadas também pode ser uma opção quando as condições do equipamento permitirem (Ruegg e Reinemann, 2002). A segregação de animais ou o uso de unidades de ordenha separadas durante dois anos reduziu a prevalência média de *S. aureus* nos rebanhos de 30 para 16% e a CCS do tanque de 600.000 para 345.000 cél / mL. Rebanhos que não segregaram não reduziram a prevalência de infecção durante esse período (Wilson et al. 1995).

Quando a identificação precisa de animais infectados via cultivos microbiológicos não for uma alternativa, a prática de uma adequada linha de ordenha embasada por análises mensais de CCS pode ser útil no controle da mastite contagiosa. Uma boa ordem para ordenha dos animais seria:

1. Primíparas.
2. Pluríparas no estágio inicial da lactação.
3. Pluríparas no estágio avançado da lactação.
4. Animais com mastite clínica.
5. Animais com CCS >250.000 crônica.

2.4.6. Terapia da mastite durante a lactação

A cura e a eliminação de infecções existentes é um aspecto fundamental do controle da mastite (Ruegg e Reinemann, 2002). A administração de antimicrobianos durante a lactação é essencial em muitas infecções clínicas ou subclínicas da glândula mamária, porém a sua utilização deve ser maximizada a fim de reduzir os custos e riscos inerentes a essa prática. A ausência de resíduos de antimicrobianos no leite comercializado é uma exigência legal e largamente adotada visando a proteção da saúde do público consumidor. De acordo com os dados do Departamento da Agricultura do Estado do Michigan (EUA), 90% dos casos de presença de resíduos inibitórios no leite comercializado estavam associados à terapia da mastite (Erskine et al., 2003). Nesses casos, perdas econômicas ao produtor são grandes e associadas ao descarte do leite, ressarcimento de outros volumes porventura misturados, e até mesmo, a desqualificação da propriedade para o fornecimento de leite. Além desses riscos, custos normais da administração de antimicrobianos durante a lactação envolvem os custos com o medicamento em si, o leite descartado e a mão de obra extra para administração e controle na propriedade.

Tratamento de casos subclínicos

A terapia antimicrobiana deve ser utilizada em casos de mastite subclínica em situações onde os custos associados ao tratamento serão compensados pelos ganhos compensatórios de produção e qualidade após a eliminação da infecção. Em casos de microrganismos contagiosos, a eliminação de infecções intramamárias também reduz o

reservatório de patógenos, diminuindo o risco de transmissão a vacas não infectadas (Erskine et al., 2003).

S. agalactiae são agentes não invasivos e o tratamento intramamário de vacas em lactação com infecções subclínicas geralmente resulta em taxas de cura elevadas (80 a 90%), aumentos de produção e redução significativa da CCS dos animais (Erskine, 2001). Dada a alta sensibilidade do diagnóstico microbiológico, a alta taxa de cura após o tratamento e os bons ganhos compensatórios de sua eliminação, a erradicação do *S. agalactiae* deve ser uma meta em rebanhos leiteiros. Para erradicação, todos os quatro quartos de todas as vacas com cultura positivas no rebanho devem ser tratados com produto intramamário comercial a base de penicilina. Vacas que ainda permanecerem com alta CCS após o tratamento deverão ser mantidas segregadas e ter o leite novamente coletado e submetido a cultivo após 30 dias, já que uma pequena parcela não estará curada. Juntamente à terapia antimicrobiana, uma rotina de ordenha eficiente, o uso do pós-dipping e da terapia vaca seca também são ferramentas essenciais para atingir a erradicação do *S. agalactiae* (Ruegg e Reinemann, 2002).

No lado oposto, *S. aureus* são agentes invasivos e geralmente causam infecções intramamárias com formação de abscessos profundos. São ainda agentes comumente resistentes a antimicrobianos (especialmente β -lactâmicos) e sobrevivem no meio intracelular após fagocitose, local de baixa concentração de antimicrobianos. Portanto, a eliminação de infecções intramamárias de *S. aureus* pelo tratamento com antibióticos durante a lactação geralmente é de baixa eficácia (Erskine et al., 2003). Aumento significativo nas taxas de cura tem sido conseguido com o uso de terapia intramamária estendida, associação de terapia sistêmica e/ou vacinação. Estratégias a serem utilizadas em casos especiais onde animais de alto valor genético estejam envolvidos ou mesmo em casos de infecções recentes e em vacas mais jovens com maiores possibilidades de retorno durante a vida produtiva (Tabela 10). Nesses casos, grande atenção deve ser dada ao correto diagnóstico de cura pós-tratamento visto a baixa sensibilidade dos cultivos microbiológicos, especialmente após tratamentos antimicrobianos onde períodos refratários de até 28 dias foram relatados (Newbold, 1974).

Tabela 10. Taxa de cura de infecções intramamárias de *Staphylococcus aureus* mediante diferentes tratamentos durante a lactação.

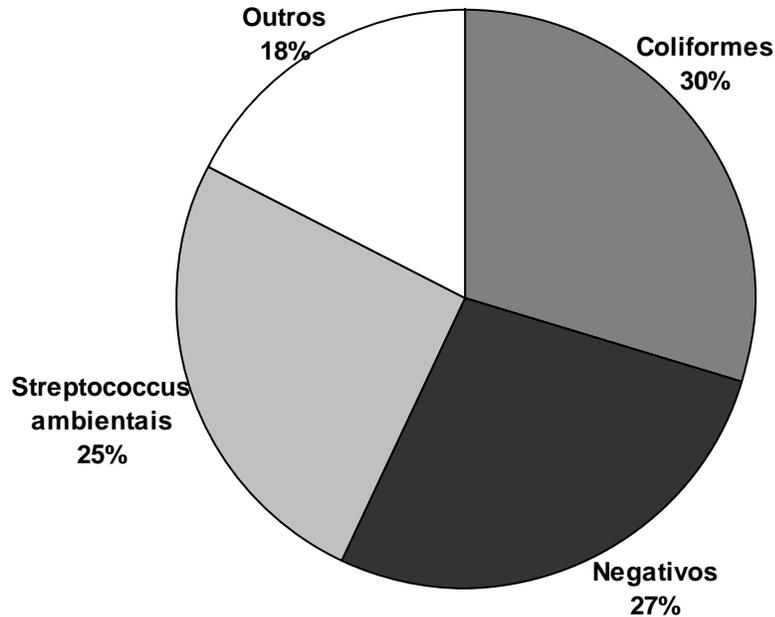
Tratamento	Taxa de cura, %	Pesquisadores
Pirlimicina IMM (Bula)	26	Costa et al., 2000
Pirlimicina IMM Prolongada (8x)	51	
Amoxicilina IMM	25	Owens et al., 1988
Amox. IMM + Penicilina Parenteral	51	
Antibiótico IMM	17	Sears, 1999
Antibiótico IMM + Vacina autógena	36	

IMM = intramamário.

Tratamento de casos clínicos

Os coliformes e os *Streptococcus* ambientais (não agalactiae) são os principais responsáveis pela ocorrência de casos clínicos em rebanhos bem manejados. Hogan et al. (1989) relataram a prevalência de diagnósticos microbiológicos em casos clínicos de mastite em nove rebanhos leiteiros (Figura 16). Nesses rebanhos, somente 3,4% dos casos clínicos foram causados por microrganismos contagiosos e 96,6% tiveram origem ambiental. Esse quadro pode ser diferente em rebanhos com alta prevalência de agentes contagiosos onde a infecção crônica favorece a ocorrência de casos esporádicos e reincidentes e que podem representar parcela considerável dos casos clínicos do rebanho (Hillerton e Berry, 2003).

Figura 16. Prevalência de diagnósticos microbiológicos de casos clínicos de mastite em nove rebanhos bem manejados.*



Streptococcus ambientais = *Streptococcus* não agalactiae.

*Adaptado de: Hogan et al., 1989.

“Muitos casos de cultivo negativos devem ter sido causados por infecções de curta duração por coliformes. No entanto, não existem provas absolutas (Hogan et al., 1989)”.

Não existe um protocolo de tratamento de casos clínicos que possa ser recomendado para todas as fazendas. Em cada situação existem peculiaridades que devem ser pesquisadas e ponderadas pelos criadores e profissionais responsáveis a fim de traçar a melhor estratégia de tratamento. Diferentes agentes etiológicos evocam diferentes condutas de tratamento, mas a necessidade de uma rápida tomada de decisão em casos clínicos geralmente precede o resultado do diagnóstico microbiológico. Obter dados de cultivos de casos clínicos, no entanto, é fundamental para a formação de um histórico da fazenda, e juntamente com definições da severidade do caso no momento do diagnóstico subsidiar as pessoas responsáveis na definição das melhores estratégias de tratamento a serem adotadas. De acordo com a severidade, casos clínicos de mastite devem ser classificados em três níveis (Sears e McCarthy, 2003) (Tabela 11).

Tabela 11. Classificação da mastite clínica quanto a severidade dos casos.

Classificação da mastite	Local de alteração clínica		
	Leite	Glândula	Sistêmico
Grau 1	+	-	-
Grau 2	+	+	-
Grau 3	+	+	+

+ = alteração presente; - = alteração ausente.

O objetivo da terapia antimicrobiana é de atingir concentrações efetivas da droga no local de infecção. Na mastite bovina, a consideração de três compartimentos farmacológicos é fundamental para orientar a formulação de estratégias de tratamento: (1) o leite e o tecido epitelial superficial dos ductos e alvéolos; (2) o tecido profundo da glândula; (3) a vaca (Erskine et al., 2003). Agentes não invasivos e que habitam somente o primeiro compartimento como *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus coagulase* negativos geralmente são eliminados através do uso de medicamentos por via intramamária. Patógenos invasivos como *S. aureus* e *S. uberis* geralmente exigem administrações intramamárias por maiores períodos e concentrações associadas ou não a tratamentos sistêmicos a fim de atingirem o segundo compartimento, o tecido profundo da glândula. A bacteremia pode ocorrer como uma consequência de mastite por coliformes e o compartimento alvo de casos severos causados por esses agentes deve ser o terceiro compartimento, a vaca, sendo atingido via administração sistêmica de antimicrobianos (Erskine et al., 2003) (Tabela 12).

Tabela 12. Resumo do modelo de três compartimentos alvos para patógenos da mastite.*

Patógeno da mastite	Compartimento farmacológico		
	Leite e ductos	Parênquima	Vaca
<i>Streptococcus agalactiae</i>	+++	-	-
<i>Streptococcus</i> sp.	+++	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+++	-
<i>Staphylococcus</i> sp.	+++	-	-
Coliformes ^a	+	-	+++
Mycoplasmata e outros Gram-negativos ^a	-	-	+++

^aMastite clínica severa. Tratamento de suporte e prevenção de bacteremia secundária são as preocupações primárias.

+++ = alvo primário; + = algum benefício; - = pouco valor.

*Fonte: Erskine et al., 2003.

Tratamento de casos moderados de mastite clínica

O tratamento de casos moderados de mastite (leite visualmente anormal com ou sem inflamação local do quarto afetado e sem sintomas sistêmicos; grau 1 ou 2), diferentemente dos casos severos, é uma decisão terapêutica mais voluntária (Erskine, 2003). No entanto, a mensuração da eficiência do tratamento de casos clínicos deve levar em consideração não somente a cura clínica, mas também a cura bacteriológica. Definições de tratamentos baseadas somente no encerramento dos sintomas clínicos da doença podem subestimar os efeitos de uma baixa cura bacteriológica e causar ainda mais prejuízos ao rebanho via permanência de infecções crônicas, recidivas, aumento da CCS do tanque e dos custos associados ao tratamento de casos crônicos. Isso é particularmente verdade em infecções causadas por *Streptococcus* ambientais. Pesquisadores relataram menores taxas de cura bacteriológica em relação à cura clínica de infecções de *Streptococcus* ambientais com adoção de protocolos de tratamentos sem a inclusão de antimicrobianos (Chamings, 1984 e Guterbock et al., 1993) (Tabela 13). Após a adoção de um protocolo de não utilização de antibióticos em casos de mastite clínica, Cattel (1996) relatou aumento agudo na incidência de casos clínicos e na prevalência de infecções intramamárias e aumento subsequente na CCS do rebanho associado com infecções intramamárias de *Streptococcus uberis*.

Outro fator também importante na definição de protocolos de tratamentos para *Streptococcus* ambientais é a baixa taxa de cura de infecções submetidas a tratamentos por curtos períodos com antibióticos (conforme indicado pela bula) em relação àquelas submetidas à terapia prolongada (Hillerton et al., 2002) (Tabela 13). Relativo à rota de administração do antimicrobiano, não houve vantagem na combinação do tratamento intramamário e parenteral, e o tratamento parenteral sozinho teve a mesma eficácia do tratamento intramamário em infecções de *S. uberis*. No entanto, a rota intramamária foi vantajosa por utilizar menor quantidade de antibiótico para atingir o mesmo efeito (Hillerton e Kliem, 2002) (Tabela 13). A resistência dos *Streptococcus* à penicilina G parece ter mudado pouco em 40 anos e, portanto continuam sendo as drogas de escolha para o tratamento de casos de mastite clínica. Enterococci são geralmente mais

resistentes, mas penicilinas sintéticas continuam altamente eficazes no tratamento da mastite (Rossito et al., 2002).

Casos moderados de mastite clínica causados por coliformes têm maior taxa de cura espontânea do que os casos de *Streptococcus* sp. Nas infecções por coliformes cura espontânea e terapêuticas são similares (Erskine et al., 2003) e, em uma parcela considerável dos casos, os coliformes foram eliminados da glândula nas primeiras 12 horas após a infecção (Erskine et al, 2002). Portanto, o uso de antimicrobianos pode ser evitado em casos moderados de mastite tanto nas infecções por coliformes quanto naquelas com cultivos negativos. Wilson et al. (1999) determinaram que a terapia intramamária não apresentou benefícios para os casos de mastite clínica ocasionados pela maioria dos patógenos, com exceção dos *Streptococcus* sp. Guterbock et al. (1993) relataram não haver diferenças nas taxas de cura clínica ou bacteriológica de casos clínicos causados por coliformes submetidos ou não à antibioticoterapia em três fazendas na Califórnia.

Tabela 13. Taxas de cura de mastite clínica causada por *Streptococcus* ambientais.*

Espécies	Cura Clínica, %	Cura Bacteriológica, %	Tratamento	Referência
Casos a campo				
<i>Streptococcus</i> não agalactiae	53-70	46-73	IMM (Bula)	1
	61	48	Ocitocina	
<i>Streptococcus uberis</i>	87	19	Nenhum	2
<i>Streptococcus uberis</i>	-	62	Parenteral	3
<i>Streptococcus uberis</i>	-	65	IMM	4
Casos experimentais				
<i>Streptococcus uberis</i>	0	0	Nenhum	5
	27	27	IMM (Bula)	
	100	80	IMM Prolongado	
	18	0	Parenteral Bula	
	91	80	Parent. Prolongado	
	61	61	IMM e Parenteral	
	100	72	IMM e Parent. Prolongado	
	0	0	Ocitocina	

IMM = intramamário; Parent. = parenteral

Referências: 1, Guterbock et al. (1993); 2, Chamings (1984); 3, Pyorala e Pyorala (1998); 4, Hillerton et al. (1995); 5, Hillerton et al. (2002)

* Adaptado de: Hillerton e Berry, 2003.

Infecções por coliformes ou com cultivos negativos são responsáveis por parcela considerável dos casos clínicos (>50% em alguns rebanhos). A opção de não utilização de antibióticos em casos onde não haja comprometimento sistêmico é, pelo menos, tentadora. A adoção dessa estratégia levaria a grandes economias tanto no gasto de medicamentos, mas principalmente, no volume de leite descartado na fazenda. O não uso de antibióticos em casos por coliformes ou de cultivos negativos, no entanto, só deve ser feita mediante a presença de um diagnóstico microbiológico rápido e que gere subsídios para a tomada de decisões rotineira nas fazendas. Isso é uma realidade distante para a maioria das fazendas visto o grande tempo gasto na coleta, conservação, envio e processamento em laboratórios microbiológicos. O não tratamento da mastite clínica moderada nessas propriedades pode levar a prejuízos que superem muito os benefícios dessa prática. Casos clínicos por *Streptococcus* sp. demandam o uso de antibióticos e agentes contagiosos como *S. agalactiae* e *S. aureus* podem disseminar no rebanho com maior velocidade caso não sejam eliminados ou pelo menos controlados durante os episódios clínicos. Se cultivo microbiológico rápido é realidade na fazenda, casos clínicos moderados podem esperar o resultado microbiológico por 24 horas e então iniciar o tratamento adequado sem interferência no resultado (Morales et al., 2001). Além do uso de equipamentos específicos e pessoal treinado para a condução de um diagnóstico microbiológico padrão, técnicas alternativas rápidas e mais simples como o uso dos Petrifilm[®] (3M, Minneapolis, EUA) podem permitir que um maior número de fazendas compartilhem esses benefícios no futuro.

Em casos clínicos moderados por *S. aureus*, terapia com antibióticos pode ser eficiente em reduzir os sinais clínicos e razoavelmente eficaz em novilhas e em infecções recentes. No entanto, infecções crônicas não respondem bem (Sears e McCarthy, 2003). Em casos clínicos moderados causados por outros agentes Gram-negativos ou por algas, fungos, leveduras ou micoplasmas, terapia com antibióticos também não é eficaz e frascos com antibióticos de doses múltiplas devem ser sempre suspeita como fonte de contaminação (Philpot e Nickerson, 2000).

Tratamento de casos severos de mastite clínica

Os coliformes são a causa mais comum de mastite clínica com comprometimento sistêmico dos animais (grau 3). Portanto, o alvo primário no tratamento de casos severos de mastite deve ser os coliformes, com considerações secundárias a outros agentes etiológicos (Erskine et al., 2003).

Em infecções causadas por coliformes, o pico bacteriano é rápido seguido também por um rápido declínio após o recrutamento de polimorfonucleares. Muitas das mudanças inflamatórias e sistêmicas observadas durante o curso da mastite aguda por coliformes são resultado da liberação de endotoxina lipopolissacarídea (LPS) das bactérias. O LPS é liberado após a morte das bactérias pela ação dos polimorfonucleares no processo de fagocitose (Riollet et al., 2000). Geralmente, o reconhecimento da mastite por coliformes se dá após o pico bacteriano, portanto a liberação máxima de LPS não pode mais ser evitada. Assim sendo, o enfoque terapêutico primário nesses casos deve ser o tratamento do choque tóxico induzido pelas endotoxinas com a administração de fluidos e outra terapias de suporte (Erskine et al., 2003).

O curso de mastites agudas por coliformes não é alterado pelo tratamento com antibióticos intramamários, porém estes ainda devem ser administrados em casos severos de mastite clínica por ocasionar benefícios naqueles casos onde as infecções por cocos Gram-positivos são as responsáveis (Erskine et al., 2003). Erskine et al. (1992) testaram a utilização de gentamicina intramamária em mastite experimental por *Escherichia coli*. Não houve efeito do tratamento na diminuição do pico bacteriano, da duração da infecção, da CCS convalescente ou da temperatura retal dos animais.

Em estudos com infecções naturais, a bacteremia ocorreu em mais de 40% dos casos severos de mastite por coliformes (Cebra et al., 1996, Wenz et al., 2001,). Esse fato justifica o foco da terapia antimicrobiana que deve ser voltado para o compartimento “vaca” através da escolha de antibióticos de boa eficácia contra os agentes Gram-negativos. O uso de oxitetracilina endovenosa (Morinet al., 1988) e Ceftiofur

intramuscular (Erskine et al., 2002) melhoraram o prognóstico clínico em casos severos de mastite por coliformes.

2.4.7. Manejo da vaca seca para o controle da mastite

Um dos principais fatores que influencia na ocorrência de casos clínicos na lactação é a infecção intramamária que se desenvolve ou persiste no período seco que a antecede. Neave et al. (1950) demonstraram que a taxa de novas infecções intramamárias foi seis vezes mais alta nas primeiras três semanas do período seco se comparado à lactação anterior. Além disso, Todhunter et al. (1995) demonstraram que 55% das infecções por *Streptococcus* ambientais adquiridas no início do período seco persistiram na próxima lactação. Bradley e Green (2000) sugeriram que 52% de todos os casos de mastite clínica por coliformes nos 100 primeiros dias de lactação podem ter se originados no período seco. A necessidade de adoção de boas práticas de manejo no período seco é, portanto justificada, visto a grande importância das infecções intramamárias que se desenvolvem ou persistem nesse período e o grande impacto sobre a saúde da glândula mamária em geral.

No período seco, as duas semanas pós-secagem e as duas semanas pré-parto são os momentos críticos para a aquisição de novas infecções intramamárias (Philpot e Nickerson, 2000). Vários são os fatores que influenciam na susceptibilidade das vacas ou dos quartos mamários na aquisição de novas infecções intramamárias durante esses períodos.

Logo após a secagem, com a interrupção da extração do leite, procedimentos de desinfecção dos tetos (“pre e post dipping”) também são extintos e a carga bacteriana nos tetos é aumentada. Com a estase do leite, ocorre um aumento da pressão interna e possível extravasamento de leite da glândula. De acordo com Comalli et al. (1984), o canal do teto dilata entre 0 e 7 dias pós-secagem e então constringe entre 7 e 16 dias. Além disso, a formação do tampão de queratina com propriedades bacteriostáticas e que oclui fisicamente o canal do teto pode levar vários dias. Dingwell (2002) demonstrou que

aproximadamente 50% dos tetos se apresentavam fechados aos 7 dias pós-secagem, mas após seis semanas, 23% dos tetos ainda foram classificados como abertos. Nesse mesmo estudo, quartos que fecharam durante o período seco foram 1,8 vezes menos sujeitos a desenvolver novas infecções intramamárias se comparados a quartos que permaneceram abertos. Esses são, portanto alguns dos motivos da fase inicial do período seco ser considerada fundamental para o controle da mastite.

Com a aproximação do parto, a secreção de colostro é iniciada e a pressão intramamária aumenta. Ocorre então dilatação do canal do teto, perda do tampão de queratina e extravasamento da secreção, justificando a maior susceptibilidade da glândula nesse período. Além disso, uma série de fatores imunológicos está alterada na vaca no período peri-parto. As defesas celulares são importantes em combater agentes que porventura sobrepassassem as defesas estruturais da glândula mamária, e nesse período, as funções de defesa dos neutrófilos, macrófagos e linfócitos se encontram modificadas ou reduzidas (Sordillo e Streicher, 2002). Os efeitos do stress associados à gestação e ao parto mediados via síntese de hormônios estressores como os corticosteróides podem explicar parte da inabilidade imunológica nesse período (Waller, 2000).

Dados todos esses fatores que acarretam maior susceptibilidade da vaca nos momentos críticos do período seco, a manutenção de um ambiente propício, limpo e seco, para animais que se encontram nessas fases é óbvia e de grande importância. Além disso, a adoção de práticas que visem a redução das taxas de novas infecções é fundamental e serão discutidas.

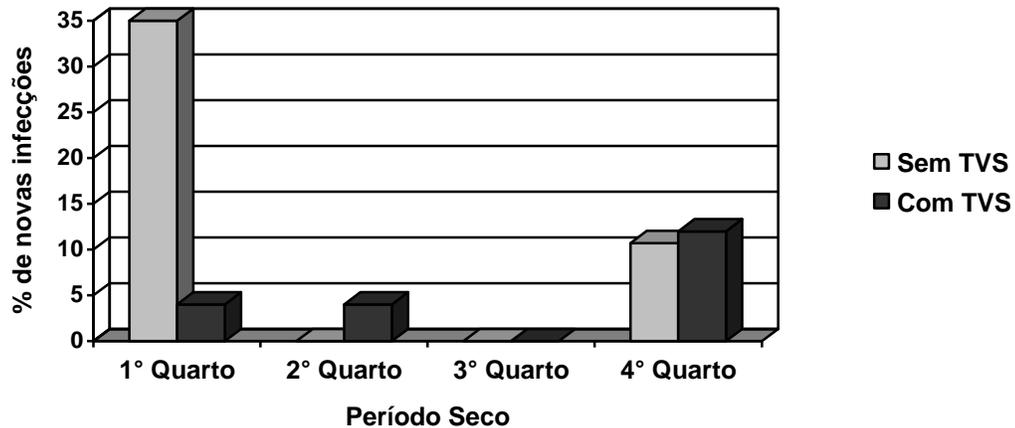
Terapia Vaca Seca (TVS)

A administração intramamária de formulações com antibióticos para vacas secas ao término da lactação é o mecanismo mais eficaz de eliminar infecções existentes e prevenir novas (Eberhart, 1986). Os benefícios da TVS são muitos e incluem redução da CCS, da incidência de mastite clínica e aumento da produção de leite na próxima lactação (Dingwell et al., 2003).

Considerando a mastite contagiosa, o período seco precedido pela TVS constitui momento único para a eliminação de infecções crônicas e redução significativa desses agentes no rebanho. A TVS é altamente eficaz contra *S. agalactiae* mas taxas de cura de *S. aureus* são menores e mais variáveis com relatos de 20 a 85% de cura (Oliver e Smith, 1982, Browning et al., 1990, Sol et al., 1994). A associação de antibiótico sistêmico (oxitetraciclina), aos 7, 8, 9 e 10 dias após a secagem, não aumentou a taxa de cura para *S. aureus* se comparada à TVS isolada (Erskine et al., 1994). Infusões intramamárias extras aos 7 e 14 dias após a secagem também não ofereceram nenhuma vantagem se comparadas ao tratamento único (Cummins e McCaskey, 1987).

Em relação aos agentes ambientais, novas infecções por *Streptococcus* ambientais são significativamente reduzidas ao início do período seco, mas os efeitos em infecções por coliformes ou em infecções no período pré-parto são praticamente inexistentes (Smith et al., 1985a, Todhunter et al., 1995) (Figura 17). Alguns motivos para isso são que as formulações contendo antibióticos não persistem até o período pré-parto e não são, geralmente, formuladas tendo como alvo os agentes Gram-negativos (Dingwell RT et al., 2003). Grande cuidado deve ser exigido no momento da infusão do medicamento através do canal do teto, pois em condições não assépticas, agentes ambientais resistentes a antibióticos podem ser inadvertidamente lançados através do canal do teto (Smith e Hogan, 1993).

Figura 17. Efeito da terapia de vaca seca nas novas infecções de *Streptococcus* ambientais da glândula mamária durante o período seco.



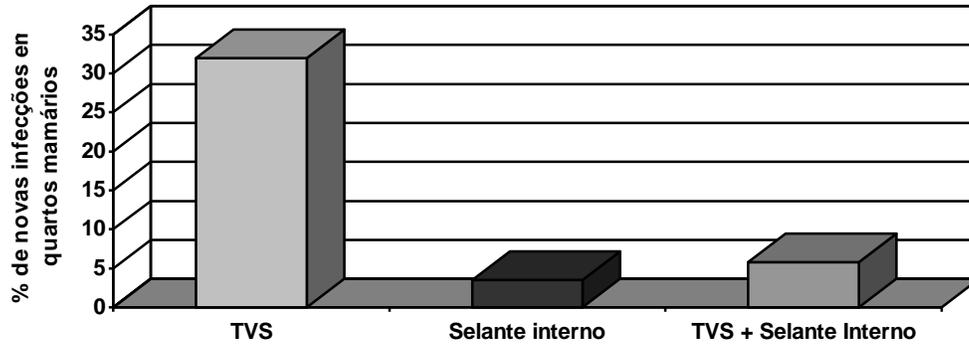
TVS = terapia vaca seca (antibiótico intramamário)

*Adaptado de: Smith et al. (1985a).

Selantes

Selantes internos ou externos dos tetos também podem ser utilizados para aumentar a proteção da glândula mamária contra patógenos invasores durante o período seco. Selantes internos são compostos por sal inorgânico pesado, geralmente nitrato de bismuto, em uma base de cera de parafina (Meaney, 1977). São aplicados e permanecem somente no canal e cisterna do teto e têm como objetivo impedir novas infecções, não atuando em infecções pré-existentes. Vários trabalhos comprovaram a eficácia de selantes internos na prevenção de novas infecções durante o período seco e podem ser uma ferramenta interessante em circunstâncias onde a situação do ambiente não pode ser controlada e favorece a contaminação dos tetos (Meaney, 1977, Woolford et al., 1998, Huxley et al., 2002) (Figura 18). Infelizmente esses produtos ainda não são disponíveis comercialmente no Brasil.

Figura 18. Eficácia do uso de selante interno dos tetos na prevenção de novas infecções intramamárias durante o período seco.



TVS = terapia vaca seca (antibiótico intramamário)

*Adaptado de: Meaney WJ, 1977.

Selantes externos são geralmente constituídos por um filme de acrílico látex e são aplicados cobrindo a superfície externa dos tetos sendo, portanto menos invasivos que os selantes internos (Dingwell et al., 2003). Resultados conflitantes têm sido relatados no que diz respeito à eficácia da utilização desses produtos na prevenção de novas infecções (Mathews et al. 1988, McArthur et al., 1984, Timms, 2001). Uma preocupação clara diz respeito à falta de aderência dos selantes no teto e pequeno prazo de permanência e ação (Farnsworth et al., 1980).

2.4.8. Status imunológico dos animais

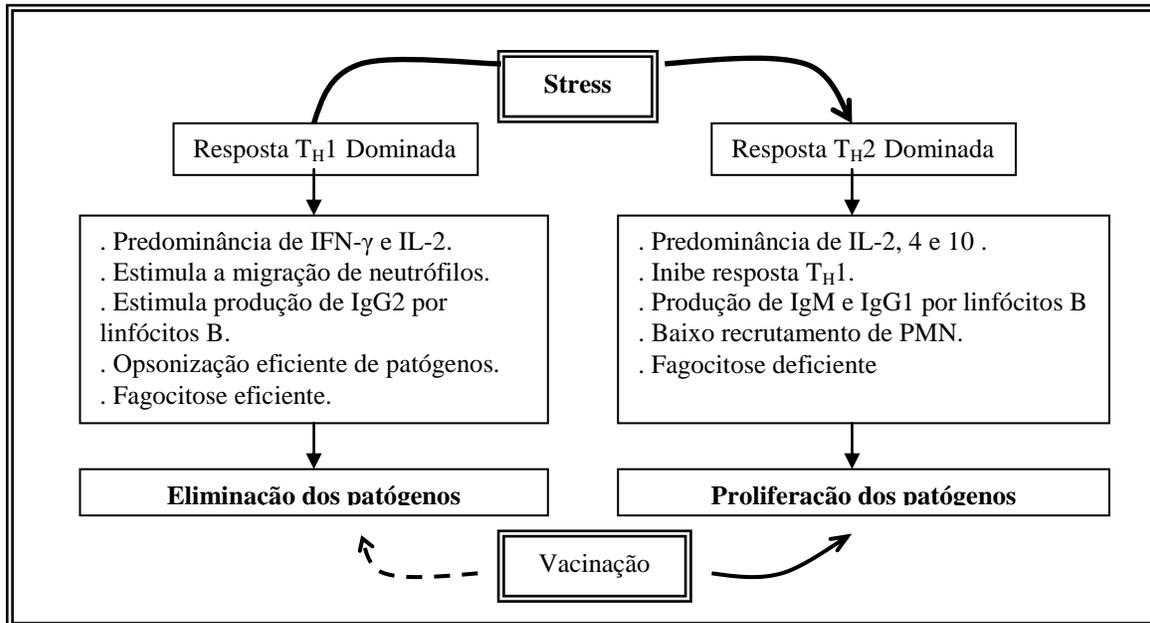
A efetiva redução de fatores estressantes, um correto aporte nutricional com suplementações adequadas de vitaminas e minerais e vacinações são fatores que contribuem para melhoria do status imunológico dos animais e auxiliam no combate à mastite.

Redução do stress

Situações estressantes estão normalmente presentes nas rotinas dos animais e devem ser controladas ou reduzidas. Vacas devem ser instaladas confortavelmente, manejadas de forma tranqüila, supridas adequadamente de sombra e água e alimentadas em horários rotineiros. O stress térmico é uma realidade constante em países tropicais como o Brasil, e a sua redução deve ser uma preocupação primária em sistemas intensivos de produção de leite.

O stress prejudica de diversas maneiras o sistema imunológico dos animais. Uma resposta imune normalmente eficaz contra patógenos invasores da glândula mamária é chamada de T_H1 por envolver a ativação desses linfócitos ($T_H1-CD4+$), secreção de altos níveis de $IFN-\gamma$ com conseqüente produção de anticorpos IgG2 pelos linfócitos B e recrutamento maciço de neutrófilos para a glândula mamária. Esta via leva geralmente a uma eficiente opsonização e fagocitose dos patógenos invasores e eliminação do agente. Quando a fisiologia de uma vaca é modificada a ponto de uma resposta estressante com significativa produção de cortisol pelas glândulas adrenais, a resposta imune desencadeada pode ser do tipo T_H2 . Respostas inflamatórias dominadas por linfócitos T_H2 e secreção de IL-4 e IL-10 geralmente desencadeiam a produção de anticorpos IgM e IgG-1 e menor recrutamento de polimorfonucleares para glândula com significativa perda de eficiência na eliminação de agentes invasores (Burton e Erskine, 2003) (Figura 19). Esse é o tipo de resposta predominante em vacas no período peri-parto.

Figura 19. Padrões de resposta imune em consequência à invasão da glândula mamária.*



*Adaptado de: Burton e Erskine, 2003.

Suplementação adequada de minerais e vitaminas

Alguns minerais e vitaminas têm importantes papéis na resposta imune dos animais, seja por uma ação direta, seja por fazerem parte da constituição de determinadas enzimas chave nesse processo. Estratégias alimentares devem ser implementadas para assegurar que todas as vacas e novilhas recebam quantidades suficientes de todos os minerais e vitaminas requeridas. Atenção especial tem sido dada ao fornecimento de níveis elevados de vitamina E e selênio e sua influência na incidência da mastite.

Vacinação

Vacinas são desenvolvidas e administradas com o intuito de que uma imunização efetiva advenha e infecções sejam prevenidas ou eliminadas. Uma imunização efetiva para mastite é difícil devido à natureza do leite e da glândula mamária. O volume de leite presente na glândula dilui o número de células de defesa disponíveis para combater a

infecção e componentes do leite como a gordura e a caseína reduzem a capacidade bactericida dessas células (Yancey, 1993). Além disso, a vaca está constantemente exposta a diversos microrganismos capazes de invadir a glândula e o leite é um excelente substrato para a multiplicação bacteriana (Ruegg, 2002). Não bastasse isso, assim como na interferência do stress, as formas de respostas imunológicas a vacinas podem ser bastante variadas e uma condução a uma resposta eficiente é fundamental para eficácia da vacina (Burton e Erskine, 2003) (Figura 19). Portanto, o desenvolvimento e produção de vacinas para mastite podem envolver técnicas bastante criteriosas e complexas, fundamentais para sua eficácia.

Vacinas contra *S. aureus* têm sido testadas a diversos anos. Vários fatores de virulência como proteína A (Pankey et al., 1985) e fator de aglomeração A (clumping factor A) (Brouillette, et al. 2001) foram testados, mas os melhores resultados têm sido com a utilização de vacinas com cepas portadoras de pseudocápsula (Sears, 2003, Nickerson et al., 1993). A pseudocápsula é uma fina camada que envolve a bactéria, tornando-as inacessíveis a neutrófilos e inibindo a fagocitose (Sears e McCarthy, 2003).

Temperatura de cultivo, nível de agitação e meio de cultivo são alguns dos fatores que influenciam na produção de pseudocápsula por cepas de *S. aureus* e, portanto demandam condições específicas e complexas para serem desenvolvidas com eficiência (Watson, 1988). Níveis aumentados de IgG₂ anti-pseudocápsula foram relatados no soro de vacas vacinadas (Nordhaugh et al., 1994). IgG₂ é a classe de imunoglobulinas mais eficaz na opsonização de bactérias invasoras da glândula mamária e, portanto fundamentais para uma eficiente fagocitose dos agentes invasores (Sordillo e Streicher, 2002). Vacinas com pseudocápsula têm demonstrado eficácia em curar infecções após desafio experimental ou em eliminar infecções naturalmente existentes (Pankey et al., 1985, Hwang et al., 2000). Vacinas também demonstraram serem eficientes na diminuição dos sintomas clínicos ou subclínicos da infecção em primíparas (Nordhoug et al., 1994). Relativo a vacinação de novilhas, Nickerson et al. (1999) relataram menores prevalências de infecções de *S. aureus* ao parto. Em geral, dados comprovam aumento na

taxa de cura espontânea e diminuição da severidade da doença, mas a prevenção de novas infecções geralmente não é encontrada.

Vacinas contra coliformes têm demonstrado eficácia e têm sido largamente utilizadas em diversos países (Wilson e González, 2003). A amostra mutante rugosa J5 (*Escherichia coli* O111:B4) tem sido a mais amplamente adotada na fabricação dessas vacinas. A vacinação geralmente não reduz a prevalência ou a incidência de infecções por coliformes, mas eficientemente reduz os sintomas da doença e previne o aparecimento de casos clínicos de mastite (González et al., 1989, Cullor, 1991, Hogan et al., 1991). Os mecanismos de imunização eficaz de vacinas J5 contra bactérias Gram-negativas em geral relacionam ao fato de que todas essas bactérias possuem em sua constituição lipopolissacarídeos (LPS) na superfície externa da parede celular (Quin et al., 1994). LPS são constituídos externamente por uma cadeia denominada “O”, de perosaminas, uma porção intermediária chamada de centro ou núcleo constituída por polissacarídeos e uma porção interna, o lipídeo A. Amostras rugosas geralmente não possuem a camada “O” externa e, portanto apresentam a porção central e o lipídeo A do LPS mais expostas. Respostas imunes advindas da exposição à porção central e ao lipídeo A do LPS são geralmente mais eficazes pois a cadeia “O” é bastante variável entre espécies de Gram-negativos, porém o lipídeo A é geralmente similar (Gyles e Thoen, 1993). Três vacinações têm sido recomendadas para uma melhor eficiência. González et al. (1996) demonstraram redução de 93% na ocorrência de casos clínicos de mastite por coliforme com vacinações feitas na secagem, 30 dias após e 1 a 7 dias pós parto. No entanto, estudos recentes têm sugerido que um maior número de vacinações (pelo menos 5) podem aumentar a eficiência (Burton et al., 2002).

Tentativas recentes têm sido feitas com o intuito de incluir novos fatores de virulência de *Streptococcus* sp em vacinas (Potter, 2002). No entanto, em geral vacinas contra *Streptococcus* sp não têm demonstrado grande eficácia no controle da mastite. O principal motivo está no fato de existir uma grande variação dos fatores de virulência entre espécies ou mesmo entre cepas da mesma espécie (Finch et al., 1994, Hill et al., 1997).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA RA; OLIVER SP. Antiphagocytic effect of the capsule of *Streptococcus uberis*. *Zentralbl. Veterinarmed*, v.40, p.707-710, 1993.

ANDERSON JC. Mechanisms of staphylococcal virulence in relation to bovine mastitis. *Br Vet J*, v.132, p. 229-245, 1976.

BARTLETT PC; VAN WIJK J; WILSON DJ et al. Temporal patterns of lost milk production following clinical mastitis in a large dairy herd. *J. Dairy Sci*, v.74, p.1561-1572, 1991.

BRADLEY AJ; GREEN MJ. A study of the incidence and significance of intramammary enterobacterial infections acquired during the dry period. *J Dairy Sci*, v. 83, p. 1957-1965, 2000.

BRAMLEY AJ. Environmental mastitis. In: NMC INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BOVINE MASTITIS, 1990, Indianápolis. Proceedings of AABP. Indianapolis, IN. p. 158-170, 1990.

BRAMLEY AJ; DODD FH. Reviews of the progress of dairy science: mastitis control, progress and prospects. *J Dairy Res*, v.51, p.481-512, 1984.

BRAMLEY AJ; KINGS JS; HIGGS TM. The isolation of *Streptococcus uberis* from cows in two dairy herds. *Br Vet J*, v.135, p. 262-270. 1989.

BROUILLETTE E; SHKRETA L.; LACASSE P et al. DNA vaccination of mice against *Staphylococcus aureus* clumping factor A. In: PROC SECOND INTL MAST MILK QUALITY SYMP. p. 48-52, 2001.

BROWNING JW; MEIN GA; BARTON M et al. Effects of antibiotic therapy at drying off on mastitis in the dry period and early lactation. *Aust Vet J*, 67, p.440-442, 1990.

BURTON JL; CHAIYOTWITTAYAKUN A; SMITH KL et al. Novel applications for coliform vaccine programs. In: PROCEEDINGS OF THE 41ST ANNUAL MEETING OF THE NATIONAL MASTITIS COUNCIL, Orlando, FL. p. 89-110, 2002.

BURTON JL; ERSKINE RJ. Immunity and mastitis: some new ideas for an old disease. *Vet Clin Food Anim*, v19, p. 1-45, 2003.

CATTEL MB. An outbreak of *Streptococcus uberis* as a consequence of adopting a protocol of no antibiotic therapy for clinical mastitis. In: PROCEEDINGS OF THE 35TH ANNUAL MEETING OF THE NATIONAL MASTITIS COUNCIL, Nashville, TN. p. 123-130, 1996.

CEBRA CK; GARY FB; DINSMORE RP. Naturally occurring acute coliform mastitis in Holstein cattle. *J Vet Int Med*, v.10, p. 252-257, 1996.

CERQUEIRA MMOP; NEVES MVO; GUEDES L et al. Parâmetros físico-químicos e contagem de células somáticas de leite cru individual do estado de Minas Gerais. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 59, n. 339, p. 239-242, 2004.

CHAMINGS RJ. The effect of not treating mild cases of clinical mastitis in a dairy herd. *Vet Rec*, v. 115, p. 499-500, 1984.

COMALLI MP; EBERHART RJ; GRIEL LC JR, et al. Changes in the microscopic anatomy of the bovine teat canal during mammary involution. *Am J Vet Res* v.45, p.2236-2242, 1984.

CONSTABLE PD; MORIN DE. Treatment of clinical mastitis using antimicrobial susceptibility profiles for treatment decisions. *Vet Clin Food Anim*, v.19, p. 139-155, 2003.

COSTA EO; BENITES NR; GUERRA JL et al. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* spp. Isolated from mammary parenchymas of slaughtered dairy cows. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, v.47, n.2, p. 99-103, 2000.

CULLOR Js. The *Escherichia coli* J5 vaccine: investigating a new tool to combat mastitis. *Vet Med*, v.86, n.8, p. 836-844, 1991.

CUUMMINS, K.A.; MCCASKEY, T.A. Multiple infusions of cloxacilin for treatment of mastitis during the dry period. *J Dairy Sci*, v.70, p. 2658-2665, 1987.

DINGWELL RT; KELTON DF; LESLIE KE. Management of the dry cow in control of peripartum disease and mastitis. *Vet Clin Food Anim*, v.19, 235-265, 2003.

DINGWELL RT. Management strategies for the prevention and elimination of intramammary infections in non-lactating dairy cows (Tese de doutorado). Guelph, Ontario. Universidade de Guelph. 2002.

DINSMORE RP; ENGLISH PB; GONZALEZ RH et al. Evaluation of methods for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae* intramammary infections in dairy cattle. *J Dairy Sci*, v.74, p. 1521-1526, 1991.

ERSKINE, R.J.; BARTLETT P.C.; CRAWSHAW, P.C. Efficacy of intramuscular oxytetracycline as a dry cow treatment for *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci*, v.77, p. 3347-3353, 1994.

EBERHART RJ. Management of dry cows to reduce mastitis. *J Dairy Sci*, v.69, p. 1721-1732, 1986.

ERSKYNE RJ; EBERHART R; SPENCER S. Incidence and types of clinical mastitis in dairy herds with high and low SCC counts. *J Am Vet Med Assoc*, v.192, p.761-765, 1988.

ERSKINE RJ. Mastitis Control in Dairy Herds. In: Herd Health: food animal production medicine. Cap. 10. 3a ed. WB Saunders, Philadelphia. 2001.

ERSKINE RJ; WAGNER S; DEGRAVES FJ. Mastitis therapy and pharmacology. *Vet Clin Food Anim*, v.19, p. 109-138, 2003.

ERSKINE RJ; WILSON RC; RIDDELL MG et al. Intramammary gentamicin as a therapy for experimental *Escherichia coli* mastitis. *J Am Vet Med Assoc*, v.53, p. 375-381, 1992.

ERSKINE RS; BARLETT PC; VAN LENTA J et al. Efficacy of systemic ceftiofur as a therapy for severe clinical mastitis in dairy cattle. *J Dairy Sci*, v.85, p. 2571-2575, 2002.

FANG W; OLIVER SP. Identification of lactoferrin-binding proteins in bovine mastitis-causing *Streptococcus uberis*. *FEMS Microbiol Lett*, v.176, p. 91-95, 1999.

FARNSWORTH RJ; JOHNSON D; ANDERSON J. Analysis of bulk tank milk to determine the bacterial flow of the mammary gland of lactating cows in a dairy herd. *Bovine Practitioner*, 1977.

FARNSWORTH RJ. Microbiologic examination of bulk tank milk. *Vet Clin Food Anim*, v.9, m.3, p. 469-474, 1993.

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

FARNSWORTH RJ; WYMAN L; HAWKINSON R. Use of a teat sealer for prevention of intramammary infections in lactating cows. *J A V M A*, v.177, p. 441-444, 1980.

FINCH, JM; HILL AW; FIELD TR et al. Local vaccination with killed *Streptococcus uberis* protects the bovine mammary gland against experimental intramammary challenge with the homologous strain. *Infect Immun*, v.62, p. 3599, 1994.

FONSECA LFL. ; SANTOS MV. Qualidade do leite e controle de mastite.. 02. ed. São Paulo: Lemos Editorial, 2001. 176 p.

FORBES D; HEBERT CN. Studies in the pathogenesis of staphylococcal mastitis. *Vet Rec*, v.82, p. 69-73, 1968.

FOX LK; GAY JM. Contagious mastitis. *Vet. Clin. Food Amim*, v.9, n.3, p.475-487, 1993.

FOX LK; FERENS WA; BOHACH GA et al. *Staphylococcus aureus*: super mastitis pathogen. In: PROCEEDINGS OF THE 39TH ANNUAL MEETING OF THE NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Atlanta (GA), p. 98-103, 2000.

FOX LK; SHOOK GE; SCHULTZ LH. Factors related to milk loss in quarters with low somatic cell counts. *J Dairy Sci*, v.68, p. 2100-2107, 1985.

GONZÁLEZ R, CULLOR J, JASPER D et al. Prevention of clinical coliform mastitis in dairy cows by a mutant *Escherichia coli* vaccine. *Can J Vet Res*, v.53, p. 301-305, 1989.

GONZÁLEZ R; WILSON DJ; MOHAMMED H et al. A placebo-controlled trial of an *Escherichia coli* J5 bacterin and the ribotyping-based assessment of coliform bacteria diversity on a dairy farm. In: PROCEEDINGS OF THE 19TH WORLD BUAIATRICS CONGRESS. Edinburgh, p. 277-280, 1996.

GUDDING R; McDONALD JS; CHEVILLE NF. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* mastitis. Bacteriologic, histologic, and ultrastructural pathologic findings. *Am J Vet Res*, v.45, p. 2525-2531, 1984.

GUTERBOCK WM; VAN EENENNAAM AL; ANDERSON RJ et al. Efficacy of intramammary antibiotic therapy for treatment of clinical mastitis caused by environmental pathogens. *J Dairy Sci*, v.76, p. 3437-3444, 1993.

GYLES CL; THOEN CO. *Pathogenesis of bacterial infection in animals*. 2 ed. Ames: Iowa State University Press. 1993.

HARALDSON I; JONSSON P. Histopathology and pathogenesis of mouse mastitis induced with *Staphylococcus aureus* mutants. *J Comp Pathol*, v.94, p. 183-196, 1984.

HARMON RJ; LANGLOIS BE. Mastitis due to coagulase-negative *Staphylococcus* species. *Agri-Practice*, v.10, p. 29-34, 1989.

HILL AW. Factors influencing the outcome of *Escherichia coli* mastitis in the dairy cow. *Res. Vet Sci*, v.31, p. 107-112, 1981.

HILL AW; FINCH JM; FIELD TR et al. Immune modification of pathogenesis of *Streptococcus uberis* mastitis in the dairy cow. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v.8, p. 109, 1997.

HILLERTON JE; BRAMLEY AJ; STAKER RT et al. Patterns of infection over a five-year period in a closely monitored herd applying mastitis control measures. *J Dairy Res*, v. 62, p. 39-50, 1995.

HILLERTON JE; KLIEM KE. Effective treatment of *Streptococcus uberis* clinical mastitis to minimize the use of antibiotics. *J Dairy Sci*, v.85, p. 1009-1014, 2002.

HILLERTON JE; BERRY EA. The management and treatment of environmental streptococcal mastitis. *Vet Clin Food Anim*, v.19, p. 157-169. 2003.

HOBLET KH; BAILEY JS; PRITCHARD DE. Coagulase-positive staphylococcal mastitis in a herd with low somatic cell counts. *J Am Vet Med Assoc*, v.192, p. 777-780, 1988.

HOBLET KH; SCHINITKEY GD; ARBAUGH D et al. Costs associated with selected preventive practices and episodes of clinical mastitis in nine herds with low somatic cell counts. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.199, p.190-196, 1991.

HOGAN JS; HOBLET K; SMITH K et al. Bacterial and somatic cell counts in bulk tank milk from nine well managed herds. *J Food Protection*, v.51, p.930-934, 1988.

HOGAN JS; TODHUNTER D; TOMITA G et al. Field trial to determine efficacy of an *Escherichia coli* J5 vaccine on mammary health. *J Dairy Sci*, v.74 (Suppl 1), p. 169, 1991.

HOGAN JS; SMITH K; HOBLET K et al. Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds. *J Dairy Sci*, v.72, p. 1547-1556, 1989.

HOGAN JS; WHITE DG; PANKEY JW. Effects of teat dipping on intramammary infections by *Staphylococci* other than *Staphylococcus aureus*. *J Dairy Sci*, v.70, p. 873-879, 1987.

HUXLEY JH; GREEN MJ; GREEN LE et al. Evaluation of the efficacy of an internal teat sealer during the dry period. *J Dairy Sci*, v. 85, 551-561, 2002.

HWANG, C; PAK S; HAN H. Effects of autogenous toxoid-bactein in lactating cows with *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *J. Vet. Med. Sci.*, v.62, n.8, p. 875-880, 2000.

JAYARAO BM; WOLFGANG DR. Bulk-tank milk analysis: a useful tool for improving milk quality and herd udder health. *Vet Clin Food Anim*, v.19, p. 75-92, 2003.

KRUZE J; BRAMLEY AJ. Sources of *Streptococcus uberis* in tehe dairy herd II. Evidence of colonisation of the intestine by Str. *Uberis*. *J Dairy Res*, v.49, p. 375-379, 1982.

LACY-HULBERT SJ; HILLERTON JE. Physocal characteristics of the bovine teat canal and their influence on susceptibility to streptococcal infection. *J Dairy Res*, v.62, p. 395-404, 1995.

LAM TJGM; VAN WUYCKHUISE L. A.; FRANKEN P et al. Use of composite milk samples for diagnosis of *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.208, p. 1705-1708, 1996.

LEIGH JA. Purification of a plasminogen activator from *Streptococcus uberis*. *FEMS Microbiol Lett*, v.118, p. 153-157, 1994.

MACHADO PF; CASSOLI LD. Novas tecnologias na avaliação da qualidade do leite. In: TEIXEIRA JC; DAVID FM; ANDRADE GA et al.. Avanços em produção e manejo de bovinos leiteiros. 1 ed. Lavras -Minas Gerais, 2002. p. 161-180.

MATOS JS; WHITE DG; HARMON RJ et al. Isolation of *Staphylococcus aureus* from sites other than the lactating mammary gland. *J Dairy Sci*, v.74, p.1544-1551, 1991.

MATTHEWS KR; HARMON RJ; LANGLOIS BE. Effect of naturally occurring coagulase-negative *Staphylococci* infections on new infections by mastitis pathogens in the bovine. *J Dairy Sci*, v.74, p. 1855-1859, 1991.

MATTHEWS KR; HARMON RJ; LANGLOIS BE et al. Use of latex teat dip with germicide during the prepartum period. *J Dairy Sci*, v.71, p. 1940-1946, 1988.

McARTHUR BJ; FAIRCHILD TP; MOORE JJ. Efficacy of a latex teat sealer. *J Dairy Sci*, v.67, p. 1331-1335, 1984.

MEANEY WJ. Effect of a dry period teat seal on bovine udder infection. *Ir J Agric Res*, v.16, p. 293-299, 1977.

MILLER GY; BARTLETT PC; LANCE SE et al. Costs of clinical mastitis and mastitis prevention in dairy herds. *J Am Vet Med Assoc*, v.202, n.8, p.1230-1236, 1993.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia Alimentar para a População Brasileira: Promovendo a Alimentação Saudável. Brasília: Ministério da saúde, 2005. 236p.

MORALES JM; HALLBERG J; SEARS PM. AABP clinical mastitis evaluation record system use in monitoring and evaluating clinical mastitis. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MASTITIS AND MILK QUALITY. Proceedings of the 2nd International Symposium on Mastitis and Milk Quality. Vancouver (BC), 2001. p. 131-134.

MORIN D; SHANKS RD; MCCOY GC et al. Comparison of antibiotic administration in conjunction with supportive measures versus supportive measures alone for treatment of dairy cows with clinical mastitis. *J Am Vet Med Assoc*, v.219, p. 676-681, 1988.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Current concepts of bovine mastitis. Natl. Mastitis Council. Inc., Madison WI. 1987, 47p.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*. Natl. Mastitis Council. Inc., Madison WI. 1999.

NEAVE FK; DODD FH; HENRIQUES E. Udder infections in the dry period. *J Dairy Res*, v. 17, p. 37-49, 1950.

NEAVE FK; DODD FH; KINGWILL RG et al. Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. *J Dairy Sci*, v.52, p. 696-707, 1969.

NEWBOLD FHS. Antibiotic treatment of experimental *Staphylococcus aureus* infections of the bovine mammary gland. *Can J Comp Med*, v.38, p. 411-416, 1974.

NICKERSON SC; HELD CW. Histopathologic response of the bovine mammary gland to experimentally induced *Staphylococcus aureus* infection. *Am J Vet Res*, v.42, p. 1351-1355, 1981.

NICKERSON SC; OWENS WE.; TOMITA GM et al. Vaccinating dairy heifers with a *S. aureus* bacterin reduces mastitis at calving. *Large Anim. Practice*, v.20, p.16-28, 1999.

NICKERSON, S. C. Preventing new *Staphylococcus aureus* mastitis infections. *Vet Med*, v.33, p. 368-373, 1993.

NORDHAUG ML.; NESSE LL; NORCROSS NL et al. A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 1. Clinical parameters. *J Dairy Sci*, v.77, p.1267-1275, 1994.

OLIVER SP; SMITH KL. Bovine mammary involution following intramammary infusion on colchicines and endotoxin at drying off. *J Dairy Sci*, v.65, p.801-813, 1982.

OLIVER SP; ALMEIDA RA; CALVINHO LF. Virulence factors of *Streptococcus uberis* isolated from cows with mastitis. *Zentralbl. Veterinarmed*, v.45, p. 461-465, 1998.

OWENS WE; WATTS JL; BODDIE RL et al. Antibiotic treatment of mastitis: comparison of intramammary and intramammary plus intramuscular therapies. *J Dairy Sci*, v.71, p. 3143-3147, 1988.

PANKEY, JW; BODDIE NT; WATTS JL et al. Evaluation of protein A and a commercial bacterin as vaccines against *Staphylococcus aureus* mastitis by experimental challenge. *J Dairy Sci*, v. 68, p.726, 1985.

PHILPOT W.N.; NICKERSON S.C. *Vencendo a luta contra mastite*. Naperville – IL: Westfalia Surge Inc., 2000, 192p.

POTTER AA. Vaccines for streptococcal pathogens have arrived. In: ANNUAL MEETING OF THE NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Proceedings of the 41st annual meeting of the National Mastitis Council, Orlando, FL, 2002. p. 81-88.

Pyorala S, Pyorala E. Efficacy of parenteral administration of three antimicrobial agents in treatment of clinical mastitis in lactating cows: 487 cases (1989-1995). *J Am Vet Med Assoc*, v. 76, p. 107-412, 1998.

QUINN PJ; CARTER ME; MARKEY BK et al. Clinical veterinary microbiology. Wolf Publishing. London. 1994.

RAUBERTAS RF; SHOCK GE. Relationship between lactation measures of somatic cell concentration and milk yield. *J Dairy Sci*, v.65, p.419, 1982.

RENEAU JK. Clinical mastitis records in production medicine programs. *Comp Cont Educ Pract Vet*, v.15, p. 497-503, 1993.

RIOLLET C; RAINARD P; POUTREL B. Kinetics of cells and cytokines during immune-mediated inflammation in the mammary gland of cows systematically innunized with *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *Inflam Res*, v.49, p. 486-492, 2000.

ROBINSON TC; JACKSON ER; MARR A. Within herd comparison of teat dipping and dry cow therapy with only selective dry cow therapy in six herds. *Vet Rec*, v.112, p. 315-319, 1983.

ROSEY EL; LINCOLN RA; WARD PN et al. PauA: a novel plasminogen activator from *Streptococcus uberis*. *FEMS Microbiol Lett*, v.178, p. 27-32, 1999.

ROSSITO PV; RUIZ L; KIKUCHI Y et al. Antibiotic susceptibility patterns for environmental *Streptococci* isolated from bovine mastitis in central California dairies. *J Dairy Sci*, v.85, p. 132-138, 2002.

RUEGG PL. Evaluating effectiveness of mastitis vaccines. University of Wisconsin extension bulletin. <http://www.uwex.edu/ces/pubs>. 2002.

RUEGG PL. Investigation of mastitis problems on farms. *Vet Clin Food Anim*, v.19, p. 47-73, 2003.

RUEGG, P. L.; REINEMANN D. J. Milk Quality and Mastitis Tests. *Bovine Practitioner*, v.36, p.41-54, 2002.

RUEGG PL. Strategies for controlling contagious mastitis. Univ of Wisconsin Extension bulletin. <http://www.uwex.edu/ces/pubs>. 2002.

SABENFELDT GH; SPENCER GR. The lesions in bovine udder shedding nonhemolytic coagulase-negative *Staphylococci*. *Path Vet*, v.3, p. 27-31, 1966.

SCHALM WL; NOORLANDER DO. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. *J Am Vet Med Assoc*, v.130, p. 199-207, 1957.

SCHAUFUSS P; STING R; SCHAEG W et al. Isolation and characterization of hyaluronidase from *Streptococcus uberis*. *Zentralbl Bakteriol*, v.271, p. 46-51, 1989.

SEARS PM. Alternative management and economic consideration in *Staphylococcus aureus* elimination programs. In: ANNUAL MEETING OF THE NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Proceedings of the 38th annual meeting of the National Mastitis Council. Arlington (VA), 1999.p. 86-92.

SEARS PM; GONZÁLEZ RN; WILSON DJ et al. Procedures for mastitis diagnosis and control. *Vet Clin Food Anim*, v.9, n.3, p. 445-468, 1993.

SEARS PM; HANCOCK DD; SMITH BS et al. Comparison of the microbiology results from milk samples obtained before and after milking for the diagnosis of bovine mammary infections. *J Dairy Sci*, v.74, p. 1245-1251, 1991.

SEARS PM; MCCARTHY KK. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet Clin Food Anim*, v.19, p. 171-185, 2003.

SEARS PM; SMITH BS; ENGLISH PB et al. Shedding pattern of *S aureus* for the diagnosis of bovine intramammary infections. *J Dairy Sci*, v.73, p. 2785-2790, 1990.

SHOSHANI E; LEITNER G; HANOCHI B et al. Mammary infection with *Staphylococcus aureus* in cows: progress from inoculation to chronic infection and its detection. *J Dairy Res*, v.67, p. 155-169, 2000.

SHUSTER DE; LEE EK; KEHRLI ME. Bacterial growth, inflammatory cytokine production, and neutrophil recruitment during coliform mastitis in cows within ten days after calving, compared with cows at midlactation. *Am J Vet Res*, v.57, p. 1569-1578, 1996.

SOL J.; SAMPIMON OC; HARTMAN E et al. Effect of preculture freezing and incubation on bacteriological isolation from subclinical mastitis samples. *Vet. Microbiology*, v.85, p.241-249, 2002.

SOL J; SAMPIMON OC; SNOEP JJ et al. Factors associated with bacteriological cure after dry cow treatment of subclinical staphylococcal mastitis with antibiotics. *J Dairy Sci*, v.77, p. 75-79, 1994.

SORDILLO LM; STREICHER KL. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biology and Neoplasia*, v.7, n.2, p. 135-146, 2002.

SMITH KL; HOGAN JS. Environmental mastitis. *Vet Clin Food Anim*, v.9, n.3, p. 489-498, 1993.

SMITH KL. Mastitis control: a discussion. *J Dairy Sci*, v.66, p.1790-1794, 1983.

SMITH KL; TODHUNTER D; SCHOENBERGER P. Environmental pathogens and intramammary infection during the dry period. *J Dairy Sci*, v.68, p. 402-417, 1985a.

SMITH KL; TODHUNTER D; SCHOENBERGER P. Environmental mastitis: cause prevalence, prevention. *J Dairy Sci*, v.68, p. 1531-1553, 1985b.

THURMOND MC. Epidemiologic methods in mastitis treatment and control. *Vet Clin Food Anim*, v.9, p. 435-444, 1993.

TIMMS LL. Field trial evaluations of a persistent barrier teat dip for preventing mastitis during the dry period and as a potential alternative to dry cow therapy. In: International

Symposium on Mastitis and Milk Quality. Proceedings of the National Mastitis Council 2nd International Symposium on Mastitis and Milk Quality, Vancouver, 2001. p. 536-537.

TODHUNTER DA; SMITH KL; HOGAN JS. Intramammary challenge of the bovine mammary gland with coliform bacteria during early involution. *J Dairy Sci*, v.73, p. 1217-1224, 1990.

TODHUNTER DA; SMITH KL; HOGAN JS. Environmental streptococcal intramammary infections of the bovine mammary gland. *J Dairy Sci*, v.78, p. 2366-2374, 1995.

TODHUNTER DA; SMITH KL; HOGAN JS et al. Gram-negative bacterial infections of the mammary gland in cows. *Am J Vet Res*, v.52, p. 184-188, 1991.

WALLER KP. Mammary gland immunology around parturition. Influence of stress, nutrition and genetics. *Adv Exp Med Biol*, v.480, p. 231-245, 2000.

WATSON D.L. Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in ewes. *Res Vet Sci*, v.45, p.16, 1988.

WENZ JR; BARRINGTON GM; GARRY FB et al. Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc*, v.219, p. 976-981, 2001.

WHITE EA; PAAPE MJ; WEINLAND AJ et al. Virulence of three strains of *Staphylococcus aureus* isolated from clinically infected bovine mammary glands. *J Dairy Sci*, v.63, p.1128-1233, 1980.

WILLIAMSON G; WOOLFORD MW; DAY AM. The prophylactic effect of a dry-cow antibiotic against *Streptococcus uberis*. *N Z Vet J*, v.43, p. 228-234, 1995.

WILSON DJ; GONZALEZ RN; CASE KL et al. Comparison of seven antibiotic treatment with no treatment for bacteriology efficacy against bovine mastitis pathogens. *J dairy Sci*, v.82, p. 1667-1670, 1999.

WILSON DJ; GONZALEZ RN; SEARS PM. Segregation or use of separate milking units for cows infected with *Staphylococcus aureus*: effects on prevalence of infection and bulk tank somatic cell counts. *J Dairy Sci*, v.78, p. 2083-2085, 1995.

WILSON DJ; GONZÁLEZ RN. Vaccination strategies for reducing clinical severity of coliform mastitis. *Vet Clin Food Anim*, v.19, p. 187-197, 2003

WOOLFORD MW; WILLIAMSON JH; DAY AM et al. The prophylactic effect of a teat sealer on bovine mastitis during the dry period and the following lactation. *N Z Vet J*, v.46, p. 12-19, 1998.

YANCEY RJ. Recent advances in bovine vaccine technology. *J Dairy Sci*, v.76, p. 2418-2436, 1993.

ZADOKS RN; ALLORE HG; BARKEMA W et al. Analysis of an outbreak of *Streptococcus uberis* mastitis. *J Dairy Sci*, v.84, p. 590-599, 2001.

ZADOKS RN; SCHUKKEN YH. *Streptococcus uberis*: environmental or contagious pathogen? In: Annual meeting of the National Mastitis Council. Proceedings of the 42nd annual meeting of the National Mastitis Council. Fort Worth (TX), 2003. p. 61-67.

ZECCONI, A; PICCININI R, ZEPPONI A et al. Recovery of *Staphylococcus aureus* from centrifuged quarter milk samples. *J. Dairy Sci.*, v.80, p. 3058-3063, 1997.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DO PETRIFILM[®] PARA O ISOLAMENTO DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EM AMOSTRAS DE LEITE

1. INTRODUÇÃO:

O isolamento e a identificação de patógenos presentes em amostras de leite é fundamental em programas de controle de mastite. A coleta e envio de amostras para laboratórios requer esforço considerável de pessoas envolvidas e a obtenção de informações importantes é fundamental. No entanto, resultados negativos são comuns podendo chegar a 50% de amostras de vacas com mastite clínica ou subclínica submetidas ao laboratório gerando insatisfação pela inutilidade dos dados gerados (Makovec & Ruegg, 2003).

Algumas causas de resultados bacteriológicos negativos de casos de mastite incluem cura espontânea (Eberhart et al., 1979, Smith et al., 1985), eliminação cíclica do agente em infecções crônicas por *S. aureus* (Sears et. al., 1990) e baixo número de colônias bacterianas no leite (Sears et. al., 1990). Culturas negativas também podem ocorrer em casos onde a bactéria presente tenha sido fagocitada por fagócitos (Hill et al, 1978; Newbould et al, 1965). A ocorrência de resultados falso negativos de amostras submetidas ao cultivo podem resultar na manutenção de animais infectados dentro do rebanho e contribuir para o fracasso de programas elaborados para o controle da mastite contagiosa. É importante que seja ponderada a utilização de métodos laboratoriais mais caros e sensíveis contra os custos de outras intervenções. A escolha da utilização de um método diagnóstico mais rigoroso deve ser determinada para cada rebanho baseada nos objetivos do criador e na habilidade de utilizar os dados resultantes.

Vários métodos têm sido propostos com o objetivo de melhorar a taxa de recuperação de patógenos de amostras de leite. A utilização de inóculos maiores aumentou a sensibilidade relativa para o isolamento de *S. aureus* de 78% (0,01 mL) para

90% (0,1 mL) (Lam et al., 1996). Incubação de amostras de leite por 4 a 18 h antes do cultivo aumentou a taxa de recuperação de patógenos bacterianos se comparado com a utilização do método tradicional de isolamento (Dinsmore et al, 1992). Congelamento e descongelamento subsequente de amostras de leite antes da incubação aumentou a recuperação em 2,5 e 1,5 vezes para *Streptococcus agalactiae* e *S. aureus* respectivamente (Villanueva et al., 1991). Centrifugação de amostras de leite e cultivo subsequente do sedimento aumentou a recuperação de *S. aureus* em 86% (Zecconi et al., 1997). A utilização de combinações variadas destes métodos também foram relatadas (Dinsmore et al., 1992; Sol et al., 2002).

Petrifilm[®] (3M, Minneapolis) são “cartelas” contendo meios de cultivo seletivo comercializados para o isolamento bacteriológico rápido e enumeração de bactérias em alimentos. O Petrifilm Staph Express Count Plate (3M, Minneapolis) contém o meio de cultivo Baird-Parker cromogênico modificado que é seletivo e diferencial para *Staphylococcus* spp. A confirmação de *S. aureus* é conseguida utilizando um disco que contém deoxyribonuclease e um pigmento que reage produzindo uma zona rósea ao redor das colônias de *S. aureus*.

O objetivo deste estudo foi de avaliar a utilização do Petrifilm Staph Express Count Plate para o diagnóstico de mastite causada por *Staphylococcus aureus*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS:

Uma série de quatro experimentos foram realizados.

2.1. Experimento 1

Os objetivos do experimento 1 foram de comparar os resultados microbiológicos do Petrifilm[®] com técnicas de cultivo padrão e amplificadas para o diagnóstico de mastite causada por *S. aureus*.

Amostras de leite de quartos mamários (n = 362) foram obtidas de vacas (n = 145) em um rebanho comercial (Rebanho A) localizado no estado de Wisconsin (EUA). Os proprietários e funcionários da fazenda foram treinados para coleta de acordo com procedimento descrito pelo National Mastitis Council (1999). Amostras de leite foram obtidas de vacas selecionadas e congeladas por até 1 semana (-20°C). Vacas foram selecionadas levando-se em consideração os seguintes critérios: alta CCS (>400.000 células/mL; n = 25 vacas, 97 amostras de leite), vacas pós-parto (2 a 4 dias pós-parto; n = 41 vacas, 163 amostras de leite), e casos de mastite clínica (leite anormal identificado por pessoal da fazenda, n = 79; 102 amostras de leite). Para aumentar a prevalência de *S. aureus* no conjunto, amostras compostas congeladas (n=29) de um rebanho com histórico prévio de alta prevalência de *S. aureus* foram incluídas.

Amostras de leite foram descongeladas e 0,01 mL semeado em ágar sangue sendo então incubado a 37°C por 24 h (método Padrão). Uma alíquota de 1 mL foi adicionado ao Petrifilm Staph Express Count Plate e incubado a 37°C por 24 h seguindo recomendações do fabricante (método Petrifilm). Uma alíquota de 5 mL de cada amostra foi colocada em um novo frasco e centrifugado a 2.000 x g por 15 min. A porção superior, líquida, foi então descartada e 0,01 mL do sedimento semeado em ágar sangue a 37°C por 24 h (método Centrifugado). A alíquota restante da amostra original foi incubada por 18 h a 37°C no frasco original. Quando não foram observados crescimentos bacterianos no método padrão, 0,01 mL da amostra incubada foi semeada em ágar sangue e incubada a 37°C por 24 h (método Pré-incubado).

Todo crescimento bacteriano foi verificado em 24 e 48 horas de incubação. *S. aureus* foi identificado pelo padrão hemolítico, característica de coloração no Gram, reação positiva à prova de catalase, ágar manitol e coagulase (NMC, 1999). Outros resultados bacterianos foram reportados como *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN), *Corynebacterium* sp., *Bacillus* sp. e outros de acordo com o National Mastitis Council (1999).

Amostras foram consideradas contaminadas se três ou mais tipos diferentes de colônias foram encontrados. Culturas foram consideradas negativas quando <3 colônias forem encontradas na placa exceto para *S. aureus* onde a presença de ≥ 1 colônia foi considerado resultado positivo.

Para o método Petrifilm, *S. aureus* foi identificado seguindo as instruções do fabricante para o Staph Express Count Plate e Staph Express Disk. O disco contém um pigmento e um ácido deoxiribonucléico (DNA). *S. aureus* produz deoxiribonuclease e reage com o pigmento formando uma área rósea ao redor das colônias. O disco foi aplicado em todos os Staph Express Petrifilm com qualquer evidência de crescimento bacteriano após 24 h de incubação. Testes Petrifilm foram considerados positivos quando colônias eram associadas a uma zona distinta de coloração rósea após outras 2 horas de incubação. Quando o crescimento bacteriano se apresentou difuso e sem individualização aparente das colônias, uma diluição do leite de 1 para 10 com água destilada foi utilizada e uma alíquota de 1 mL adicionada ao Petrifilm. Os resultados da amostra diluída foram então utilizados na análise. Quando o crescimento ocorreu somente no Petrifilm, colônias foram apanhadas, semeadas e confirmadas pelo método padrão. Os resultados de Petrifilm foram considerados falso positivos quando o método padrão não resultou na confirmação de *S. aureus*. Identificação final destas colônias foi efetuada utilizando-se um sistema de identificação microbiana comercial (BBL Crystal ID, Becton Dickinson, NJ).

2.2. Experimento 2

Os objetivos do experimento 2 foram de comparar os resultados do Petrifilm em amostras individuais, compostas ou de quartos mamários.

Amostras de quartos mamários (n = 386) e amostras compostas (n = 100) foram coletadas de vacas (n = 100) do rebanho A, com alta CCS (>200.000 células por mL) no teste mais recente do Dairy Herd Improvement, NI, EUA (DHI). Amostras de quartos mamários (10 mL de leite) foram coletadas como descrito no experimento 1. Para a

amostragem composta, um frasco graduado de maior volume (50 mL) foi utilizado e aproximadamente 10 mL de leite foi coletado de cada quarto mamário. O manuseio das amostras e as técnicas microbiológicas empregadas foram as mesmas daquelas descritas no experimento 1, exceto que o método com centrifugação não foi utilizado.

2.3. Experimento 3

O objetivo do experimento 3 foi de determinar a especificidade do Petrifilm baseado em diferentes parâmetros de interpretação, de acordo com a intensidade das zonas róseas formadas ao redor das colônias nas cartelas de Petrifilm.

Amostras de quartos mamários (n = 333) foram obtidas de todas as vacas em lactação (n = 88) de um rebanho comercial (rebanho B) que utiliza sistema robótico de ordenha em Wisconsin, EUA. Vacas foram contidas em canzins e o leite coletado por métodos assépticos como recomendados pelo National Mastitis Council (1999). Imediatamente após a coleta, uma alíquota de 1 mL foi adicionada ao Petrifilm Staph Express Count Plate. As cartelas de Petrifilm foram incubadas a 37°C por 24 h e *S. aureus* identificado seguindo instruções do fabricante. Os discos 3M Staph Express Disk foram inseridos a todos os Staph Express Count Plate com evidências de crescimento bacteriano após 24 h de incubação (n = 320). Cartelas de Petrifilm com formação de zonas róseas evidentes associadas com colônias (n = 127) foram classificadas como fracas ou distintas após outras 2 horas de incubação. Todas as colônias associadas a zonas róseas foram coletadas e re-cultivadas em ágar sangue. *S. aureus* foi identificado pelo padrão hemolítico, característica de coloração no Gram, reação positiva à prova de catalase, ágar manitol e coagulase (NMC, 1999). Identificação final de colônias de SCN foi efetuada utilizando-se um sistema de identificação microbiana comercial (BBL Crystal ID, Becton Dickinson, NJ).

2.4. Experimento 4

O objetivo do experimento 4 foi de verificar a repetibilidade do Petrifilm entre diferentes pessoas.

Amostras de leite compostas (n=240) foram coletadas de todas as vacas em lactação de um rebanho comercial (rebanho C) em Wisconsin, EUA. Coleta foi feita conforme procedimento descrito pelo National Mastitis Council (NMC) (1999). Amostras foram refrigeradas imediatamente e entregues ao laboratório dentro de 8 horas. Uma alíquota de 1 mL da amostra foi adicionada tanto ao Petrifilm Staph Express Count Plate quanto ao Petrifilm Aerobic Count Plate de acordo com recomendações do fabricante (3M). Os testes Petrifilm foram inicialmente lidos após incubação de 37°C durante 24 h por três diferentes leitores com níveis variados de experiência. Leitores A e B tiveram alguma experiência prévia com a interpretação do Petrifilm enquanto o leitor C não tinha nenhuma experiência com o produto. Leitores verificaram independentemente o número de colônias (0, 1-50, 51-150 e >150), cor das colônias (vermelho-violeta, preta, azul-verde, outra), tamanho da colônia (normal, pequena, grande, irregular). Após a leitura inicial dos Petrifilm, o disco Staph Express Disk foi inserido em todos os Petrifilm com evidências de crescimento bacteriano (>1 UFC / mL). As cartelas de Petrifilm foram novamente incubadas a 37°C por mais 2 horas e posteriormente lidas independentemente pelos mesmos três leitores. Leitores verificaram a intensidade das zonas róseas associadas a colônias (nenhuma, fraca ou intensa). Quando 2 entre 3 leitores concordaram que colônias formaram zonas fracas ou distintas no Petrifilm as referidas colônias foram coletadas e re-cultivadas em ágar sangue. *S. aureus* foi identificado pelo padrão hemolítico, característica de coloração em Gram, reação positiva à prova de catalase, ágar manitol e coagulase (NMC, 1999). Identificação final de colônias de SCN foi efetuada utilizando-se um sistema de identificação microbiana comercial (BBL Crystal ID, Becton Dickinson, NJ).

Colônias provenientes do Petrifilm Aerobic Count Plate que continham crescimento (> 25 UFC/mL) foram apanhadas e re-cultivadas em ágar sangue e ágar MacConkey. Identificação de bactérias foi realizada usando os procedimentos descritos pelo National Mastitis Council (1999).

2.5. Análise Estatística

As análises estatísticas para os experimento 1 e 2 foram efetuadas utilizando o teste McNemar para dados pareados (SAS, 1999). Significância estatística foi definida em $P \leq 0,05$. No experimento 1 a sensibilidade relativa dos métodos diagnósticos foi definida como a probabilidade de isolar *S. aureus* utilizando um único método comparado à probabilidade de isolamento utilizando os quatro métodos simultaneamente. Os resultados falso positivos do Petrifilm ($n = 2$) foram excluídos da análise para comparação entre métodos da prevalência de *S. aureus*.

No experimento 2 a prevalência de *S. aureus* foi comparada tendo como unidade a vaca (amostra composta ou amostras de quartos mamários). Quando amostras de quartos mamários foram utilizadas, vacas foram consideradas positivas mediante isolamento de *S. aureus* em qualquer quarto. O status da vaca utilizando amostras compostas foi o próprio resultado bacteriológico dessas amostras. A sensibilidade relativa dos métodos foi definida como a probabilidade de isolamento utilizando um único método comparado à probabilidade de isolamento utilizando os três métodos simultaneamente em amostras compostas e de quartos mamários. Quatro vacas com resultados falso positivos no Petrifilm foram excluídas para o cálculo de prevalência.

No experimento 3, a especificidade e os valores preditivos foram estimados utilizando o software epidemiológico (Win Episcopo 2.0) baseado em fórmulas derivadas de métodos epidemiológicos padrão (Martin et. al., 1987; Thrushfield, 1995).

Três dados com resultados laboratoriais incompletos foram excluídos. Falso-positivos foram definidos como amostras que exibiram zonas róseas fracas ou intensas no Petrifilm (após aplicação do disco), mas foram identificadas como outros patógenos utilizando procedimentos microbiológicos padrão. A associação entre intensidade de zonas róseas e a acurácia de identificação de *S. aureus* foi determinada utilizando o método do qui-quadrado (Win Episcopo 2.0).

No experimento 4, a especificidade e a associação entre intensidade de zonas róseas e a acurácia da identificação de *S. aureus* foi estimada da forma descrita no experimento 3. A associação entre leitores e os resultados do método Petrifilm foi avaliada utilizando o método do qui-quadrado (WinEpiscope 2.0).

3. RESULTADOS:

3.1. Experimento 1

A prevalência estimada de *S. aureus* nas amostras de leite variou de 5,4 a 8,2% e a sensibilidade dos vários métodos ficou entre 65,6 a 87,5%. A sensibilidade do método Petrifilm e do pré-incubado foram significativamente superiores ao do método padrão ($P < 0,05$). O método centrifugado não foi diferente dos demais (Tabela 1).

Tabela 1. Prevalência e sensibilidade relativa de isolamento de *Staphylococcus aureus* de diferentes métodos microbiológicos.

Método Microbiológico	Resultados para <i>Staphylococcus aureus</i> (n = 389)		
	Número Isolado	Prevalência, %	Sensibilidade, %
Padrão ¹	21	5,4 ^d	65,6 ^b
Centrifugado ²	24	6,1 ^{cd}	75,0 ^{ab}
Pré-incubado ³	27	6,9 ^{bc}	84,4 ^a
Petrifilm ⁴	28	7,2 ^{bc}	87,5 ^a
Combinação ⁵	32	8,2 ^a	

^{a,b,c,d} Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($P < 0,05$).

¹ Leite (0,01 mL) semeado em ágar sangue (NMC, 1999).

² Centrifugação de 5 mL de leite seguido por semeadura de 0,01 mL do sedimento em ágar sangue.

³ Pré-incubação da amostra por 18h a 37°C seguido de cultivo padrão.

⁴ Petrifilm Staph Express Count Plate (3M, Minneapolis, MN). Dois resultados falso-positivos foram excluídos.

⁵ Todos os métodos combinados.

O emprego da pré-incubação aumentou a recuperação da maioria dos patógenos de amostras de quartos mamários obtidas da fazenda A ($P < 0,05$) (Tabela 2). Não houve diferença na taxa de amostras contaminadas dos diferentes métodos. A centrifugação aumentou somente a taxa de isolamento de *Bacillus* sp em relação ao método padrão.

A utilização do Petrifilm Staph Express aumentou a recuperação de *S. aureus* se comparado aos outros métodos microbiológicos ($P < 0,05$) (Tabela 2). Em amostras da fazenda A, o uso do Petrifilm resultou em aumento de 63,6% na recuperação de *S. aureus* se comparado ao método padrão.

Tabela 2. Prevalência de isolamentos bacterianos de amostras de quartos mamários de um rebanho comercial (Fazenda A) de acordo com diferentes métodos microbiológicos (n = 360).

Diagnóstico Microbiológico	Padrão ¹ (%)	Método		
		Centrifugado ² (%)	Pré-incubado ³ (%)	Petrifilm ⁴ (%)
	2,2 ^b	2,5 ^b	2,5 ^b	3,6 ^a
Staphylococcus aureus				
Coliformes	9,4 ^b	7,7 ^b	16,3 ^a	-
<i>Streptococcus</i> sp.	3,3 ^b	3,6 ^{ab}	5,2 ^a	-
SCN	6,3 ^b	8,0 ^b	24,6 ^a	-
<i>Corynebacterium</i> sp.	0,5	1,4	1,4	-
<i>Bacillus</i> sp	1,1 ^c	3,6 ^b	12,1 ^a	-
Outros ⁵	0,5 ^a	1,9 ^{ab}	2,5 ^a	-
Contaminado ⁶	1,1	1,9	1,4	-
	77,9 ^c	73,5 ^b	42,8 ^a	-
Negativo				

^{a,b,c} Valores com letras diferentes na mesma linha diferem significativamente ($P < 0,05$).

¹Leite (0,01 mL) semeado em ágar sangue (NMC, 1999).

²Centrifugação de 5 mL de leite seguido por semeadura de 0,01 mL do sedimento em ágar sangue.

³Pré-incubação da amostra por 18h a 37°C seguido de cultivo padrão.

⁴Petrifilm Staph Express Count Plate (3M, Minneapolis, MN). Dois resultados falso-positivos foram excluídos.

⁵Outros = *Pseudomonas* spp. e Leveduras.

⁶Contaminado = 3 ou mais tipos de colônias diferentes.

3.2. Experimento 2

A forma de amostragem, composta ou por quarto mamário, não influenciou os resultados de isolamento microbiológico. Em todos os métodos, a prevalência de isolamentos de *S. aureus* não diferenciou nas duas formas de amostragens, apesar dos maiores valores numéricos dos resultados de quartos mamários (Tabela 3).

A recuperação de *S. aureus* foi 84,9% maior em amostras de quartos mamários processadas usando o Petrifilm em relação a amostras compostas processadas na forma

padrão ($P < 0,05$) (Tabela 3). Houve uma tendência de menor prevalência no método padrão em ambas amostragens, compostas ($P = 0,07$) e de quartos mamários ($P = 0,06$), se comparados ao resultado combinado de todos os métodos.

Tabela 3. Prevalência de *Staphylococcus aureus* determinada por diferentes métodos microbiológicos em amostragem composta ou por quarto mamário.

Método	Prevalência de <i>Staphylococcus aureus</i> por vaca		Valor de P ²
	Amostragem composta	Amostragem por quarto ¹	
Microbiológico	% (n = 96)	% (n=370)	
Padrão³	7,3 ^b	9,4 ^{ab}	0,500
Pré-incubado⁴	8,3 ^{ab}	10,4 ^{ab}	0,625
Petriefilm⁵	9,4 ^{ab}	13,5 ^a	0,125
Combinação⁶	12,5 ^{ab}	14,6 ^a	0,687

^{a, b} Valores com letras diferentes (linhas e colunas) diferem significativamente ($P < 0,05$).

¹Para amostragem por quarto mamário, uma vaca foi considerada positiva mediante um resultado positivo em qualquer de seus quartos mamários

²Contraste entre amostragem composta e por quarto.

³Leite (0,01 mL) semeado em ágar sangue (NMC, 1999).

⁴Pré-incubação da amostra por 18h a 37°C seguido de cultivo padrão.

⁵Petriefilm Staph Express Count Plate (3M, Minneapolis, MN). Quatro resultados falso-positivos foram excluídos.

⁶Todos os métodos combinados.

3.3. Experimento 3

S. aureus foi isolado e confirmado utilizando metodologia padrão em 19,6% das amostras de quartos mamários e em pelo menos um quarto de 45,5% das vacas. Não houve formação de zona rósea (fraca ou distinta) em 193 (60,3%) cartelas de Petriefilm, não havendo nenhum processamento posterior nessas amostras. De todas as colônias que exibiram zona rósea distinta no Petriefilm, 93,5% foram confirmadas como *S. aureus*. Nessa população de grande prevalência, a ocorrência de zona rósea distinta representou especificidade de 98,4% para detecção de *S. aureus* (Tabela 4). O diagnóstico de *S. aureus* pela formação de zonas róseas fracas resultou alta taxa de diagnósticos falso-positivos (23,4%). A intensidade da zona rósea foi fortemente associada à probabilidade de confirmação de *S. aureus* ($P < 0,001$). Colônias exibindo zonas róseas intensas foram 120 vezes mais aptas a serem confirmadas como *S. aureus* comparadas a colônias que exibiram zonas róseas fracas. Uma variedade de *Staphylococci* foi associada à formação

de zona rósea fraca. *Staphylococcus haemolyticus* (n = 12) e *S. simulans* (n = 7) foram os *Staphylococci* mais comumente isolados.

Tabela 4. Resultados microbiológicos de amostras de leite mostrando evidência de zonas róseas fracas ou distintas no Petrifilm¹.

Intensidade da Zona rósea	Método microbiológico positivo				Diagnóstico			Características do teste ²		
	n	Hemólise	Mannitol	Coagulase	<i>S. aureus</i>	SCN	Outros ³	Especif.	VP+	VP-
Experimento 3⁴										
Fraca	62	38	34	8	7	43	12	76,6 ⁶	52,4 ⁶	
Distinta	62	57	60	54	58	3	1	98,4	93,5	97,3
Experimento 4⁵										
Fraca	21	5	5	1	1	17	3	87,2 ⁶	31,0 ⁶	
Distinta	21	11	12	12	12	9	0	96,0	57,1	99,5

¹Petrifilm Staph Express Count Plate (3M Minneapolis).

³Sem crescimento no ágar sangue, e uma variedade de contaminantes ambientais

²Especificidade definida como a probabilidade de colônias que não são *Staphylococcus aureus*, não terem a zona especificada; valor preditivo de um teste positivo (VP+) definido como a probabilidade de colônias associadas à zona especificada serem confirmadas como *S. aureus*; valor preditivo de um teste negativo (VP-) definido como a probabilidade de colônias sem a zona especificada não serem realmente *S. aureus*.

⁴Amostras de quartos mamários; total: n = 317; amostras negativas para *S. aureus*: n = 252; 65 amostras positivas para *S. aureus*; 3 amostras não usadas devido a falta de dados.

⁵Amostras compostas de leite. Total: n = 240; amostras negativas para *S. aureus*: n = 227; 13 amostras positivas para *S. aureus*.

⁶Valores calculados levando em consideração resultados de zonas fraca + distinta.

3.4. Experimento 4

S. aureus foi confirmado em 5,4% das amostras compostas de leite. Concordância completa entre leitores foi verificada em 136 de 225 cartelas que tiveram crescimento bacteriano (60,7%). Dois dos três leitores concordaram que zonas róseas fracas (n = 21) ou distintas (n = 21) ocorreram em 42 (17,5%) de 240 cartelas de Petrifilm (Tabela 5). A especificidade relativa foi de 87,2 e 96,0%, respectivamente, para zonas róseas fracas e distintas. Devido a menor prevalência de infecção por *S. aureus*, o valor de predição de positivos foi menor se comparado ao experimento 3. A interpretação dos resultados do Staph Express Petrifilm foi influenciada pelo leitor (Tabela 6). Os leitores variaram na avaliação de número de colônias, tamanho de colônias e presença e intensidade de zonas

róseas. Não houve associação significativa entre os leitores e a identificação de cor das colônias.

Das amostras restantes (n = 196), 111 amostras não apresentaram crescimento ou o crescimento foi <25 UFC/mL no Petrifilm Aerobic Count Plate. Uma variedade de patógenos de maior ou menor importância na mastite foi encontrada: SCN (n = 43), *Streptococcus uberis* (n = 5), outros *Streptococcus* ambientais (n = 8), coliformes (n = 4), outros patógenos menores (n = 4), *Listeria monocytogenes* (n=1) e alguns prováveis contaminantes (bacilos, fungos e leveduras) (n = 20). Confirmação de infecções intramamárias necessitariam de maiores esforços em diagnósticos, não se enquadrando nos objetivos desse projeto.

Tabela 5. Interpretação de resultados de intensidade de zona rósea do Petrifilm Staph Express por três leitores independentes.

A	Leitor		Intensidade de Consenso ²	n	Microrganismo confirmado, n ¹		
	B	C			<i>S. aureus</i>		
					CNS	Outros	
Distinta	Distinta	Distinta	Distinta	6	3	3	0
Distinta	Distinta	Fraca	Distinta	1	1	1	0
Distinta	Fraca	Distinta	Distinta	1	1	1	0
Sem Zona	Distinta	Distinta	Distinta	1	1	1	0
Fraca	Distinta	Distinta	Distinta	12	6	3	0
Fraca	Fraca	Fraca	Fraca	10	1	8	1
Fraca	Distinta	Fraca	Fraca	1	0	1	0
Fraca	Fraca	Distinta	Fraca	1	0	1	0
Fraca	Fraca	Sem Zona	Fraca	4	0	3	1
Sem Zona	Fraca	Fraca	Fraca	5	0	4	1
Sem Zona	Sem Zona	Sem Zona	Nenhuma	120	NA ³	NA	NA
Sem Zona	Sem Zona	Fraca	Nenhuma	4	NA	NA	NA
Sem Zona	Sem Zona	Distinta	Nenhuma	2	NA	NA	NA
Sem Zona	Fraca	Sem Zona	Nenhuma	56	NA	NA	NA
Fraca	Sem Zona	Sem Zona	Nenhuma	1	NA	NA	NA
Disco não aplicado			Nenhuma	15	NA	NA	NA
				240	13	26	3
<i>Total</i>							

¹Confirmação usando técnicas microbiológicas tradicionais.

²Intensidade de zona rósea eleita para análise (2 de 3 leitores concordaram)

³NA = Não aplicável.

Tabela 6. Associação entre leitor e interpretação do Petrifilm.¹

Resultado	Leitor A		Leitor B		Leitor C		χ^2	P
	n	%	n	%	n	%		
No. de colônias								
0	22	9,2	16	6,7	10	4,2	15,9	0,01
1 a 50	132	55,0	154	64,2	136	56,7		
51 a 150	25	10,4	31	12,9	25	10,4		
>150	61	25,4	39	16,3	69	28,8		
Cor das colônias								
Vermelho-violeta	8	3,3	17	7,1	10	4,2	4,02	0,13
Outras	232	96,7	223	92,9	230	95,8		
Tamanho das colônias								
Normal	156	65,0	145	60,4	180	75,0	12,0	0,002
Outros	84	35,0	95	39,6	60	25,0		
Zona rósea								
Nenhuma	188	83,6	125	55,6	181	80,4	68,1	<0,001
Fraca	29	12,9	79	35,1	21	9,3		
Distinta	8	3,6	21	9,3	23	10,2		

¹Staph Express Count Plate (3M, Minneapolis)

4. DISCUSSÃO:

O rápido e correto diagnóstico dos patógenos da mastite é essencial para o controle da mastite. Em casos amenos ou moderados de mastite clínica, a identificação rápida do patógeno pode orientar as decisões sobre tratamentos (Siamak et al., 2001; Ruegg, 2004). Métodos de diagnósticos sensíveis e rápidos também podem ser úteis para o controle da mastite contagiosa, principalmente, quando programas de segregação são implementados (Hogan et al., 1989). No presente estudo, o Petrifilm Staph Express Count Plate teve maior sensibilidade que o método microbiológico padrão. Além disso, resultados foram obtidos em menor tempo e com menor exigência de mão de obra qualificada. Quando o método do Petrifilm foi utilizado, *S. aureus* foi confirmado em 24 a 26 horas, enquanto o método padrão levou pelo menos 48 horas.

A maior sensibilidade do Petrifilm para o isolamento do *S. aureus* pode ser resultado do maior volume de inóculo usado nesse método. O limite de detecção foi reduzido de 100 para 1 UFC/mL se comparado ao método padrão. O pequeno número de microrganismos eliminados por glândulas mamárias infectadas e o padrão intermitente de

eliminação no leite suportam a utilização de menores limites para detecção de *S. aureus* (Sears et al., 1990). Maior sensibilidade para *S. aureus* pode ser importante em programas de segregação por detectar com maior eficiência vacas infectadas. Por outro lado, o risco de falso-positivos aumenta quando menores limites de detecção são usados. O uso de técnicas assépticas de coleta e correto manuseio e estocagem das amostras é fundamental. Resultados dos diagnósticos de amostragens múltiplas do mesmo quarto são mais confiáveis que diagnósticos feitos de uma única amostragem e poderia ser adotado quando maiores valores econômicos estejam envolvidos (descarte de vacas de alto mérito genético). O significado do isolamento de uma única colônia de *S. aureus* em 1 mL de inoculo é desconhecido e, em alguns casos, pode não refletir o real status de infecção da glândula. Para correta tomada de decisões nesses casos, avaliação em conjunto com outras informações como CCS mensal e histórico de casos clínicos é fundamental.

Não houve diferença significativa nos resultados encontrados de amostras processadas usando a centrifugação se comparada ao método padrão. Estes dados estão de acordo com Zecconi et al. (1997) quando comparou isolamento de *S. aureus* de três dos seis rebanhos estudados. Zecconi et al. (1997) inoculou o sedimento completo de uma amostra de 10 mL de leite. No presente estudo, somente uma alíquota de 0,01 mL do sedimento de uma amostra de 5 mL foi semeada. Portanto, o limite de detecção foi diferente entre estudos. Mesmo que a centrifugação aumente a recuperação de *S. aureus* em alguns casos, a utilização dessa técnica pode não ser prática em muitos laboratórios por exigir maior processamento e mão-de-obra.

No presente estudo, a pré-incubação de amostras aumentou a recuperação de patógenos da mastite sem, no entanto, aumentar o número de amostras contaminadas. Sol et. al (2002) também reportaram melhorias no isolamento de patógenos da mastite quando utilizando técnica similar. A sensibilidade relativa do Petrifilm foi similar ao método pré-incubado. Ambos os métodos aumentaram o isolamento de *S. aureus*, porém o método pré-incubado requer um período maior para o diagnóstico.

O uso de amostras compostas de leite é sempre preferida por criadores por reduzir custos do diagnóstico (Ruegg e Reinemann, 2002). A sensibilidade relativa de uma única amostra composta de leite para detectar *S. aureus* foi estimada em 63% (Lam et al., 1996). No presente experimento, os resultados de amostras compostas processadas com o método padrão mostraram a menor sensibilidade, devendo esta metodologia ser evitada em situações onde resultados falso-negativos são indesejáveis. Algumas situações práticas seriam na introdução de novos animais ou em programas de segregação. Lam et al. (1996) aumentaram a sensibilidade relativa de amostras compostas através da utilização de amostragens múltiplas e pelo aumento do volume do inóculo.

Neste estudo, em amostras compostas, a sensibilidade do Petrifilm Staph Express foi equivalente a técnicas tradicionais. O Petrifilm deve ser recomendado em situações que exijam decisões rápidas ou quando um método simplificado seja importante (programas de cultivo dentro da fazenda). Em rebanhos onde um trabalho de segregação tenha sido implementado com o objetivo de controlar *S. aureus*, avaliação de amostras de leite de vacas pós-parto é sempre recomendada. O uso de Petrifilm nessas situações pode resultar em diagnósticos mais rápidos e em melhor eficiência do controle do patógeno.

Segundo informações do fabricante, o aparecimento de colônias vermelho-violetas na primeira incubação do Petrifilm Staph Express sugere presuntivamente o diagnóstico de *S. aureus*. Resultados do experimento 4 não suportam essa recomendação para amostras de leite e demonstram a necessidade de utilização do disco Staph Express Disk para confirmação mesmo quando as colônias vermelho-violetas são as únicas encontradas. Das cartelas classificadas como tendo colônias vermelho-violetas (n = 35), somente oito foram confirmadas como sendo *S. aureus*. Portanto, recomendações da utilização de Petrifilm Staph. Express devem também incluir a utilização do disco confirmatório (Staph Express Disk).

O diagnóstico de *S. aureus* através do uso do Petrifilm Staph Express é dependente da habilidade de indivíduos de observar as variações de cores das colônias após a segunda incubação. Diferentes intensidades de zonas róseas aparecem ao redor das

colônias após incubação com o disco Staph Express. No presente estudo, nenhum esforço foi feito no sentido de treinar indivíduos ou de padronizar critérios interpretativos. Resultados demonstraram que a habilidade de caracterizar a intensidade das zonas róseas influencia fortemente a especificidade do método. Portanto, é importante que pessoas responsáveis por ler as cartelas tenham boas condições visuais e capacidade de discernir cores. Em casos onde diferentes indivíduos estejam lendo as cartelas, é importante que treinamento adequado seja realizado para padronizar os critérios interpretativos. O treinamento deveria incluir observações de Petrifilm Staph Express de amostras que tenham sido sabidamente inoculadas com *S. aureus* e SCN. Em circunstâncias onde resultados falso-positivos são altamente indesejáveis, colônias do Petrifilm podem ser confirmadas através dos métodos laboratoriais tradicionais.

O uso do Petrifilm para programas de cultivo dentro da própria fazenda é atraente devido à simplicidade do uso, em comparação com o método microbiológico padrão. As variações observadas na leitura das cartelas de Petrifilm demonstram que o treinamento e a padronização das pessoas envolvidas é fundamental para se atingir resultados confiáveis. Além disso, verificação periódica das análises feitas dentro da fazenda deve ser feita através do envio de amostras em duplicatas para laboratórios especializados de microbiologia. Nessas circunstâncias, o uso do Petrifilm em fazendas reduziria o tempo entre a obtenção das amostras e o diagnóstico, permitindo aos criadores intervir nos programas de controle e tratamento em rebanhos com problemas de mastite causada por *S. aureus*.

5. CONCLUSÕES:

Resultados dos experimentos demonstram potencial para utilização do Petrifilm Staph Express Count Plate como ferramenta de diagnóstico em programa de avaliação de rebanho quando *S. aureus* é o agente de interesse. Petrifilm foi altamente sensível, mas variou em especificidade de acordo com os critérios interpretativos e o nível de treinamento de pessoas. Os resultados desses experimentos com Petrifilm evidenciam a importância de confirmar alguns resultados positivos (zonas róseas fracas) através do uso

do método laboratorial padrão em situações onde alta sensibilidade e especificidade são requeridas. Os resultados também sugerem que a padronização dos critérios de interpretação é fundamental para a obtenção de resultados consistentes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

DINSMORE, R. P.; ENGLISH P. B.; GONZALEZ R.N. et al. Use of augmented cultural techniques in the diagnosis of the bacterial cause of clinical mastitis. *J Dairy Sc*, v.75, p.2706-2712, 1992.

EBERHART, R. J.; NATZKE R. P.; NEWBOULD F. H. S. et al. Coliform mastitis – a review. *J Dairy Sci*, v.62, p.1-22, 1979.

HILL, A. W.; SHEARS A. L.; HIBBITT K. G. The elimination of serum-resistant *Escherichia coli* from experimentally infected single mammary glands of healthy cows. *Res. Vet. Sci*, v.25, p.89-93, 1978.

HOGAN, J. S.; SMITH, K. L.; HOBLET, K. H. et al. Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds. *J. Dairy Sci*, v.72. p.1547-1556, 1989.

LAM, T. J. G. M.; VAN WUYCKHUISE L. A.; FRANKEN, P. et al. Use of composite milk samples for diagnosis of *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc*, v.208, p.1705-1708, 1996.

MAKOVEC J. A; RUEGG P. L. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *J. Dairy Sci*, v.86, p.3466-3472, 2003.

MARTIN, S. W.; MEEK, A. H.; WILLEBERG P. *Veterinary Epidemiology*. Ames: Iowa State Univ Press, 1987.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis. Natl Mastitis Counc Inc, Madison WI, 1999.

NEWBOULD, F. H. S.; NEAVE, F. K. The recovery of small numbers of *Staphylococcus aureus* infused into the bovine teat cistern. *J Dairy Res*, v.32, p.157-162, 1965.

RUEGG, P. L. Lactation therapy and milk quality. In: ANNUAL MEETING OF THE NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Proceedings of the annual meeting of the National Mastitis Council, Verona, WI, 2004. p.4-7.

RUEGG, P. L.; REINEMANN D. J. Milk Quality and Mastitis Tests. *Bovine Practitioner*, v.36, p.41-54, 2002.

SAS INSTITUTE. SAS User's Guide: Statistics, version 8, ed. 2. SAS Inst., Inc., Cary, NC, 1999.

SEARS, P. M.; SMITH, B. S.; ENGLISH, P. B. et al. Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections. *J. Dairy Sci*, v.73, p.2785-2790, 1990.

SIAMAK, P. Y.; SORUM, H.; LARSEN H. J. S. et al. Rapid method for detection of Gram-positive and -negative bacteria in milk from cows with moderate or severe clinical mastitis. *J. Clin. Microbiology*, v.39, n.9, p.3228-3233, 2001.

SMITH, K. L.; TODHUNTER D. A.; SHOENBERGER P.S. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. *J. Dairy Sci*, v.68, p.1531-1553, 1985.

SOL, J.; SAMPIMON O. C.; HARTMAN E. et al. Effect of preculture freezing and incubation on bacteriological isolation from subclinical mastitis samples. *Vet. Microbiology*, v.85, p.241-249, 2002.

THRUSHFIELD, M. V. *Veterinary Epidemiology*. Ed. 2. Oxford, UK: Blackwell Science, 1995.

Villanueva, M. R.; Tyler, J. W.; Thurmond, M. C. Recovery of *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* from fresh and frozen bovine milk. *J Am Vet Med Assoc*, v.198, p.1398-1400, 1991.

ZECCONI, A.; PICCININI R.; ZEPPONI A. et al. Recovery of *Staphylococcus aureus* from centrifuged quarter milk samples. *J. Dairy Sci*, v.80, p.3058-3063, 1997.

CAPÍTULO 3

UTILIZAÇÃO DE UMA VACINA COMERCIAL DURANTE A LACTAÇÃO EM VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA CAUSADA POR *STAPHYLOCOCCUS* *AUREUS*

1. INTRODUÇÃO:

A mastite é a enfermidade de maior frequência e que ocasiona os maiores prejuízos em rebanhos leiteiros. Perdas por mastite são ocasionadas tanto na sua forma clínica como na forma subclínica. Descarte de leite, gastos com medicamentos e mão de obra, queda na produção, descarte e morte de animais são alguns dos fatores de prejuízo (Ruegg e Reinemann, 2002).

Mastite causada por *S. aureus* é uma infecção difícil de ser debelada e a presença de vacas cronicamente infectadas ameaça as outras do rebanho. De uma maneira geral, tratamentos durante a lactação são pouco eficazes e tratamentos na secagem possuem eficiência de 40 a 70% (Nickerson, 1993).

Os efeitos da imunização de vacas leiteiras contra *S. aureus* foram estudados extensivamente (Derbyshire, 1960; Derbyshire e Smith, 1969; Watson, 1974; Brock et al., 1975; Kume et al., 1976; Kume e Murase, 1976; Janovics e Armitage, 1977; McDowell e e Newby e Bourne, 1977). Os efeitos esperados da imunização são muitos e dependentes da situação de cada rebanho, busca-se a prevenção de novas infecções, cura das infecções existentes, redução da frequência e da severidade dos casos clínicos. No entanto, é improvável que uma vacina seja capaz de atingir todos esses objetivos. Imunização efetiva é difícil devido à própria natureza do leite e da glândula mamária (Yancey, 1993). O volume de leite presente na glândula dilui o número de células do sistema imune disponíveis para debelar a infecção e os componentes do leite como a gordura e a caseína diminuem o poder bactericida destas células.

Estudos iniciais com bacterinas de *S. aureus* durante a lactação são bastante controversos. Derbyshire (1961) e Blobel e Berman (1962) demonstraram que a vacinação reduziu a taxa de casos clínicos, mas não preveniu novas infecções intramamárias (IIM). Em contraste, Pearson (1959) relatou que a vacinação contra *S. aureus* não preveniu e nem controlou infecções.

A bacterina de *S. aureus* Lavac[®] Staph (Boehringer Ingelheim, St. Joseph, MO) é uma vacina disponível comercialmente contra mastite causada por *Staphylococcus aureus*. De acordo com Ma, et al. (2004), as cinco cepas de *S. aureus* utilizadas na fabricação da vacina representam um sorotipo 5, dois sorotipos 8 e dois sorotipos 336, os três sorotipos predominantes como causa da mastite bovina. A serotipagem baseada nos polissacarídeos capsulares têm sido de grande importância no desenvolvimento e pesquisa de vacinas. O adjuvante empregado é o hidróxido de alumínio.

Vários estudos já foram conduzidos utilizando esta bacterina (Williams et al., 1966; Williams et al., 1975; Pankey et al., 1985 e Nickerson et al., 1999). Williams et al., (1966, 1975) demonstraram que a bacterina reduziu significativamente infecções intramamárias experimentais, contagem de células somáticas (CCS) em mastites agudas e casos clínicos de mastite. Pankey et al. (1985) demonstraram que a vacinação foi eficaz em aumentar a taxa de cura espontânea, mas não influenciou a incidência de *S. aureus* após desafio experimental. A CCS de quartos infectados também foi reduzida no grupo vacinado neste estudo durante três lactações. Finalmente, a eficácia da vacina foi comprovada em um estudo a campo com novilhas leiteiras. Novilhas vacinadas apresentaram menor frequência de infecção intramamária causada por *S. aureus* antes ou durante a prenhez, e ainda, ao parto (Nickerson et al., 1999).

O objetivo deste experimento foi de avaliar os efeitos da utilização da bacterina comercial Lavac[®] Staph (Boehringer Ingelheim, St. Joseph, MO, EUA) em vacas com mastite subclínica por *S. aureus* e mantidas segregadas durante a lactação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS:

2.1. Animais e instalações

Oitenta e sete vacas holandesas em lactação, produção média na lactação de 7800 Kg, alojadas em sistema "free-stall", de um rebanho comercial localizado em Minas Gerais foram utilizadas. O rebanho foi escolhido devido à detecção de 58% de prevalência de *S. aureus* em 230 vacas em lactação. Segregação de animais positivos foi implementada e todos os animais avaliados faziam parte do grupo de animais com pelo menos um diagnóstico positivo para *S. aureus*. Ao início do experimento a CCS do tanque de expansão era em torno de 700.000 céls. / mL e a fazenda adotava todos os procedimentos básicos de controle e prevenção da mastite como desinfecção dos tetos ao início e final da ordenha (pré e pós-dipping) e terapia de vaca seca.

2.2. Período experimental

O trabalho foi desenvolvido em duas etapas de 120 dias em cada. A primeira etapa foi de janeiro a abril, a segunda de agosto a novembro de 2004 utilizando-se 43 e 44 vacas, respectivamente.

2.3. Delineamento estatístico e tratamentos

O delineamento estatístico foi o de blocos ao acaso com parcelas subdivididas. Um total de 44 vacas foram vacinadas com uma bactéria comercial Lavac[®] Staph (Boehringer Ingelheim, St. Joseph, MO) e 43 foram mantidas sem vacinação (grupo controle). Duas doses de 5 mL da vacina foram administradas por via intramuscular, intercaladas de 14 dias de acordo com recomendações do fabricante. Os grupos de animais foram balanceados levando-se em consideração a CCS, ordem de parição e dias em lactação.

2.4. Coletas e análises laboratoriais

Para análise bacteriológica dos quartos mamários e condução do CMT foram feitas oito coletas nos seguintes períodos -7, 0, 30, 60, 90, 106, 113 e 120 dias relativos à primeira vacinação. A coleta de amostras para cultivo bacteriano se deu em frascos estéreis de 10 mL logo após a preparação dos tetos para a ordenha e sanitização com algodão embebido em álcool absoluto de acordo com recomendações do National Mastitis Council (1999). As amostras foram congeladas logo após a coleta e remetidas após um máximo de 3 dias para o laboratório de qualidade do leite da EMBRAPA - Gado de leite (Juiz de Fora, MG). O teste do California Mastitis Test (CMT) foi conduzido logo após a coleta da amostra para bacteriologia. A CCS, a produção e a composição do leite individual por vaca foram avaliadas mensalmente. Para composição do banco de dados foram consideradas as coletas realizadas entre os meses -1 a +4 relativos a primeira vacinação.

Para análise bacteriológica as amostras de leite foram descongeladas e uma alíquota de 0,01 mL foi semeada em ágar sangue sendo todo crescimento bacteriano verificado em 24 e 48 horas de incubação a 37°C. *S. aureus* foi identificado pelo padrão hemolítico, característica de coloração no Gram, reação positiva à prova de catalase, ágar manitol e coagulase (National Mastitis Council, 1999). Outros resultados bacterianos foram reportados como *Streptococcus* sp., *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN), *Corynebacterium* sp., coliformes e outros.

Amostras foram consideradas contaminadas se três ou mais tipos de colônias fossem encontrados. Culturas foram consideradas negativas quando menos de 3 colônias foram encontradas na placa exceto para *S. aureus* onde a presença de ≥ 1 colônia foi considerado resultado positivo. O número de colônias de *S. aureus* foi registrado para efeito de análises comparativas.

Amostras de leite para análise de CCS e componentes do leite foram remetidas em frascos contendo conservante bronopol (2-bromo 2-nitropropano 1,3-diol), na proporção de 10mg de princípio ativo para 40mL de leite. A análise foi realizada no equipamento Bentley 2000 (Bentley inc., MN) no laboratório de qualidade de leite da EMBRAPA – Gado de leite (Juiz de Fora, MG).

2.5. Critérios e definições de “status”

O quarto mamário foi considerado a unidade experimental para avaliação estatística dos resultados bacteriológicos e de CMT. Ao início do experimento, um quarto mamário foi considerado positivo para *S. aureus* mediante um único resultado positivo em duas análises bacteriológicas consecutivas (-7 e 0 dias). O quarto mamário positivo ao início do experimento foi considerado curado ao final do experimento mediante resultados negativos em 3 análises bacteriológicas consecutivas (106, 113 e 120 dias). Resultados positivos de quartos mamários considerados negativos ao início do experimento foram considerados como novas infecções. A definição de cura destas novas infecções ao final do experimento seguiu o mesmo critério adotado anteriormente sendo necessárias três análises consecutivas negativas (106, 113 e 120 dias).

2.6. Análises estatísticas

Os dados das duas etapas do experimento foram combinados e analisados utilizando-se o pacote estatístico SAS (SAS, 1999). Para avaliação da cura, somente quartos positivos ao início do experimento foram avaliados. Para avaliação de novas infecções, somente quartos negativos ao início do experimento foram avaliados. A associação entre os tratamentos e a taxa de cura ou a taxa de novas infecções foi verificada através do teste do qui-quadrado (χ^2). Desta mesma forma foi verificada a associação entre os tratamentos e as prevalências de diagnósticos microbiológicos durante os diferentes períodos de coleta. Em ocasiões onde o número da amostragem foi inferior a 30 por tratamento ($n < 30$), o teste exato de Fisher foi utilizado para comparações.

Os dados de CMT e número de colônias de *S. aureus* foram separados entre quartos positivos e negativos para *S. aureus* ao início do experimento. O CMT foi classificado em escala de 0 a 5 e os resultados comparados através do método estatístico Kruscall-Wallis, para dados não paramétricos. Os números de colônias foram transformados para base logarítmica natural (ln) e os resultados comparados através do teste t levando-se em consideração o erro tipo III e o delineamento em parcelas subdivididas para comparação entre grupos (SAS, 1999) (Tabela 1).

Tabela 1. Modelo da análise de variância para variável número de colônias.

Fator de Variação	Quartos positivos para <i>S. aureus</i>	Quartos negativos para <i>S. aureus</i>
	gl	gl
Total (parcelas)	95	205
Tratamento	1	1
Etapas	1	1
Blocos (Qtos mamários)	47	102
Erro (a)	46	101
Total (subparcelas)	383	823
Período	3	3
Tratamento x Período	3	3
Subblocos	95	205
Erro (b)	282	612

A produção e a composição do leite dos animais foram comparadas utilizando o teste de t sendo considerado o erro tipo III e o delineamento em parcelas subdivididas para comparação entre grupos (SAS, 1999) (Tabela 2). A CCS foi transformada para base logarítmica natural (ln). As produções aos 30, 60, 90 e 120 dias após a vacinação foram utilizadas para comparação de médias considerando separadamente os animais positivos e negativos para *S. aureus* ao início do experimento. Um animal foi considerado positivo para *S. aureus* mediante uma análise positiva em pelo menos um quarto mamário nas duas coletas consecutivas que antecederam o experimento (-7 e 0 dias).

Tabela 2. Modelo da análise de variância para dados de produção e composição do leite.

Fator de Variação	Vacas positivas para <i>S. aureus</i>	Vacas negativas para <i>S. aureus</i>
	gl	gl
Total (parcelas)	61	15
Tratamento	1	1
Etapas	1	1
Blocos (Animais)	30	7
Erro (a)	29	6
Total (subparcelas)	247	63
Período	3	3
Tratamento x Período	3	3
Subblocos	61	15
Erro (b)	180	42

Tabela 3. Número de vacas e quartos mamários avaliados durante o experimento.

	“Status” para <i>S. aureus</i> ^{1*}	Tratamento	
		Controle	Vacinado
Vacas	Positivas	31	32
	Negativas	9	9
	Total	40	41
Quartos mamários	Positivos	50	48
	Negativos	103	113
	Total	153	161

¹ *S. aureus* = *Staphylococcus aureus*

*“Status” definido após dois cultivos microbiológicos consecutivos anteriores ao início do experimento (-7 e 0 dias relativos a primeira vacinação).

3. RESULTADOS:

Seis vacas foram excluídas do estudo por motivos diversos como secagem e antibioticoterapia intramamária ou sistêmica. Dessas, três eram do grupo controle e três do grupo vacinado. Portanto, um total de 40 vacas e 153 quartos foram avaliados no grupo controle e 41 vacas e 161 quartos no grupo vacinado. A Tabela 3 mostra o total de vacas e quartos mamários avaliados e o “status” microbiológico para *S. aureus* de cada grupo ao início do experimento.

As taxas de cura de quartos mamários ao final do experimento foram de 6,0% e 12,5% para os grupos controle e vacinado, respectivamente, não havendo diferença entre

os grupos ($P = 0,265$). Também, as frequências de diagnósticos para *S. aureus* nos períodos de coletas em quartos previamente positivos não foram diferentes (Tabela 4).

Tabela 4. Frequência de diagnóstico de *Staphylococcus aureus* e taxa de cura aos 120 dias, de quartos mamários infectados ao início do experimento.

Tratamento	Diagnóstico de <i>S. aureus</i>	Dias relativos à vacinação				
		0 ¹	30	60	90	120 ²
Controle	Positivos	50	45	46	44	47
	Negativos	0	2	3	5	3
	Taxa de Cura					6,0%
Vacinado	Positivos	48	41	40	38	42
	Negativos	0	6	8	10	6
	Taxa de Cura					12,5%
Teste Qui-Quadrado*			0,141	0,103	0,149	0,265

¹Resultados combinados de duas coletas (-7 e 0 dias relativos a vacinação)

²Resultados combinados de três coletas (106, 113 e 120 dias relativos a vacinação)

A taxa de novas infecções de *S. aureus* ao final dos 120 dias não foi diferente entre os grupos, sendo de 25,2% para o grupo controle e 21,2% para o grupo vacinado ($P = 0,486$). A frequência de diagnóstico de *S. aureus* em quartos considerados negativos ao início do experimento foi significativamente superior no grupo vacinado aos 60 dias pós vacinação ($P = 0,018$) porém, nos outros períodos esta diferença não se manteve (Tabela 5).

Tabela 5. Frequência de diagnóstico de *Staphylococcus aureus* e taxa de novas infecções aos 120 dias, de quartos mamários negativos ao início do experimento.

Tratamento	Diagnóstico de <i>S. aureus</i>	Dias relativos à vacinação*				
		0 ¹	30	60	90	120 ²
Controle	Positivos	0	9	6 ^b	16	26
	Negativos	103	88	89	84	77
	Taxa de novas infecções					25,2%
Vacinado	Positivos	0	10	18 ^a	15	24
	Negativos	113	98	87	96	89
	Taxa de novas infecções					21,2%
Teste Qui-Quadrado			0,990	0,018	0,611	0,486

¹Resultados combinados de duas coletas (-7 e 0 dias relativos a vacinação)

²Resultados combinados de três coletas (106, 113 e 120 dias relativos a vacinação)

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre grupos (P < 0,05)

A taxa de cura aos 120 dias de novas infecções contraídas até 90 dias pós vacinação foi avaliada. Em ambos os grupos, 23 novas infecções foram encontradas durante este período sendo que 34,8% e 43,5% estavam curadas aos 120 dias, respectivamente, nos grupos controle e vacinado, não diferenciando significativamente (P = 0,4522) (Tabela 6).

Tabela 6. Frequência de novas infecções por *Staphylococcus aureus* e taxa de cura de quartos mamários aos 120 dias.

Tratamento	Infecções por <i>S. aureus</i>	Dias relativos à vacinação				Taxa de Cura
		30	60	90	Total	
Controle	Novas ¹	9	4	10	23	34,8 %
	Persistiram ²	6	3	6	15	
	Curaram ³	3	1	4	8	
Vacinado	Novas ¹	10	11	2	23	43,5%
	Persistiram ²	8	4	1	13	
	Curaram ³	2	7	1	10	
Teste Exato de Fisher						0,452

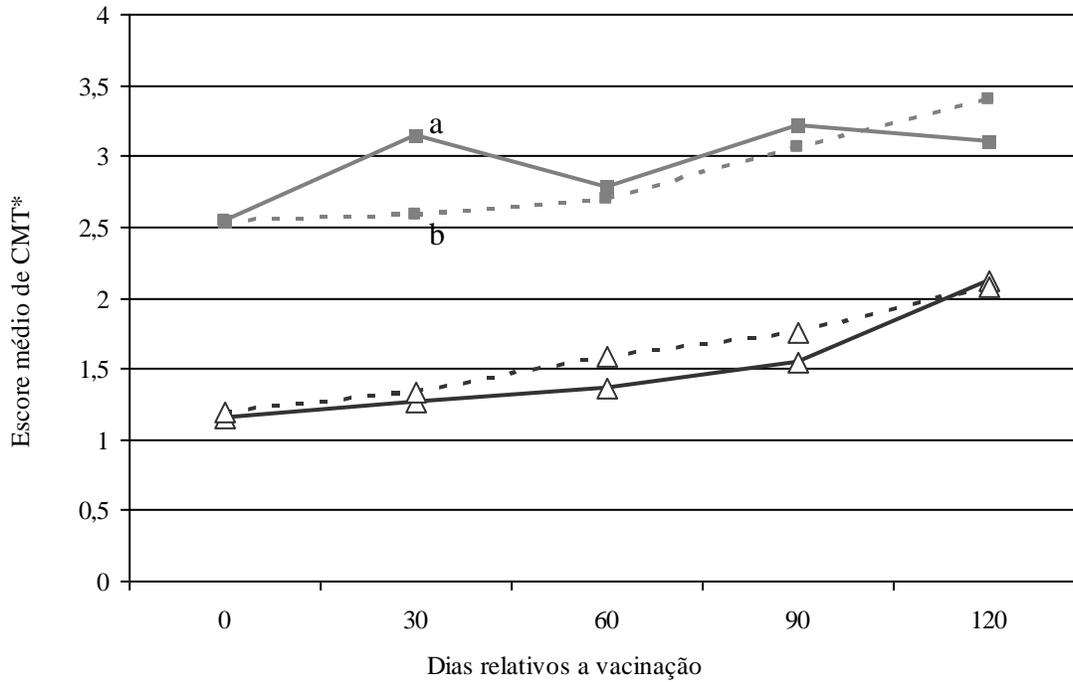
¹Uma vez positivos quartos não são elegíveis a nova infecção no experimento

²Quartos positivos nas coletas dos dias 106, 113 ou 120 do experimento

³Quartos negativos nas coletas dos dias 106, 113 e 120 do experimento

Os escores de CMT de quartos previamente positivos para *S. aureus* foram significativamente reduzidos no grupo vacinado aos 30 dias pós-vacinação em comparação ao grupo controle ($P < 0,05$). Nos outros períodos não houve diferenças estatísticas entre grupos. Nos quartos negativos para *S. aureus* ao início do experimento não houve efeito da vacinação em nenhum dos períodos de coleta avaliados (Figura 1). Nos quartos positivos para *S. aureus* ao início do experimento houve tendência de menores contagens de colônias de *S. aureus* no grupo vacinado em relação ao grupo controle ($P = 0,1170$). Já nos quartos negativos, não houve diferença entre as contagens médias de colônias dos grupos ($P = 0,985$) (Figura 2).

Figura 1. Média ponderada de escores de CMT de quartos mamários em diferentes períodos de coleta.



—■—	Positivos Controle	1	- -■- -	Positivos Vacinado	1
—△—	Negativos Controle	2	- -△- -	Negativos Vacinado	2

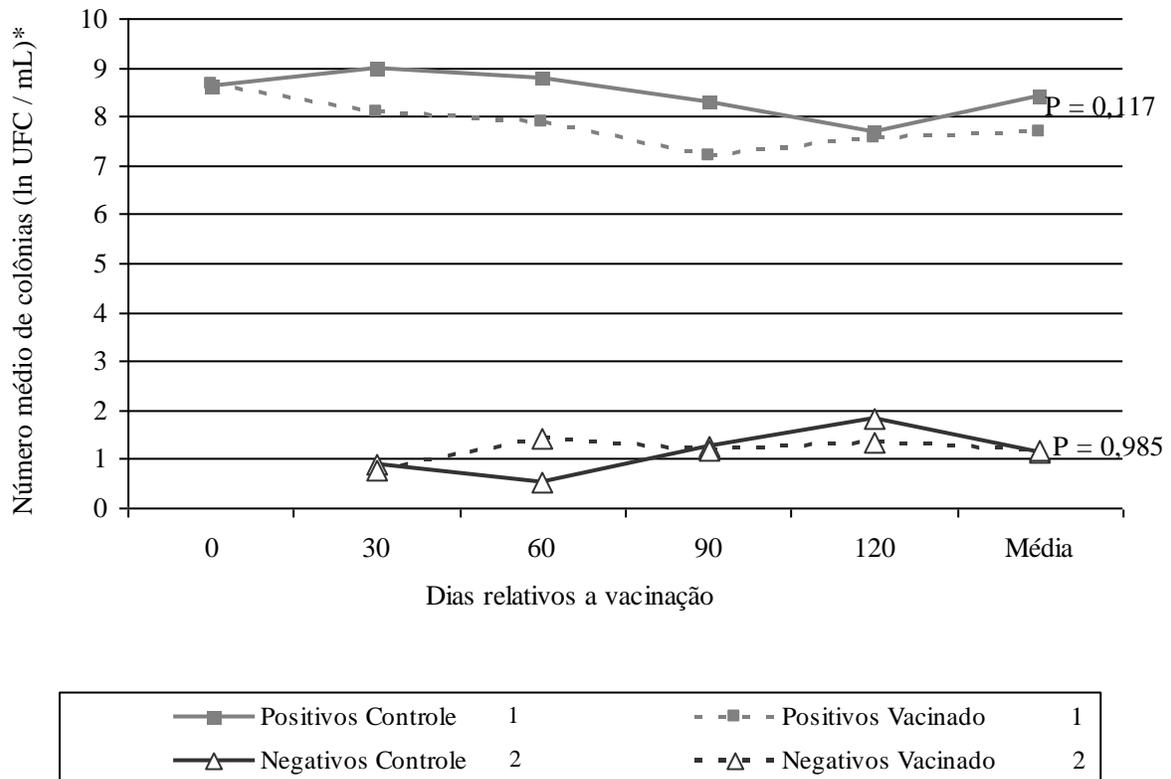
*Média ponderada dos escores de CMT de quartos mamários

¹ Banco de dados 1. Quartos positivos para *Staphylococcus aureus* ao início do experimento. n = 50 e 48, respectivamente, para tratamentos controle e vacinado.

² Banco de dados 2. Quartos negativos para *Staphylococcus aureus* ao início do experimento. n = 101 e 112, respectivamente, para tratamentos controle e vacinado.

Letras diferentes no mesmo período de coleta indicam diferenças significativas entre grupos do mesmo banco de dados ($p < 0,05$).

Figura 2. Contagem média de colônias de *Staphylococcus aureus* em quartos mamários em diferentes períodos de coleta.



*Contagem de colônias convertida para base logarítmica natural (ln)

¹ Banco de dados 1. Quartos positivos para *Staphylococcus aureus* ao início do experimento. n = 50 e 48, respectivamente, para tratamentos controle e vacinado.

² Banco de dados 2. Quartos negativos para *Staphylococcus aureus* ao início do experimento. n = 103 e 112, respectivamente, para tratamentos controle e vacinado.

Devido ao extravio de material, metade das amostras de composição do leite do segundo mês pós-vacinação foram perdidas. Não houve efeito da vacinação sobre a produção de leite e de sólidos do leite, ou sobre os teores de proteína do leite e CCS de vacas positivas para *S. aureus* (Tabela 7). No entanto, vacas vacinadas tenderam a produzir leite com maior teor de gordura em relação a vacas do grupo controle (P = 0,096).

Tabela 7. Produção e composição média do leite de vacas positivas para *Staphylococcus aureus* ao início do experimento e submetidas ou não à vacinação.

Componente ¹	<i>Tratamento</i>		<i>EPM</i> ²	P
	Controle	Vacinado		
Leite (kg/dia)	22,8	23,9	2,495	0,347
Gordura (kg/dia)	0,737	0,839	0,112	0,142
Proteína (kg/dia)	0,688	0,738	0,077	0,198
Gordura (%)	3,22	3,54	0,313	0,096
Proteína (%)	3,05	3,12	0,128	0,122
Ln CCS	6,289	6,240	0,721	0,896
CCS (1.000 céls/mL)	876	999		

¹ Média de 31 vacas no grupo controle e 32 no grupo vacinado durante 4 períodos pós vacinação (30, 60, 90 e 120d).

² EPM = erro padrão da média

Os agentes mais freqüentemente isolados das amostras de quartos mamários remetidas para cultivo microbiológico foram *Staphylococcus aureus* (35,1%), *Staphylococcus coagulase negativo* (4,9%), *Corynebacterium* sp. (4,6%) e *Streptococcus* sp. (3,7). Vacas vacinadas tiveram menor frequência de diagnósticos microbiológicos para *S. aureus* se comparadas ao grupo controle (Tabela 8).

Tabela 8. Frequência de diagnósticos microbiológicos em amostras de quartos mamários coletadas em 8 períodos durante 127 dias.*

Diagnóstico Microbiológico	Tratamento				Qui-quadrado
	Controle		Vacinado		
	n	%	n	%	
<i>S. aureus</i> ¹	454	37,8 ^a	415	32,6 ^b	0,009
<i>Streptococcus sp.</i> ²	45	3,8	47	3,7	0,962
<i>Corynebacterium sp</i>	47	3,9	66	5,2	0,123
S.C.N. ³	51	4,3	71	5,5	0,120
Outros ⁴	23	1,9 ^a	9	0,7 ^b	0,008
Negativo ⁵	567	47,2	644	50,6	0,070
Contaminado ⁶	13	1,1	21	1,7	
Total	1.200	100,0	1.273	100,0	

*Períodos de coleta: -7, 0, 30, 60, 90, 106, 113, 120 dias relativo a vacinação.

¹*Staphylococcus aureus*; ²*Streptococcus sp.*(*Streptococcus agalactiae* não foi encontrado nas amostras de leite); ³*Staphylococcus coagulase* negativo; ⁴*Enterococcus sp*, coliformes, *Bacillus sp* e leveduras; ⁵Sem crescimento bacteriano; ⁶≥ 3 tipos de colônias.

4. DISCUSSÃO:

A correta avaliação da eficácia de uma vacina para *S. aureus* deve levar em consideração fatores biológicos inerentes ao microrganismo. A capacidade de colonização, aderência, invasão e destruição do epitélio glandular além da evasão aos mecanismos de defesa são fatores que permitem a sobrevivência crônica do *S. aureus* no interior da glândula mamária. A duração da infecção, associada à natureza e extensão das lesões existentes influencia na taxa de cura dessas infecções. Quanto mais antiga a infecção e maior o número de quartos acometidos, menores são as chances de cura através da antibioticoterapia (Sears e McCarthy, 2003). Portanto, a correta descrição dos casos estudados deve ser procedida com a comparação das taxas de cura, persistência e incidência obtidas nos experimentos.

Além disso, *S. aureus* é um agente que é eliminado de forma cíclica e em baixo número no leite (Sears et al., 1990). Este comportamento dificulta a correta determinação do status infeccioso da glândula mamária, fator essencial para condução de pesquisa sobre mastite. Vacinas de *S. aureus* reduzem ainda mais a quantidade de microorganismos eliminados (Calzolari et al., 1997). Portanto, a adoção de critérios que

elevem a sensibilidade para detecção de *S. aureus* é essencial. Silva et al. (2005) demonstraram que a sensibilidade do método diagnóstico foi aumentada de 65,6% para 87,5% quando o limite de detecção foi reduzido de 100 UFC/mL (método padrão) para 1 UFC/mL em amostras de quartos mamários coletados em uma única ordenha. Sears et al. (1990) demonstraram que a sensibilidade de uma amostra única para determinar o “status” infeccioso do quarto mamário foi de 74,5% sendo elevada para 94% e 98% quando 2 ou 3 amostras consecutivas foram incluídas.

Outro fator complicador se refere à dinâmica das infecções por *S. aureus* principalmente em estudos durante o período de lactação. O comportamento contagioso do agente dificulta a definição das taxas de cura e de incidência, visto que a exposição ocorre diariamente durante a ordenha. Portanto, essas taxas são dependentes da definição de critérios diagnósticos além da frequência de realização de exames. Estes critérios precisam ser claros e definidos nos experimentos a fim de permitir comparações e conclusões.

No presente experimento, foram adotados parâmetros conservadores sendo as taxas de cura e de novas infecções definidas somente após a realização de três exames bacteriológicos consecutivos ao final do experimento (106, 113 e 120 dias pós-vacinação). Também foram separadas as taxas de cura de infecções pré-existentes ao início daquelas adquiridas no decorrer do experimento. Além disso, dois exames consecutivos ao início do experimento foram utilizados para definir o “status” infeccioso dos quartos mamários dos animais.

No grupo vacinado, dos seis quartos previamente infectados e curados, cinco curaram na primeira etapa do experimento e somente um na segunda. Portanto, as taxas de cura variaram de 20% (5/25) a 4,3% (1/23) dependendo da etapa do estudo. Sears e MacCarthy (2003) mencionaram que a probabilidade de cura para *S. aureus* é dependente da duração da infecção, número de quartos infectados e status imune do animal. Estes foram, provavelmente, alguns dos fatores envolvidos na discrepância dos resultados obtidos em períodos e animais diferentes. Por outro lado, no grupo controle as taxas de

cura foram de 4,5% (1/22) e 7,1% (2/28) na primeira e segunda etapas, respectivamente. Isso demonstra um possível efeito curativo da vacina dependendo do tipo de animais e infecções existentes no rebanho.

No entanto, apesar do incremento de 108% na taxa de cura de infecções pré-existentes de *S. aureus*, a diferença não foi significativa em relação ao grupo controle aos 120 dias pós vacinação (6,0% vs 12,5%, respectivamente, para os grupos controle e vacinado). Portanto, levando em consideração a taxa de cura de infecções pré-existentes, a utilização da vacina durante a lactação em vacas portadoras de infecção subclínica por *S. aureus* não foi justificada.

Hwang et al. (2000), também trabalhando com infecções previamente existentes mas durante um período de 12 semanas, encontraram taxas de cura de 27% (9/33) para o grupo vacinado contra 5% (1/18) no grupo controle. Infelizmente, os critérios de cura não foram descritos, apesar dos exames bacteriológicos terem sido conduzidos em intervalos menores e com maior frequência que no presente estudo (12 exames, semanais). Comparações estatísticas também não foram relatadas provavelmente devido ao pequeno número de amostras por grupo.

A vacinação também não preveniu o surgimento de novas infecções. Dos quartos definidos como negativos, ao início do experimento, 25,2% mostraram-se positivos aos 120 dias no grupo controle, e 21,2% no grupo vacinado ($P = 0,486$). Esses dados estão de acordo com Pankey et al. (1985) que também não encontraram diferenças na incidência de *S. aureus* em um estudo com desafio experimental ao agente durante três lactações.

A alta incidência de *S. aureus* encontrada no atual experimento reflete o grande desafio a que estavam expostos os animais. Somente vacas com prévio diagnóstico positivo para *S. aureus* eram mantidas nesses grupos. Hwang et al. (2000), encontraram somente 3 novos quartos infectados em 22 vacas durante o estudo de 12 semanas.

As taxas de cura de infecções contraídas durante os primeiros 90 dias do experimento foram superiores às aquelas encontradas para infecções pré-existentes. Dos 23 quartos infectados até os 90 dias de experimento no grupo controle, 34,8% se encontravam curados aos 120 dias. No grupo vacinado, esse número foi de 43,5% também em 23 novas infecções. Pankey et al. (1985) encontraram aumentos de 55% a 76% na taxa de cura de novas infecções nos grupos vacinados em relação ao grupo controle. Essa mesma amplitude não foi encontrada no presente experimento sendo o aumento na ordem de 25% para o grupo vacinado, porém não significativo ($P = 0,4522$). Apesar do pequeno número de novas infecções para uma maior confiabilidade dos dados, pode-se dizer que o efeito curativo da vacina, se existente, foi inferior àquele relatado em animais submetidos à exposição experimental ao agente.

Calzolari et al. (1997), encontraram efeito redutor da vacinação sobre o número de colônias de *S. aureus* em quartos mamários com diagnóstico positivo. Isso sugere redução da severidade da infecção. As médias comparadas se referem a novas infecções contraídas durante o experimento. No presente experimento, a contagem média de colônias de quartos negativos ao início do experimento não diferenciou entre grupos não demonstrando efeito da vacinação na redução da severidade ou da incidência das infecções. Para o cálculo da média, quartos positivos e negativos foram considerados.

Nas infecções pré-existentes, houve tendência de menores números de colônias nos quartos do grupo vacinado em relação ao grupo controle ($P = 0,117$). Isso sugere efeito da vacinação na redução da severidade de infecções persistentes. Hwang et al. (2000), demonstraram redução no número de colônias em relação ao estado pré-vacinação no grupo vacinado, porém comparação estatística entre grupos não foi realizada.

Melhoria significativa na qualidade do leite de quartos mamários positivos para *S. aureus* foi observada. Nos quartos previamente infectados, 30 dias após a primeira vacinação o escore de CMT foi significativamente inferior ao escore de quartos do grupo controle. Nos outros períodos essa diferença não foi observada. Parte da explicação para

esse efeito temporário pode estar no fato de que o adjuvante existente na vacina, hidróxido de alumínio, geralmente estimula uma produção alta, mas não prolongada de anticorpos (Watson, 1988).

Os efeitos benéficos no quarto mamário não foram suficientes para influenciar os dados individuais de CCS, não sendo encontradas diferenças significativas na CCS do leite de vacas vacinadas em relação ao grupo controle.

A vacinação reduziu a freqüência de diagnósticos para *S. aureus*. Este efeito provavelmente pode ser atribuído ao efeito conjunto de cura e redução no número de microrganismos eliminados no leite, o que reduz a sensibilidade do método diagnóstico resultando em um maior número de resultados falso negativos.

5. CONCLUSÕES:

A vacinação de vacas com mastite subclínica por *S. aureus* durante a lactação e mantidas segregadas não deve ser recomendada. Os efeitos da vacinação na cura e prevenção de infecções por *S. aureus* não foram capazes de reduzir os efeitos do grande desafio a que estes animais estavam expostos. Outras estratégias devem ser estudadas com o intuito de reduzir o impacto deste grande desafio em rebanhos com alta prevalência de *S. aureus*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ASHWORTH, U.S.; FORSTER, T.L.; LUEDECKE, L.O. Relationship between California mastitis test reaction and leucocyte count, catalase activity, and A-esterase activity of milk from opposite quarters. *J Dairy Sci*, v.50, p. 1078-1082, 1967.

BLOBEL, H.; BERMAN D. T. Vaccination or dairy cattle against *Staphylococci* mastitis. *Amer J Vet Res*, v.23, p.7, 1962.

BROCK, J. H.; STEEL, E. D.; REITER, B. The effect of intramuscular and intramammary vaccination of cows on antibody levels and resistance to intramammary infection by *Staphylococcus aureus*. *Res Ve. Sc*, v.19, p. 152, 1975.

CALZOLARI, A.; GIRALDO, J. A.; RAMPONE, H. et al. Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 2. Evaluation in two commercial dairy herds. *J Dairy Sci*, v.80, p. 854-858, 1997.

DERBYSHIRE, J.B. Studies in immunity to experimental staphylococcal mastitis in the goat and cow. *J Comp Pathol*, v.70, p. 222, 1960.

DERBYSHIRE, J.B. Further immunological studies in experimental *Staphylococcus* mastitis. *J Comp Path Therap*, v.71, p.146, 1961.

DEBYSHIRE, J.B.; SMITH G.S. Immunization against experimental staphylococcal mastitis in the goat by intramammary infusion of cell-toxoid vaccine. *Res Vet Sci*, v.10, p.559, 1969.

HWANG, C.; PAK, S.; HAN, H. Effects of autogenous toxoid-bactein in lactating cows with *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *J Vet Med Sci*, v.62, n.8, p. 875-880, 2000.

JANOVICS, A.; ARMITAGE, R.E. The effect of single intracisternal dry cow administration of staphylococcal antigens and antibiotics on the incidence of staphylococcal bovine mastitis. *J South Afr Vet Assoc*, v.48, p.155, 1977.

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

KUME, T.; KIRAMUNE, T.; INUI S. ET AL. Experimental studies on the vaccination of dairy cattle against staphylococcal mastitis. *Bull Batl Inst Anim Health*, v.73, p.6, 1976.

KUME, T.; MURASE, N. Field use of *Staphylococcus aureus* vaccine in the control of bovine mastitis. *Bull Natl Inst Anim Health*, v.73, p.50, 1976.

MA J.; COCCHIARO J.; LEE J.C. Evaluation of serotypes of *Staphylococcus aureus* strains used in the production of a bovine mastitis bacterin. *J Dairy Sci*, v.87, p. 178-182, 2004.

MCDOWELL, G.H.; WATSON D.L. Immunity to experimental staphylococcal mastitis; Comparison of local and systemic immunization. *Aust Vet J*, v.50, p 533, 1974.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*. Natl. Mastitis Counc. Inc., Madison WI. 1999.

NEWBY, T.J.; BOURNE J. The nature of the local immune system of the bovine mammary system. *J Immunol*, v.118, p.461, 1977.

NICKERSON, S. C. Preventing new *Staphylococcus aureus* mastitis infections. *Vet Med*, v.33, p. 368-373, 1993.

NICKERSON, S.C.; OWENS, W.E.; TOMITA, G.M. et al. Vaccinating dairy heifers with a *S. aureus* bacterin reduces mastitis at calving. *Large Anim Practice*, v.20, p.16-28, 1999.

PANKEY, J. W.; BODDIE, N. T; WATTS, J. L. et al. Evaluation of protein A and a commercial bacterin as vaccines against *Staphylococcus aureus* mastitis by experimental challenge. *J Dairy Sci*, v.68, p. 726, 1985.

PEARSON J.K.L. Autogenous toxoid vaccine in the prophylaxis of staphylococcal mastitis in cattle. *J Dary Res*, v.26, p. 9, 1959.

RANDOLPH, H.E.; ERWIN, R.E. Influence of mastitis on properties of milk. X. Fatty acid composition. *J Dairy Sci*, v.57, p. 865-868.

RUEGG, P. L.; REINEMANN D. J. Milk Quality and Mastitis Tests. *Bovine Practitioner*, v.36, p.41-54, 2002.

SAS INSTITUTE. SAS User's Guide: Statistics, version 8, ed. 2. SAS Inst., Inc., Cary, NC, 1999.

SEARS PM; SMITH BS; ENGLISH PB et al. Shedding pattern of *S aureus* for the diagnosis of bovine intramammary infections. *J Dairy Sci*, v.73, p. 2785-2790, 1990.

SEARS P. M; MCCARTHY, K. K. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet Clin Food Anim*, v.19, p. 171-185, 2003.

SILVA, B.O.; CARAVIELLO D.Z.; RODRIGUES, A.C. et al. Evaluation of Petrifilm for the isolation of *Staphylococcus aureus* from milk samples. *J Dairy Sci*, v.88. n.8, p. 3000-3008, 2005.

WATSON D.L. Vaccination against experimental staphylococcal mastitis in ewes. *Res Vet Sci*, v.45, p.16, 1988.

WILLIAMS, J.M.; MAYERHOFER H.J.; BROWN, R.W. Clinical evaluation of a *Staphylococcus aureus* bacterin (polyvalent somatic antigen). *Vet Med Small Anim Clin*, v.61, p.789-794, 1966.

WILLAMS, J.M.; SHIPLEY, G.R.; SMITH, G.L. et al. A clinical evaluation of *Staphylococcus aureus* bacterin in the control of Staphylococcal mastitis in cows. *Vet Med Small Anim Clin*, v.70, p.587-594, 1975.

YANCEY R.J. Recent advances in bovine vaccine technology. *J Dairy Sci*, v.76, p.2418-2436, 1993.

CAPÍTULO 4

UTILIZAÇÃO DE UMA VACINA COMERCIAL EM ASSOCIAÇÃO À TERAPIA ANTIBIÓTICA INTRAMAMÁRIA NA SECAGEM EM VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA CAUSADA POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

1. INTRODUÇÃO:

A mastite é a doença mais dispendiosa do rebanho leiteiro. As perdas relativas à mastite são duas vezes mais elevadas do que as perdas relativas à infertilidade e doenças reprodutivas (Philpot e Nickerson, 2000).

S. aureus é um agente de grande sucesso como patógeno da glândula mamária. Higiene de ordenha, terapia de vaca seca (TVS), segregação e descarte de animais são algumas das estratégias adotadas para a redução de sua prevalência em rebanhos leiteiros. No entanto *S. aureus* ainda configura como o principal patógeno interferindo nos índices de mastite e de qualidade de leite em diversos rebanhos leiteiros.

O período seco é uma fase de mudanças anatômicas e fisiológicas para a glândula mamária, sendo o período crítico para controle da mastite. A terapia de vaca seca (TVS) é essencial e largamente utilizada para o controle da mastite. Consiste na administração intramamária de um antibiótico de longa ação logo após a última ordenha da lactação. A TVS atua tanto na prevenção de novas infecções quanto na cura de infecções pré-existentes. Do ponto de vista da mastite contagiosa, o período seco precedido pela TVS constitui um momento único para a eliminação de infecções crônicas e redução significativa desses agentes no rebanho. A TVS é altamente eficaz contra *Streptococcus agalactiae*, mas taxas de cura de *S. aureus* são menores e mais variáveis com relatos de 20 a 85% de cura (Oliver e Smith, 1982, Browning et al., 1990, Sol et al., 1994). Outros benefícios econômicos associados à TVS incluem redução da CCS, menor incidência de mastite clínica e aumento de produção na lactação subsequente (Osteras e Sandvik, 1996).

A bacterina de *S. aureus* Lavac[®] Staph (Boehringer Ingelheim, St. Joseph, MO) é uma vacina que tem em sua constituição cepas de *Staphylococcus aureus* produtoras de pseudocápsula. A pseudocápsula é uma fina camada que envolve a bactéria, tornando-a inacessível a neutrófilos, inibindo a fagocitose (Sears e McCarthy, 2003). Vacinas contendo amostras de *S. aureus* produtoras de pseudocápsula demonstraram eficácia em diversas situações (Williams et al., 1966, Williams et al., 1975, Pankey et al., 1985, Sears et al., 1990, Nordhaug et al., 1994, Sears, 1999, Nickerson et al., 1999). Pankey et al. (1985) e Williams et al. (1966 e 1975), demonstraram eficácia da vacina em aumentar a cura espontânea, reduzir a severidade das infecções por *S. aureus* além de reduzir a incidência de casos clínicos em vacas em lactação. Sears et al. (1990), trabalhando com novilhas, comprovaram reduzida taxa de infecção, menor prevalência de infecções crônicas e redução da severidade das infecções pós parto.

Os objetivos deste experimento foram de avaliar a utilização de uma vacina comercial contra *S. aureus* na secagem, em associação à antibioticoterapia, em vacas com mastite subclínica causada por *S. aureus*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS:

2.1. Animais e período experimental:

Noventa e duas vacas holandesas de um rebanho comercial localizado no estado de Minas Gerais foram utilizadas. Todas as vacas possuíam histórico de, pelo menos, um diagnóstico positivo para *S. aureus* na lactação e se encontravam segregadas daquelas consideradas negativas. O rebanho foi considerado inicialmente com uma prevalência de 58% de vacas lactantes positivas para *S. aureus*. Vacas foram secas no período de Novembro de 2003 a Outubro de 2004. O período seco médio foi de 90 ± 57 dias sendo 29 dias o período mínimo e 336 o período máximo.

2.2. Delineamento estatístico e tratamentos:

O delineamento estatístico foi de blocos ao acaso. Um total de quarenta e nove vacas foram vacinadas, no músculo semimembranoso, com uma bacterina comercial Lavac[®] Staph (Boehringer Ingelheim, St. Joseph, MO) e quarenta e três foram mantidas sem vacinação (grupo controle). Duas doses de 5 mL da vacina foram administradas por via intramuscular sendo a primeira no dia da secagem e a segunda 14 dias após de acordo com recomendações do fabricante. Antibiótico intramamário foi administrado em todos os quartos mamários de todas as vacas logo após a última ordenha (Mamizyn[®] S, Boehringer Ingelheim*). Os grupos foram balanceados levando em consideração a CCS e o número de lactações dos animais.

2.3. Coletas e análises laboratoriais:

Para análise bacteriológica dos quartos mamários foram feitas cinco coletas nos períodos -7 e 0 dias relativos a secagem e 0-7, 8-14 e 15-21 dias relativos ao parto subsequente. A coleta de amostras para cultivo bacteriano se deu em frascos estéreis de 10 mL logo após a preparação dos tetos para a ordenha e sanitização com algodão embebido em álcool 70 de acordo com recomendações do National Mastitis Council (NMC, 1999). As amostras foram congeladas logo após a coleta e remetidas após um máximo de 3 dias para o laboratório de qualidade do leite da EMBRAPA – Gado de leite, Juiz de Fora, MG.

Durante toda a lactação, a CCS, a produção e a composição do leite individual por vaca foram avaliadas mensalmente.

Para análise bacteriológica as amostras de leite foram descongeladas e uma alíquota de 0,01 mL foi semeada em ágar sangue sendo todo crescimento bacteriano verificado em 24 e 48 horas de incubação a 37°C. *S. aureus* foi identificado pelo padrão hemolítico, característica de coloração no Gram, reação positiva à prova de catalase, ágar manitol e coagulase (National Mastitis Council, 1999). Outros resultados bacterianos

foram reportados como *Streptococcus* sp., *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN), *Corynebacterium* sp., coliformes e outros.

Amostras foram consideradas contaminadas se três ou mais tipos de colônias foram encontrados. Culturas foram consideradas negativas quando <3 colônias foram encontradas na placa exceto para *S. aureus* onde a presença de ≥ 1 colônia foi considerado um resultado positivo.

Amostras de leite para análise de CCS e componentes do leite foram remetidas em frascos contendo conservante bronopol (2-bromo 2-nitropropano 1,3-diol), na proporção de 10mg de princípio ativo para 50mL de leite. As análises foram realizadas no equipamento Bentley 2000 (Bentley inc., MN) no laboratório de qualidade de leite da EMBRAPA – Gado de leite, Juiz de Fora, MG.

2.4. Critérios e definições de status:

O quarto mamário foi considerado a unidade experimental para avaliação estatística dos resultados bacteriológicos. Na secagem um quarto mamário foi considerado positivo para *S. aureus* mediante um único resultado positivo em duas análises bacteriológicas consecutivas (-7 e 0 dias). Um quarto mamário positivo na secagem foi considerado curado no parto subsequente mediante resultados negativos em três análises bacteriológicas consecutivas (0-7, 8-14 e 15-21 dias pós-parto). Resultados positivos pós-parto de quartos mamários considerados negativos na secagem foram considerados como novas infecções. Quartos que, por algum motivo, não obtiveram três resultados microbiológicos até os 21 dias pós-parto foram coletados até os 35 dias e os resultados considerados para o cálculo da taxa de cura e incidência.

Para comparação de dados microbiológicos, de produção e de composição do leite, o animal foi considerado positivo para *S. aureus* mediante uma análise positiva em pelo menos um quarto mamário nas duas coletas consecutivas que antecederam a secagem (-7 e 0 dias).

2.5. Análises estatísticas:

Os dados foram analisados utilizando-se o pacote estatístico SAS (SAS, 1999). Para avaliação da cura, somente quartos positivos na secagem foram avaliados. Para avaliação de novas infecções, somente quartos negativos na secagem foram avaliados. A associação entre os tratamentos e a taxa de cura ou a taxa de novas infecções foi verificada através do teste do qui-quadrado (χ^2). Desta mesma forma foi verificada a associação entre os tratamentos e as prevalências de diagnósticos microbiológicos durante os diferentes períodos de coleta. Devido ao limitado número da amostragem ($n < 30$ por tratamento), a avaliação dos dados de cura e incidência por vaca foram feitas pelo teste exato de Fisher.

A lactação dos animais que participaram do experimento foi acompanhada sendo os dados de encerramento aos 305 dias utilizados para comparação estatística. A CCS foi transformada para base logarítmica natural (ln). Os dados de produção e composição do leite foram comparados utilizando o teste de Duncan (Sas, 1999). As médias foram comparadas considerando separadamente os animais positivos e negativos para *S. aureus* na secagem. Os dados foram considerados estatisticamente diferentes quando ($P < 0,05$).

3. RESULTADOS:

Dezoito vacas foram excluídas por motivos diversos como tratamento antibiótico sistêmico, falta de exames bacteriológicos ou descarte. Dessas, 9 eram do grupo controle e 9 do grupo vacinado. A Tabela 1 mostra o total de vacas e quartos mamários avaliados e o status microbiológico para *S. aureus* de cada grupo na secagem.

A taxa de cura de quartos mamários de vacas submetidas à vacinação foi significativamente superior se comparada ao grupo controle ($P < 0,05$). Apesar da diferença de prevalência de diagnósticos não ser significativa em nenhum dos períodos de coleta pós-parto, ao combinar os resultados ficou comprovada a eficiência da vacina que curou 74% dos quartos contra 50% de cura no grupo controle (Tabela 2).

Tabela 1. Número de vacas e quartos mamários avaliados na secagem.

	Status para <i>S. aureus</i> ^{1*}	Tratamento	
		Controle	Vacinado
Vacas	Positivas	21	22
	Negativas	15	16
	Total	36	38
Quartos mamários	Positivos	28	38
	Negativos	84	87
	Total	112	125

¹ *S. aureus* = *Staphylococcus aureus*

*Status definido após 2 cultivos microbiológicos consecutivos anteriores à secagem (-7 e 0 dias relativos a secagem).

Tabela 2. Frequência de diagnóstico de *Staphylococcus aureus* e taxa de cura, pós-parto, de quartos mamários infectados na secagem e submetidos à terapia de vaca seca associada ou não à vacinação para *S. aureus*.

Tratamento	Diagnóstico de <i>S. aureus</i>	Dias relativos ao parto				
		Secagem ¹	0-7	8-14	15-21	Combinado ²
Controle	Positivos	28	5	9	7	14
	Negativos	0	16	17	14	14
	Taxa de Cura					50,0% ^b
Vacinado	Positivos	38	8	7	6	10
	Negativos	0	27	26	24	28
	Taxa de Cura					73,7% ^a
Teste Qui-Quadrado			0,935	0,258	0,287	0,048

¹Resultados combinados de duas coletas (-7 e 0 dias relativos à secagem). O quarto mamário foi considerado positivo mediante um único diagnóstico positivo.

²Resultados combinados de três coletas pós-parto. O quarto mamário foi considerado positivo mediante um único diagnóstico positivo.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre grupos ($P < 0,05$)

Oito quartos do grupo controle e 11 do grupo vacinado contraíram novas infecções por *S. aureus* sendo a incidência semelhante entre os grupos (Tabela 3).

As tabelas 4 e 5 mostram a frequência de diagnóstico, taxa de cura e taxa de novas infecções das análises onde o animal foi a unidade experimental. Houve tendência de maiores taxas de cura individuais para animais vacinados em relação ao grupo controle (41 e 19%, respectivamente) ($P = 0,109$). A incidência foi semelhante entre os grupos ($P = 0,641$).

Tabela 3. Frequência de diagnóstico de *Staphylococcus aureus* e taxa de novas infecções, pós-parto, de quartos mamários negativos na secagem e submetidos à terapia de vaca seca associada ou não à vacinação para *S. aureus*.

Tratamento	Diagnóstico de <i>S. aureus</i>	Dias relativos ao parto				
		Secagem ¹	0-7	8-14	15-21	Combinado ²
Controle	Positivos	0	3	5	5	8
	Negativos	84	79	68	65	76
	Taxa de novas infecções					9,5%
Vacinado	Positivos	0	9	9	5	11
	Negativos	87	72	71	73	76
	Taxa de novas infecções					12,6%
Teste Qui-Quadrado			0,069	0,347	0,859	0,516

¹Resultados combinados de duas coletas (-7 e 0 dias relativos à secagem). O quarto mamário foi considerado positivo mediante um único diagnóstico positivo.

²Resultados combinados de três coletas pós-parto. O quarto mamário foi considerado positivo mediante um único diagnóstico positivo.

Tabela 4. Frequência de diagnóstico de *Staphylococcus aureus* e taxa de cura, pós-parto, de vacas positivas na secagem e submetidas à terapia de vaca seca associada ou não à vacinação para *S. aureus*.*

Tratamento	Diagnóstico de <i>S. aureus</i>	Dias relativos ao parto				
		Secagem ¹	0-7	8-14	15-21	Combinado ²
Controle	Positivos	21	11	16	14	17
	Negativos	0	10	5	5	4
	Taxa de Cura					19,0%
Vacinado	Positivos	22	11	11	9	13
	Negativos	0	9	11	9	9
	Taxa de Cura					40,9%
Teste exato de Fisher					0,109	

*Vacas consideradas positivas para *S. aureus* mediante uma análise positiva em pelo menos um quarto mamário nas duas coletas consecutivas que antecederam a secagem

¹Resultados combinados de duas coletas (-7 e 0 dias relativos à secagem). A vaca é considerada positiva mediante um único resultado positivo.

²Resultados combinados de três coletas pós-parto. A vaca é considerada positiva mediante um único resultado positivo.

Tabela 5. Frequência de diagnóstico de *Staphylococcus aureus* e taxa de novas infecções, pós-parto, de vacas negativas na secagem e submetidas à terapia de vaca seca associada ou não à vacinação para *S. aureus*.

Tratamento	Diagnóstico de <i>S. aureus</i>	Dias relativos ao parto				
		Secagem ¹	0-7	8-14	15-21	Combinado ²
Controle	Positivos	0	1	2	2	3
	Negativos	15	14	12	12	12
	Taxa de novas infecções					20,0%
Vacinado	Positivos	0	2	3	2	3
	Negativos	16	12	13	12	13
	Taxa de novas infecções					18,7%
Teste exato de Fisher					0,641	

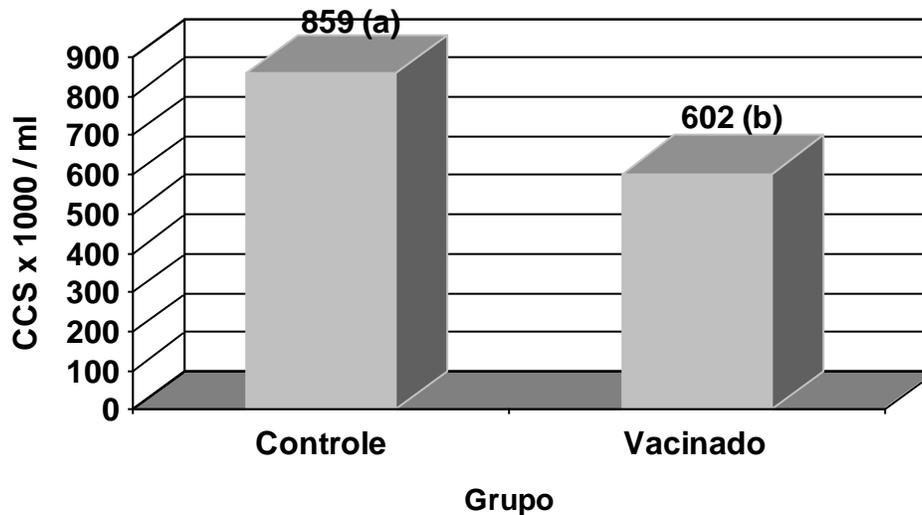
¹Resultados combinados de duas coletas (-7 e 0 dias relativos à secagem). A vaca é considerada positiva mediante um único resultado positivo.

²Resultados combinados de três coletas pós-parto. A vaca é considerada positiva mediante um único resultado positivo.

Nas vacas positivas para *S. aureus* na secagem, a CCS da lactação subsequente foi significativamente reduzida no grupo vacinado em relação ao grupo controle (Figura 1). As produções de leite, gordura e proteína não foram diferentes entre os grupos (Tabela 6).

Entre as vacas negativas para *S. aureus* à secagem não houve diferença estatística entre os animais vacinados e controle para produção e composição do leite (Tabela 7).

Figura 1. Contagem de células somáticas (CCS) média da lactação de vacas positivas para *Staphylococcus aureus* submetidas à terapia de vaca seca associada ou não à vacinação para *S. aureus* na secagem anterior.*



*Dados referentes ao encerramento em 305 dias. n = 20 e 21, respectivamente, para os grupos controle e vacinado.

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos (P = 0,033). Comparações estatísticas feitas através de dados transformados para base logarítmica (ln).

Tabela 6. Produção de leite e de sólidos do leite na lactação, de vacas positivas para *Staphylococcus aureus* submetidas à terapia de vaca seca associada ou não à vacinação para *S. aureus* na secagem anterior.

Produção 305d	Tratamentos		EPM ¹	P
	Controle (n=20)	Vacinado (n=21)		
Leite (Kg)	7.858	8.661	2.209	0,251
Gordura (Kg)	279	276	77,09	0,932
Proteína (Kg)	252	259	56,53	0,719
Gordura (%)	3,12	3,36	0,513	0,177
Proteína (%)	3,06	2,93	0,175	0,069
CCS (ln)	6,64 ^a	6,20 ^b	0,578	0,033

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre grupos (P < 0,05).

¹EPM = erro padrão da média; ²Contagem de células somáticas transformadas para base logarítmica (ln).

Tabela 7. Produção de leite e de sólidos do leite na lactação de vacas negativas para *Staphylococcus aureus* submetidas à terapia de vaca seca associada ou não à vacinação para *S. aureus* na secagem anterior.

Produção 305d	Tratamentos		EPM ¹	P
	Controle (n=11)	Vacinado (n=13)		
Leite (Kg)	7.615	7.492	1.533	0,846
Gordura (Kg)	257	234	60,8	0,391
Proteína (Kg)	228	212	49,5	0,476
Gordura (%)	3,40	3,18	0,584	0,377
Proteína (%)	3,02	2,83	0,308	0,153
CCS (ln) ²	5,94	5,49	1,098	0,353
CCS (x1000/mL) ³	664	392		

¹EPM = erro padrão da média.

²Contagem de células somáticas transformadas para base logarítmica (ln).

³Média aritmética da contagem de células somáticas.

S. aureus foi o agente mais frequentemente isolado das amostras de quartos mamários remetidas para cultivo microbiológico. Uma redução significativa foi observada na frequência de isolamentos de *S. aureus* e de *Corynebacterium* sp no pós-parto em relação à secagem tanto no grupo controle como no vacinado (Tabela 8) (P < 0,001). A recuperação total de patógenos no pós-parto também foi diminuída em ambos os grupos em relação ao pré-parto com conseqüente aumento de cultivos negativos (P < 0,001).

Tabela 8. Frequência de diagnósticos microbiológicos em amostras de quartos mamários coletadas na secagem e no pós-parto.*

Diagnóstico	Controle					Vacinado				
	Pré-secagem		Pós-parto		P	Pré-secagem		Pós-parto		P
	n	%	n	%		n	%	n	%	
<i>S. aureus</i> ¹	40	20,7 ^a	41	10,6 ^b	0,001	55	27,9 ^a	47	10,4 ^b	0,001
<i>Strep. sp.</i> ²	8	4,1	14	3,6	0,754	2	1,0	9	2,0	0,768
<i>Corynebact.</i> ³	29	15,0 ^a	4	1,0 ^b	0,001	32	16,2 ^a	5	1,1 ^b	0,001
S.C.N. ⁴	9	4,7	23	5,9	0,525	13	6,6	31	6,8	0,921
Outros ⁵	6	3,1	4	1,0	0,07	7	3,6	10	2,2	0,318
Negativo ⁶	97	50,3 ^b	293	75,8 ^a	0,001	81	41,1 ^b	337	74,4 ^a	0,001
Contaminado ⁷	4	2,1	8	2,1		7	3,6	14	3,1	
Total	193	100,0	387	100,0		197	100,0	453	100,0	

*Períodos de coleta: -7 e 0 pré-secagem; 0-7, 8-14 e 15-21 dias pós-parto.

¹*Staphylococcus aureus*; ²*Streptococcus* sp. (*Streptococcus agalactiae* não foi encontrado nas amostras de leite); ³*Corynebacterium* sp.; ⁴*Staphylococcus* coagulase negativo; ⁵*Enterococcus* sp, coliformes, *Bacillus* sp e leveduras; ⁶Sem crescimento bacteriano; ⁷≥ 3 tipos de colônias.

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas entre períodos, do mesmo tratamento (P < 0,01).

4. DISCUSSÃO:

O combate ao *S. aureus* é prioridade em alguns rebanhos leiteiros na atualidade. As exigências por leite de qualidade e o pagamento de bonificações por melhores padrões são realidade recente no Brasil. Apesar de muitas vezes conhecer os prejuízos trazidos pela alta CCS no rebanho, muitos produtores relevaram esta condição ou não priorizaram ações efetivas de prevenção e controle de mastite durante os anos. Isso resultou, em alguns casos, no aumento da gravidade da situação com o alastramento de animais portadores de agentes contagiosos da glândula mamária como o *S. aureus* e o *Streptococcus agalactiae*. O combate a estes agentes tornou-se então prioridade.

O *S. aureus* é bastante adaptado para sobrevivência na glândula mamária. Uma vez instalado causa, na maioria das vezes, infecção crônica. Glândulas infectadas, por sua vez, tornam-se a principal fonte de infecção para outras vacas no rebanho (Sears e McCarthy, 2003).

Realização da ordenha de forma higiênica, adoção das práticas do pré e pós-dipping, manutenção adequada do equipamento de ordenha, terapia da vaca seca, tratamento de casos clínicos, descarte de vacas e manutenção do ambiente limpo são práticas fundamentais para prevenção da mastite e para obtenção de um leite de boa qualidade. A adoção rigorosa e rotineira destas práticas geralmente previne a disseminação e controla situações de baixa prevalência de agentes contagiosos da glândula mamária. No entanto, em situações de alta prevalência destes agentes, métodos ainda mais dispendiosos devem ser adotados.

Várias práticas têm sido propostas com o objetivo de eliminar infecções por *S. aureus* em situações onde o descarte destes animais é economicamente inviável seja pela alta prevalência ou pelo valor do rebanho. O tratamento com antibióticos intramamário ou parenteral durante a lactação ou no período seco, a secagem de quartos infectados, o uso de vacinações ou associação destes métodos são alternativas utilizadas. Nessas situações, no entanto, a segregação de animais infectados torna-se obrigatória por reduzir

o contágio do agente e os custos do controle que poderão ser direcionados somente aos animais infectados.

Durante a lactação, o *S. aureus* é bastante resistente à terapia antibiótica intramamária convencional, mas a adoção de terapia antibiótica prolongada aumentou a taxa de cura de 26% para 51% (Costa et al., 2000). A associação da terapia antibiótica parenteral e intramamária aumentou de 25% para 51% a taxa de cura se comparada à terapia intramamária convencional (Owens et al., 1988). O grande custo com antibióticos e descarte de leite, e ainda, a baixa taxa de cura restringem a recomendação da antibioticoterapia.

A TVS continua sendo a ferramenta mais importante na redução da prevalência de *S. aureus* em rebanhos leiteiros. Entre 40 e 70% das infecções são eliminadas com a utilização da TVS, sem o acréscimo dos custos relativos ao descarte de leite (Nickerson, 1993). Porém, a possibilidade de sucesso é menor e com maior variação, comparada aos outros agentes infecciosos. Estratégias como a associação de antibiótico sistêmico (oxitetraciclina) ou mesmo a repetição da terapia intramamária após 7 e 14 dias não aumentaram as taxas de cura para *S. aureus* na secagem se comparadas à TVS isolada (Cummins e McCaskey, 1990, Erskine et al., 1994).

No presente experimento, a associação da vacinação e da TVS em animais com infecção prévia por *S. aureus* mostrou grande eficiência na cura dessas infecções. A taxa de cura de quartos mamários aumentou em 47% no grupo vacinado em relação ao grupo controle (73,7% e 50,0%, respectivamente) ($P = 0,048$). Levando em consideração o animal, o aumento foi de 115% ($P = 0,109$). Somente 19,0% das vacas curaram com a utilização exclusiva da TVS enquanto 40,9% curaram com a associação da vacina e TVS. Esses dados demonstram a importância da associação da vacina e TVS a fim de acelerar o controle do agente em situações de alta prevalência.

Sears (1999) também demonstrou eficiência de uma vacina trivalente capsular. Durante a lactação, relatou cura de 78% dos quartos (49/63 quartos) com a associação da

vacina e apenas 22% em quartos tratados somente com antibiótico. No entanto, a vacinação na secagem é mais vantajosa por evitar custos com descarte de leite.

A vacinação não preveniu a ocorrência de novas infecções no período seco. A incidência não variou entre os grupos sendo de 9,5% no grupo controle e 12,6% no grupo vacinado ($P = 0,516$). Nordhaug et al. (1994), também não encontraram redução na incidência cumulativa de infecções na primeira lactação de novilhas vacinadas durante a gestação. Porém, conseguiram reduzir o número de casos clínicos e subclínicos no grupo vacinado em relação ao grupo controle. Ao contrário desses resultados, Nickerson (1993) trabalhando com desafio experimental durante o período seco concluíram que a vacinação foi eficaz em prevenir novas infecções. Sears et al. (1990) também demonstraram redução em 52% de novas infecções em novilhas vacinadas pré-parto e desafiadas experimentalmente no pós-parto.

A vacinação na secagem melhorou significativamente a qualidade do leite produzido na lactação subsequente. Vacas positivas para *S. aureus* vacinadas tiveram sua CCS significativamente reduzida em relação a vacas do grupo controle ($P = 0,033$). Quando todas as vacas, positivas e negativas, foram analisadas em conjunto uma tendência de queda na CCS também foi verificada ($P = 0,0861$) (779 e 527 CCSx1000/mL, respectivamente) por efeito da vacinação.

A importância da TVS na cura de infecções pré-existentes ficou clara nos dados envolvendo todos os diagnósticos. Tanto no grupo controle quanto no grupo vacinado redução significativa da frequência de diagnósticos de *Corynebacterium* sp e de *S. aureus* foi demonstrada. *Corynebacterium* é classificado como um agente de menor importância, mas que também se comporta de forma contagiosa (Philpot e Nickerson 2000).

5. CONCLUSÕES:

A vacinação de vacas com infecções por *S. aureus* deve ser recomendada na secagem, em associação à terapia de vaca seca, com objetivo de aumentar a taxa de cura

destes animais, acelerar o controle do agente e melhorar a qualidade do leite produzido nos rebanhos acometidos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

COSTA EO; BENITES NR; GUERRA JL et al. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* spp. Isolated from mammary parenchymas of slaughtered dairy cows. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, v.47, n.2, p. 99-103, 2000.

CUUMMINS, K.A.; MCCASKEY, T.A. Multiple infusions of cloxacilin for treatment of mastitis during the dry period. *J Dairy Sci*, v.70, p. 2658-2665, 1987.

DINGWELL R.T.; KELTON, D.F.; LESLIE K.E. Management of the dry cow in control of peripartum disease and mastitis. *Vet Clin Food Anim*, v.19, p. 235-265, 2003.

ERSKINE, R.J.; BARTLETT P.C.; CRAWSHAW, P.C. Efficacy of intramuscular oxytetracycline as a dry cow treatment for *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci*, v.77, p. 3347-3353, 1994.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*. Natl. Mastitis Counc. Inc., Madison WI. 1999.

NEIJENHUIS F.; BARKEMA H.W.; HOGVEEN H. et al. Classification and longitudinal examination of callused teat-ends in dairy cows. *J Dairy Sci*, v.83, p.2795-2804, 2000.

NICKERSON, S.C.; OWENS, W.E.; TOMITA, G.M. et al. Vaccinating dairy heifers with a *S. aureus* bacterin reduces mastitis at calving. *Large Anim Practice*, v.20, p.16-28, 1999.

NICKERSON, S.C. Preventing new *Staphylococcus aureus* mastitis infections. *Vet Med*, v.33, p. 368-373, 1993.

NORDHAUG M.L.; NESSE L.L.; NORCROSS N.L. et al. A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 1. Clinical parameters. *J Dairy Sci*, v.77, p.1267-1275, 1994.

OSTERAS O.; SANDVIK L. Effects of selective dry-cow therapy on culling rate, clinical mastitis, milk yield and cow somatic cell count. A randomized clinical field study in cows. *J Vet Med B*, v.45, p.555-575, 1996.

OWENS WE; WATTS JL; BODDIE RL et al. Antibiotic treatment of mastitis: comparison of intramammary and intramammary plus intramuscular therapies. *J Dairy Sci*, v.71, p. 3143-3147, 1988.

PANKEY, J. W.; BODDIE, N. T; WATTS, J. L. et al. Evaluation of protein A and a commercial bacterin as vaccines against *Staphylococcus aureus* mastitis by experimental challenge. *J Dairy Sci*, v.68, p. 726, 1985.

PHILPOT W.N.; NICKERSON S.C. *Vencendo a luta contra mastite*. Naperville – IL: Westfalia Surge Inc., 2000, 192p.

SAS INSTITUTE. SAS User's Guide: Statistics, version 8, ed. 2. SAS Inst., Inc., Cary, NC, 1999.

SEARS, P.M. Alternative management and economic consideration in *Staphylococcus aureus* elimination programs. In: ANNUAL MEETING OF THE NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1999, Arlington – VA. Proceedings of the 38th Annual Meeting of the National Mastitis Council. Madison - WI: National Mastitis Council Inc., 1999, p. 86-92.

SEARS P. M; MCCARTHY, K. K. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet Clin Food Anim*, v.19, p. 171-185, 2003.

SEARS P. M.; NORCROSS N. L.; KENNY K. et al. Resistance to *Staphylococcus aureus* infections in staphylococcal vaccinated heifers. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BOVINE MASTITIS, 1990, Indianápolis – IN. Proceedings of the international symposium on bovine mastitis. Madison - WI: National Mastitis Council Inc, 1990, p. 69-72.

WILLIAMS, J.M.; MAYERHOFER H.J.; BROWN, R.W. Clinical evaluation of a *Staphylococcus aureus* bacterin (polyvalent somatic antigen). *Vet Med Small Anim Clin*, v.61, p.789-794, 1966.

WILLIAMS, J.M.; SHIPLEY, G.R.; SMITH, G.L. et al. A clinical evaluation of *Staphylococcus aureus* bacterin in the control of Staphylococcal mastitis in cows. *Vet Med Small Anim Clin*, v.70, p.587-594, 1975.