

José Eurico de Faria

ISOLAMENTO DE MICROORGANISMOS POTENCIALMENTE PATÓGENOS DE LEITE, PELE E ME  
AS GALACTÓFOROS EXTERNOS DE TETAS DE BOVINOS E DE MÃOS DE ORDENHADORES.

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina V  
erinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva.

Belo Horizonte

Minas Gerais

1981

Faria, José Eurico de, 1952

F224i

Isolamento de microorganismos potencialmente patógenos de leite, pele e meatos galactóforos externos de tetas de bovinos e de mãos de ordenhadores. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1981.

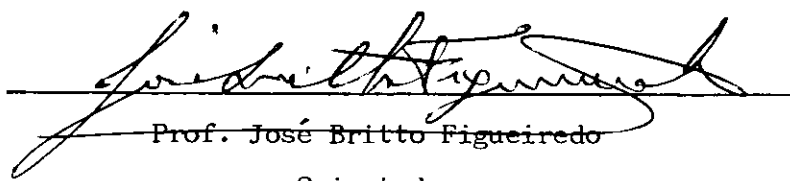
55p. ilustr.

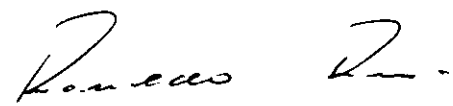
Bibliografia


Tese, Mestre em Medicina Veterinária

1. Bovinos - Glândula mamária-infecção. 2. Microorganismos - Isolamento. 3. Desinfecção - Mão de ordenhador. I. Título.

CDU 636.2:618.19-002

  
Prof. José Britto Figueiredo  
Orientador

  
Prof. Ronaldo Reis

  
Prof. Nivaldo da Silva

À minha filha Alessandra,  
à minha esposa Marlene,  
aos meus pais,  
aos meus irmãos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. José Britto Figueiredo, pela orientação e compreensão, indispensáveis à realização deste trabalho.

Ao Prof. Luiz Hemetério Dutra Martins Carneiro, pelo apoio e amizade.

Ao Prof. Antônio de Almada Lopes e à Escola Média de Agricultura de Florestal, pelas facilidades proporcionadas na obtenção do material.

Ao Prof. Ivan Sampaio, pelas valiosas sugestões nas análises estatísticas.

Ao Prof. Rômulo Cerqueira Leite, pela valiosa colaboração nas atividades de laboratório.

Aos Profs. do curso, pelos ensinamentos recebidos.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade da realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa de estudo.

Aos colegas de curso, pela agradável e inesquecível convivência.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

### BIOGRAFIA DO AUTOR

JOSÉ EURICO DE FARIA, filho de Odilon Bráz de Faria e Ruth Carvalho Faria, nasceu em Campo Belo, Minas Gerais, aos 07 dias do mês de janeiro de 1952.

Obteve o diploma de Médico Veterinário em 1976, pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

Foi contratado, em dezembro de 1976, pela Universidade Federal de Viçosa, para o cargo de Auxiliar de Ensino, sendo lotado no Departamento de Veterinária.

Em março de 1978, iniciou o curso de Mestrado na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, na área de Medicina Veterinária Preventiva.

## RESUMO

Em pesquisa realizada numa fazenda de criação semi-estabulada Município de Florestal-MG, envolvendo nove animais e respectivos ordenhadores, foi possível demonstrar uma melhor eficiência da clorhexidina, sobre a lavagem com água e sabão e iodoform, em reduzir o número total de bactérias nas mãos de ordenhadores, onde foi possível demonstrar patógenos em todas as examinadas.

As frequências de microorganismos isolados do leite foram as seguintes: 28,6% entre amostras e 88,9% entre vacas examinadas. Os microorganismos isolados em amostras de leite foram assim classificados: Streptococcus agalactiae (5,7%); Streptococcus dysgalactiae (8,6%); Streptococcus uberis (5,7%); Staphylococcus aureus (17,1%) e coliformes (2,9%).

Da pele de tetas, antes da ordenha, sem tratamento prévio, patógenos para a glândula mamária foram encontrados em 88,6% das tetas e 100% das vacas.

Dos meatos galactóforos externos, antes da ordenha, sem tratamento prévio, patógenos para a glândula mamária foram encontrados em 45,7% dos meatos e 77,8% das vacas.

Não houve diferenças significativas, com relação à frequência de patógenos sobre a pele e meatos das tetas, antes e após ordenha manual ( $p > 0,05$ ).

Somente o Streptococcus agalactiae e Staphylococcus aureus demonstraram associação significativa ( $p < 0,05$ ), entre os demais microorganismos, entre alguns segmentos da cadeia epidemiológica da mamite.



## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1. Frequência de patógenos nas mãos de ordenhadores e ação de desinfetantes entre elos da cadeia epidemiológica da mamite..	04
2.2. Frequência de patógenos em amostras de leite.....	06
2.3. Frequência de microorganismos na pele e meatos das tetas....	09
2.4. Associação de microorganismos entre elos da cadeia epidemio- lógica da mamite.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Material.....	15
3.2. Colheita do material.....	15
3.3. Provas utilizadas.....	17
3.3.1. Coadura do leite.....	18
3.3.2. California mastitis test.....	18
3.3.3. Contagem global de leucócitos.....	18
3.3.4. Bacterioscopia.....	18
3.3.5. Isolamento e identificação.....	18
4. RESULTADOS.....	22
5. DISCUSSÃO.....	34

5.1. Frequência de patógenos nas mãos de ordenhadores e ação de desinfetantes entre elos da cadeia epidemiológica da mamite..	34
5.2. Frequência de patógenos em amostras de leite.....	38
5.3. Frequência de microorganismos na pele e meatos das tetas....	40
5.4. Associação de microorganismos entre elos da cadeia epidemiológica da mamite.....	44
6. CONCLUSÕES.....	47
7. BIBLIOGRAFIA.....	49

## 1. INTRODUÇÃO

A mamite bovina é doença de grande importância econômica e social. Os prejuízos causados são decorrentes da redução na produção de leite, má qualidade do produto e seus derivados, gastos com assistência veterinária, com substituição de animais infectados, pela diminuição da vida útil. Do ponto de vista social, é importante devido a possibilidade de veiculação de microorganismos e/ou toxinas ao homem, através do leite contaminado, sem tratamento.

HOLFORD (1930) estima que nos Estados Unidos 4,3% das vacas leiteiras são descartadas anualmente devido a mamite. Para o ano de 1929, isto dá um descarte de 938.260 vacas. As perdas anuais para a indústria, são calculadas em 72 milhões de dólares.

De acordo com HODGES (1957), o custo da mamite bovina nos Estados Unidos, equivale a um terço da perda total de todas as doenças de bovinos ou aproximadamente 226 milhões de dólares. Isto equivale às perdas conjuntas de brucelose, tuberculose e vibriose.

JANZEN (1970), em trabalho de revisão, relata que a redução da produção de leite por mamite, nos Estados Unidos, varia de 5 a 25%, com um extremo de 83,9%. As perdas anuais dos produtores de leite, são estimadas em 400 a 500 milhões de dólares, ou 23 dólares por vaca.

De acordo com TATTERSFIELD et alii (1976), as estimativas de

total perda da indústria, associada com mamite, em Nova Zelândia, na estação de 1965-66 (oito meses) foram entre 3 a 7% do lucro anual da indústria leiteira. Os lucros da indústria nesta estação foram de aproximadamente 238 milhões de dólares.

Segundo DOBBINS JR. (1977), as estimativas nacionais de custo da mamite nos Estados Unidos, variam de 35 a 60 dólares por vaca, por ano. Para os médios produtores de leite, estes valores são considerados subestimados, sendo melhores representados por uma faixa de 90 a 250 dólares por vaca, por ano.

A produção de leite no Brasil, em 1974, foi da ordem de 7.101.261.000 litros, equivalente na época a 8.023.957.000 cruzeiros (ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL, 1976). Admitindo-se para o Brasil, uma redução de 15% na produção de leite devido a mamite, teríamos somente para o ano de 1974, uma perda de 1.065.189.100 litros, correspondendo na época a 1.203.593.500 cruzeiros.

Do ponto de vista de saúde pública, HULL (1963a,b) relata várias doenças que são transmitidas através do leite, dentre as quais, podemos destacar a brucelose, difteria, estafilococias, escarlatina e tuberculose.

De acordo com MURPHY (1956), 99% dos casos de mamite são causados por quatro categorias de microorganismos, a saber: Streptococcus agalactiae, outros estreptococos, estafilococos e bacilares (coliformes, Pseudomonas, etc.). Além desses, o Corynebacterium pyogenes é citado como agente comum da mamite bovina em nosso meio (FIGUEIREDO, 1959).

A transmissão da mamite se dá através das mãos do ordenhador ou copo da ordenhadeira mecânica quando contaminados, podendo também ocorrer, mecanicamente, através de insetos ou contato direto com camas e pisos contaminados (HIPÓLITO et alii, 1965).

Sendo o Brasil grande produtor de leite e derivados, e tendo em vista a importância que a doença representa para o país, é que tomamos para assunto de nosso trabalho o estudo da frequência de microorganismos cau-

sadores de mamite na glândula mamária, pele e meatos das tetas, e mãos dos ordenhadores.

Procuramos também estudar a associação destes microorganismos nestes locais e, também, determinar o valor da lavagem e desinfecção na redução do número de microorganismos das mãos dos ordenhadores.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Frequência de patógenos nas mãos de ordenhadores e ação de desinfetantes entre elos da cadeia epidemiológica da mamite.

JONES (1918) isolou estreptococo hemolítico da mão de ordenhador, após ele ter ordenhado uma vaca, conhecidamente positiva. Este isolamento foi possível antes e após o ordenhador lavar as mãos com sabão e água fria.

Em um total de 311 amostras tomadas das mãos de 38 ordenhadores, em dois centros de pesquisa, o Streptococcus agalactiae foi isolado de 151 amostras (48,6%), provenientes de 27 ordenhadores (71,1%) (U.K. AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL, 1944).

SPENCER et alii (1946) tentaram isolar Streptococcus agalactiae das mãos de 10 ordenhadores, em cinco rebanhos infectados. Desses 10 ordenhadores, dois faziam ordenhas somente manuais e oito utilizavam máquinas de ordenhar. Suas mãos foram lavadas com água e sabão e esfregadas com escovas; depois foram lavadas em solução contendo 200 ppm de cloro disponível. Em seguida, foram lavadas com leite desnatado estéril, em bacia estéril. Usando este processo, os autores conseguiram isolar o agente somente das mãos dos dois ordenhadores que faziam ordenhas manuais.

De 48 pares de mãos de ordenhadores examinadas, Streptococcus agalactiae foi isolado de 19 (39%) (CHODKOWSKI, 1949).

CHODKOWSKI & LANCASTER (1949) isolaram Streptococcus agalactiae das mãos de quatro ordenhadores, dentre cinco examinados (80%). Após lavagem em água de torneira, as mãos eram lavadas e escovadas em leite estéril.

SPENCER & LASMANIS (1952) não conseguiram isolar micrococos (estafilococos) produtores de coagulase das mãos de ordenhadores, que utilizavam máquinas de ordenhar, nem antes e nem durante o período de ordenha.

NEAVE et alii (1962a) testaram vários desinfetantes. Na experiência deles, cada ordenhador ordenhava, com máquina, uma vaca infectada com Staphylococcus aureus e em seguida, uma não infectada. Antes de ordenhar a segunda vaca, as mãos eram imergidas em desinfetante, o excesso retirado por agitação, e então esfregadas com um "swab" embebido em inibidor do desinfetante. Resultados positivos foram encontrados em 41 (46%) das 89 mãos desinfetadas com iodoform (53 ppm), 22 (26%) das 86 desinfetadas com hipoclorito (360 ppm) e em 17 (20%) das 86 desinfetadas com clorhexidina (135 ppm). Das mãos controle, ou seja, não desinfetadas, 95-100% foram positivas.

Segundo NEWBOULD (1965), apesar de ser geralmente aceito que as mãos dos ordenhadores são potentes veiculadoras de patógenos, mesmo quando o rebanho é ordenhado à máquina, as publicações a respeito são, em parte, contraditórias.

De acordo com DODD et alii (1966), 50% das mãos dos ordenhadores estavam infectadas com Staphylococcus aureus, antes da ordenha mas, durante o período de ordenha a porcentagem elevou-se a 100%.

A imersão de tetas em clorhexidina (1% de gluconato de clorhexidina) reduziu o número de Staphylococcus aureus sobre as tetas, de 81, 97 e 97%, em três grupos de quatro vacas cada, respectivamente (GERRING et alii, 1968).

O uso de clorhexidina a 0,2%, no processo de imersão de teta após cada ordenha, reduziu a microflora sobre a pele da região apical da teta em cerca de 95% (SCHULTZE & SMITH, 1970).

HANSEN (1971), em trabalho de campo envolvendo 656 vacas, divididas em três grupos, não encontrou diferenças significantes entre hipoclorito de sódio (100-400 mg/l de cloro disponível), iodofor (25-75 mg/l de iodo disponível) e hexaclorofeno (100 mg/l), utilizados na lavagem de úbere, quando avaliados através de taxas de novas infecções de mamite. A duração do experimento foi de dois meses para cada antisséptico.

A lavagem completa da teta, com especial cuidado na extremidade com solução à base de iodo\*, reduziu significativamente o número total de bactérias sobre a extremidade da teta. Também a imersão de tetas, pós-ordenha, em iodofor\*\*, reduziu a população bacteriana total e de estafilococos, mas não a de estreptococos, sobre a extremidade das tetas (ZARKOWER & SCHEUCHENZUBER, 1977).

A clorhexidina, em emulsão a 1,5%, mostrou-se eficiente na eliminação de microorganismos de meato galactóforo externo, e na prevenção de mamite por Staphylococcus aureus e Streptococcus agalactiae. A redução dos casos novos de mamite foi de 55,6% para Staphylococcus aureus e de 60,0% para Streptococcus agalactiae (SILVA, 1979).

## 2.2. Frequência de patógenos em amostras de leite.

De acordo com GIESECKE et alii (1971), a incidência de mamite em vacas lactantes, na República da África do Sul, varia de 20,9% a 84,1% (média 47,9%). Dos microorganismos isolados, a maior parte foi Staphylococcus spp. (dominância do S. aureus) e Streptococcus spp. (dominância do S. agalactiae).

ZIV & NACHMAN (1972), examinando úberes de 725 vacas de raças leiteiras abatidas em Israel, conseguiram isolar patógenos em 56% deles. Foram encontrados Streptococcus agalactiae em 3,2%; outros estreptococos em

---

\* Iosan udder wash. Babson Bros. Co. Oak Brook, Illinois, USA.

\*\* Bovadine. West Chemical Co. Long Island City, N.Y., USA



44,5%; Staphylococcus aureus em 20,6% e Pseudomonas aeruginosa em 8,1% dos úberes.

O exame bacteriológico de 2.212 amostras de leite, positivas ao "Rapid mastitis test" (variação do CMT), na região de Illawarra, na Austrália, revelou a presença de Staphylococcus aureus em 34,1% das amostras; Streptococcus agalactiae em 12,7%; Streptococcus dysgalactiae em 0,9%; Streptococcus uberis em 1,4% e Corynebacterium pyogenes em 0,1% (HOARE & BARTON, 1972).

De 564 amostras de leite, provenientes de vacas com mamite clínica, no Quênia, foram isolados Staphylococcus aureus de 153 amostras (27,1%); Streptococcus spp. de 132 (23,4%); Corynebacterium pyogenes de 41 (7,3%); Citrobacterium spp. de 68 (12,1%); Escherichia coli de 84 (14,9%); Klebsiella spp. de 46 (8,2%); Paracolobactrum spp. (coliformes não fermentadores de lactose) de duas (0,4%); Proteus spp. de três (0,5%); Pseudomonas spp. de cinco (0,9%); bactéria Gram negativa de 28 (5,0%) e organismos semelhantes a levedura de duas (0,4%) (LAUERMAN et alii, 1973).

Na "Slovakia", 183.342 amostras de leite, provenientes de 63.388 vacas leiteiras, foram examinadas bacteriologicamente e citologicamente, durante o período de 1967 a 1971. O exame bacteriológico, revelou 20,9% das vacas leiteiras positivas. Streptococcus agalactiae foi isolado de 12,5% das bacteriologicamente positivas; Staphylococcus aureus, de 5,3%; outros estreptococos, de 2,1%; B. coli, de 0,3%; Klebsiella, de 0,2%; Corynebacterium pyogenes, de 0,2% e outros germes bacterianos, de 0,2% (HAVELKA, 1973).

BRYSON & THOMSOM (1976), examinando 1.365 amostras de leite, provenientes de vacas com mamite clínica, na região de Bulawayo, Rodésia, no período de 1972 a 1974, isolaram agentes bacterianos de 50,0% das amostras. Destacaram os estreptococos com 37%; estafilococos, 28% e coliformes 29,5%.

HAVELKA et alii (1977) examinaram bacteriologicamente, 80.000 amostras de leite, provenientes de 45.000 vacas, na "Slovakia", durante

1976. Eles isolaram agentes da mamite em 20% das vacas nas seguintes proporções: Streptococcus agalactiae, de 16,3%; outros estreptococos, de 0,9%; Staphylococcus aureus, de 2,5%; Corynebacterium pyogenes, de 0,2%; Klebsiella, de 0,1% e Escherichia coli, de 0,1%.

A literatura específica brasileira se resume basicamente em:

ZANI NETO (1955) estudou no estado de São Paulo, 73 amostras de Micrococcus pyogenes (Staphylococcus aureus), provenientes de vacas com mamite. Ele considera este germe responsável por grande número dessas infecções.

MARTINEZ (1958), no Rio Grande do Sul, encontrou, durante um período de três anos (1954 a 1956), através de exames clínicos, provas do azul bromotimol e lacto-sedimentação, uma porcentagem de mamite de 6,2 entre vacas lactantes.

FIGUEIREDO (1959), examinou 129 vacas lactantes na região de Betim (MG), das quais 92 revelaram mamite e sete foram consideradas suspeitas, através do exame clínico e provas auxiliares ("strip cup" e CMT). O exame bacteriológico das 99 amostras de leite anormal ou supostamente anormal, revelou presença de agentes infecciosos em 72,7%. Dentre os agentes bacterianos patogênicos isolados, figuram Staphylococcus aureus, 57,4%; Streptococcus agalactiae, 1,1%; Streptococcus spp., 38,1%; bacilares, 4,3% e Corynebacterium pyogenes, 2,1%.

LANGENEGGER et alii (1970) examinaram 2.187 vacas em lactação, na bacia leiteira do Rio de Janeiro e verificaram através de exame clínico dos úberes, 87 vacas (4%) com mamicas clinicamente evoluídas, afetando 101 quartos (1,1%). O mesmo exame clínico revelou que 141 vacas (7%) eram portadoras de 167 quartos "secos" (2%), com ou sem mamite. Através do CMT, verificaram reações suspeitas ou positivas em 429 vacas (20%), num total de 821 quartos (9,3%). Através de exame bacteriológico das 821 amostras de leite reagentes ao CMT, obtidas das 429 vacas, foi possível isolar e identificar agentes etiológicos da mamite em 368 animais (85,7%). Dentre as 429 vacas examinadas, Streptococcus agalactiae foi isolado de 106 (24,7%);

Streptococcus dysgalactiae de 74 (17,2%); Streptococcus uberis de 20 (4,6%); Staphylococcus aureus de 227 (53,1%); Corynebacterium pyogenes de 18 (4,2%); Pasteurella multocida de quatro (0,9%) e Escherichia coli de duas (0,4%).

FERNANDES et alii (1973), examinando 970 amostras de leite da bacia leiteira de Porto Alegre, isolaram organismos patogênicos de 100% das mamites clínicas e de 45% das subclínicas. Os agentes etiológicos das mamites clínicas foram: Staphylococcus aureus (50%); Streptococcus agalactiae (33%); Streptococcus dysgalactiae (4%); Streptococcus pyogenes (5%); Corynebacterium pyogenes (1%); Pseudomonas aeruginosa (4%) e Escherichia coli (3%). Das mamites subclínicas, foram isolados Staphylococcus aureus (42%) e Streptococcus dysgalactiae (3%).

HARROP et alii (1975) examinaram 866 vacas em lactação na bacia leiteira da zona do agreste meridional de Pernambuco. Através do CMT, 338 vacas (39%) apresentaram distúrbios da secreção láctea e o exame bacteriológico revelou infecções nos úberes de 275 vacas (31,7%). Dentre os agentes etiológicos, o Staphylococcus aureus foi isolado de 163 vacas (59,2%); Streptococcus agalactiae, de 39 (14,1%); Streptococcus dysgalactiae, de 52 (18,9%); Streptococcus uberis, de 86 (31,2%) e Corynebacterium pyogenes, de quatro (1,4%).

SILVA (1977), estudando o mesmo rebanho usado neste trabalho, obteve de 565 isolamentos os seguintes agentes: Staphylococcus aureus, 83,5%; Staphylococcus coagulase-negativa, 0,7%; Streptococcus uberis, 14,0%; Streptococcus dysgalactiae, 0,7% e infecções mistas, 1,1%.

### 2.3. Frequência de microorganismos na pele e meatos das tetas.

CHODKOWSKI (1949), estudando os rebanhos de 13 fazendas, isolou Streptococcus agalactiae das tetas de 185 vacas, entre 489 examinadas (38%). O isolamento do microorganismo de tetas com feridas ou escoriações foi mais frequente do que de tetas sem lesões. No estudo de duas fazendas, o autor encontrou 81 e 61% de tetas positivas, nas com lesões, e 15 e 17%,

para tetas sem lesões, respectivamente. Ainda segundo o mesmo autor, métodos seletivos não dão 100% de recuperação de microorganismos, de material altamente contaminado.

CHODKOWSKI & LANCASTER (1949) isolaram Streptococcus agalactiae das tetas de 14 vacas, dentre 16 estudadas (87,5%), utilizando "swabs" embebidos em leite estéril e posterior incubação em leite estéril adicionado de corantes inibidores. Comparando com outro processo, em que foi utilizado "swabs" embebidos em água de torneira estéril e incubação em somente leite estéril, foi possível isolar o microorganismo somente de duas vacas, dentre as 16 estudadas (12,5%).

LANCASTER & STUART (1949) não encontraram diferenças entre vacas, na eliminação de Streptococcus agalactiae da pele de tetas, entre ordenhas. O microorganismo pôde geralmente ser recuperado da pele das tetas, entre ordenhas, após contaminação das mesmas com leite contaminado.

O exame de 112 ápices de tetas provenientes de 28 novilhas, no momento da "secagem" do leite, revelou presença de Staphylococcus aureus em oito (7,1%). Os "swabs" foram tomados depois da lavagem das tetas com hipoclorito de sódio (800 ppm de cloro livre) e limpeza das extremidades das mesmas com álcool (etanol, 70%). De 28 "swabs" compostos das tetas de 28 novilhas, no momento da "secagem" do leite, Staphylococcus aureus foi recuperado por plaqueamento direto, de 10 (35,7%) e por método de enriquecimento, de 13 (46,4%). Antes da tomada das amostras, as tetas foram desinfetadas (NEAVE & OLIVER, 1962).

Ainda os mesmos autores, trabalhando com vacas "secas", cujas tetas foram experimentalmente contaminadas com Staphylococcus aureus (amostras "m" e "t") e Streptococcus dysgalactiae, verificaram que significativamente mais "swabs" positivos foram obtidos das tetas de quartos infectados do que daqueles que permaneceram livre de infecção intramamária. A porcentagem de "swabs" positivos (todas amostras) até o 34.<sup>o</sup> dia do experimento, foi 71, para os quartos que estavam ou tornaram-se infectados e 41,4 para os não infectados. O exame de 112 tetas provenientes de 28 novilhas,

no período "seco", 21 dias após contaminação experimental com culturas mistas de Staphylococcus aureus, revelou presença do microorganismo em 18 tetas (16,1%), quando utilizado plaqueamento direto e em 25 (23,3%), quando utilizado método de enriquecimento. As tetas não foram nem lavadas e nem desinfetadas, antes da tomada das amostras. O exame de 78 ápices de tetas provenientes de 20 novilhas, no período "seco", 21 dias após contaminação experimental das tetas com culturas mistas de Staphylococcus aureus, revelou presença isolada de Staphylococcus aureus, em 28 ápices (29,5%), Staphylococcus aureus e Streptococcus uberis em três (3,9%) e somente Streptococcus uberis em três (3,9%). As tetas não foram nem lavadas e nem desinfetadas antes da tomada dos "swabs".

Segundo MCDONALD & PACKER (1968), microorganismos cocos Gram-positivos, usualmente foram encontrados em números maiores sobre as extremidades das tetas, do que microorganismos coliformes Gram-negativos. Somente um a 20 microorganismos coliformes do mesmo tipo, podiam ser isolados da extremidade de qualquer teta. Achado similar podia ser observado em tetas completamente cobertas com material fecal seco e antes da lavagem com água corrente.

De acordo com SCHULTZE & SMITH (1970), tanto Staphylococcus aureus quanto Staphylococcus epidermidis, podem se estabelecerem como microflora residente sobre a pele no ápice da teta, e que esta colonização não depende inteiramente de espessamento ou erosão do ápice.

Tetas lavadas com uma solução à base de iodo ("Iosan udder wash") e tetas não lavadas, não mostraram diferenças significantes com relação ao número total de bactérias e números de estafilococos, estreptococos e organismos Gram-negativos, sobre o ápice das tetas (ZARKOWER & SCHEUCHENZUBER, 1977).

2.4. Associação de microorganismos entre elos da cadeia epidemiológica da mamite.

De acordo com SPENCER et alii (1946), se Streptococcus agalactiae vive como flora residente dentro ou sobre a pele das tetas, a disseminação pode ocorrer via o canal do leite, para dentro da teta, em qualquer época.

LANCASTER & STUART (1949) reproduziram infecção por Streptococcus agalactiae em 12 de 18 vacas (66,8%), em um total de 27 quartos, através de ordenha manual com mãos infectadas de ordenhadores. Estes imergiam as mãos em leite de vaca infectada com o microorganismo, e, em seguida esfregavam este leite sobre as tetas e partes mais baixas do úbere e imediatamente procediam a ordenha. Este processo de exposição foi mantido por um período de 15 semanas e quatro dias, em duas ordenhas diárias.

LANCASTER & STUART (1951) infectaram com Streptococcus agalactiae, 13,5% dos quartos de 23 vacas, através de ordenha manual. O método utilizado foi ordenha com mãos previamente imergidas em secreção láctea de vaca doadora, infectada com o microorganismo. Este método de exposição foi mantido por sete meses. Durante o último mês, culturas da mesma amostra de Streptococcus agalactiae foram adicionadas à secreção.

SPENCER & LASMANIS (1952) verificaram que vacas frequentemente tinham micrococcos (estafilococos) hemolíticos sobre a pele das tetas, quando nenhum era encontrado no leite.

NEAVE & OLIVER (1962) concluíram que grande quantidade de Staphylococcus aureus encontrada no orifício da teta se associava a nova infecção no período seco. Eles verificaram ainda que os orifícios das tetas de quartos que tornaram infectados com Streptococcus uberis, foram os únicos dos quais grandes números desse estreptococo, foram recuperados.

Uma alta incidência de infecção, por Staphylococcus aureus foi produzida por imersão de tetas imediatamente antes da ordenha em cultura contendo  $45 \times 10^6$  unidades formadoras de colônias (u.f.c.) por mililitro de leite, e foi mais tarde encontrado que isto podia ser acentuadamente aumentado quando a cultura continha  $100 \times 10^6$  u.f.c. por ml. (NEAVE et alii, 1962b).

Segundo NEWBOULD (1968), quanto mais organismos colocados sobre a teta e orifício da teta, tanto mais infecções intramamárias ocorrem. Ele tem conseguido produzir infecção intramamária através de inoculação nos primeiros três milímetros do ducto da teta com, tão pouco quanto, 36 u.f.c. de Staphylococcus aureus.

A incidência de infecção intramamária causada por amostras de Aerobacter aerogenes e Streptococcus agalactiae pode ser regulada pelo grau de exposição da extremidade da teta. De 48 quartos, expostos experimentalmente a cultura mista de Streptococcus agalactiae e Aerobacter aerogenes, depositados sobre as extremidades das tetas, por um período de 13 semanas, 28 (58,3%) não tornaram infectados com nenhum dos microorganismos. De 3.120 exposições experimentais, resultaram 25 (0,8%) infecções intramamárias, sendo 13 (0,4%), com Streptococcus agalactiae e 12 (0,4%), com Aerobacter aerogenes. De 48 quartos, cujas tetas foram expostas naturalmente ao Staphylococcus epidermidis, por um período de 13 semanas, 10 (20,8%) tornaram infectados, com um total de 12 infecções no período (MCDONALD & PACKER, 1968).

Taxas de novas infecções com coliformes são muito mais baixas do que com Staphylococcus aureus, apesar da alta frequência com que extremidades das tetas tornam contaminadas com coliformes, particularmente sob condições de abrigo no inverno (BRAMLEY & NEAVE, 1975).

ZARKOWER & SCHEUCHENZUBER (1978) verificaram que quartos com evidência de infecção, tinham uma contagem bacteriana média, em suas extremidades, significativamente superior ( $p < 0,01$ ) à daqueles sem evidência de infecção. Ainda, segundo esses autores, existe uma relação positiva entre altos números de estafilococos na pele e incidência de infecções estafilocócicas intramamárias. Os altos números de estafilococos nas tetas, estão presentes tanto antes quanto após infecções estafilocócicas intramamária.

Segundo BRAMLEY et alii (1979), a inoculação do orifício da teta com 20 u.f.c. de Staphylococcus aureus, não resultou em colonização do ápice da teta, mas inoculando 200 ou 2.000 u.f.c., no orifício ou a dois milímetros dentro do ducto da teta, resultou em colonização de 60 a 72% e

92% das tetas, respectivamente. O número de Staphylococcus aureus recuperável do ápice da teta aumentou regularmente com o tempo e estava ainda aumentando após 19 dias de inoculação. Do total de 78 colonizações de ápice de teta, por Staphylococcus aureus, somente quatro infecções de quartos ocorreram (5,1%). A inoculação do ducto de teta, com até  $43 \times 10^6$  u.f.c., de Escherichia coli, resultou em somente uma colonização transitória do ápice da teta, que raramente persistia por mais do que três a quatro dias.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

O material usado no presente estudo foi obtido em uma fazenda, pertencente à Escola Média de Agricultura de Florestal, da Universidade Federal de Viçosa, situada no município de Florestal - Minas Gerais.

O sistema de criação da propriedade era de semi-estabulação, com duas ordenhas diárias, sendo parte dos animais ordenhados com máquinas e parte manualmente. Os animais utilizados no presente trabalho eram todos ordenhados manualmente.

Foram utilizadas nove vacas em lactação, selecionadas ao acaso, com idades variando de cinco a 12 anos. Esses animais eram todos mestiços, de sangue "Schwitz" e Zebu com predomínio do sangue "Schwitz, com número de partos entre um e seis. Foi utilizado este número de vacas, porque foi suficiente para as comparações estatísticas.

Os dois ordenhadores utilizados foram considerados como unidade individual a cada animal manipulado, assim estes dois foram considerados nove por terem manejados nove vacas.

#### 3.2. Colheita do material

O material da mão do ordenhador, da pele e meatos galactóforos

externos das tetas, foi obtido através de esfregaços com "swabs", com aproximadamente 0,02 gramas de algodão, envoltas em varetas de bambú de 15 cm de comprimento, embebidos em caldo cérebro-coração\* (3C). Os esfregaços de mão eram feitos no sentido longitudinal, desde o punho até à ponta do dedo, fazendo-se um ligeiro movimento giratório do "swab", da esquerda para direita, entre cada dedo esfregado. Foi utilizada somente a mão direita de cada ordenhador, de modo que todos os dedos desta, eram esfregados. Os esfregaços de pele de teta eram feitos no sentido longitudinal das tetas, desde a base fixada entre os dedos do operador até à extremidade, em quatro ângulos diferentes, obedecendo-se a mesma técnica utilizada para a mão. Os esfregaços dos meatos, eram obtidos através de movimentos giratórios dos "swabs". Foi utilizado, um "swab" para cada teta e outro para o meato. Após realizados os esfregaços, os "swabs" voltavam para tubos individuais contendo 3C.

Foram feitos três esfregaços de mão, de cada ordenhador, nas seguintes situações:

a) Após contenção do animal, antes da ordenha, sem lavagem ou desinfecção prévia das mãos.

b) Após contenção do animal, antes da ordenha e após lavagem das mãos com sabão\*\* de barra ou desinfecção com iodoform\*\*\* (0,009% de iodo ativo) ou clorhexidina\*\*\*\* (1,5%) (tratamento alternado entre cada animal manipulado). O período de exposição das mãos ao sabão e aos desinfetantes era de um a dois minutos. Antes de fazer o esfregaço, para retirar a

---

\* Brain heart infusion. DIFCO LABORATORIES. Detroit - Michigan - USA.

\*\* Sabão Itabira. Fabricante: CASA MARINHO PINTO INDÚSTRIA E COMÉRCIO S/A. Endereço: R. Benjamin Constant, 244/250 - Barreto, Niterói, RJ.

\*\*\* Iodophor Fatec - produto à base de iodoform, contendo 2,25% de iodo ativo. Fabricante: FATEC QUÍMICA INDUSTRIAL S/A. Endereço: Bairro do Portão, s/n - Arujá, SP.

\*\*\*\* Chlorohex Emulsão. Contém 1,5% de clorhexidina, sendo 1% sob a forma de digluconato e 0,5% sob a de cloridrato. Fabricante: KNOLLS/A (Produtos Químicos e Farmacêuticos). Endereço: R. Maxwell, 10 - Rio de Janeiro, RJ.

maior parte do desinfetante ou do sabão, a mão era enxaguada em três salinas estéreis, em bacias esterilizadas e secada ao ar por um a dois minutos, com ligeira agitação da mesma.

c) Após ordenha manual de tetas não lavadas, e sem posterior lavagem ou desinfecção das mãos.

Da terceira salina colhida em bacia estéril, utilizada para enxaguar mãos, 10 ml era colhida em vidro de boca larga, estéril, com tampa de rosca, utilizando-se de uma pipeta estéril de 10 ml.

Para contagem de colônias, em placas de ágar sangue, inoculadas com "swabs" de mãos de ordenhadores, foi utilizado, o seguinte critério: contagem de todas as colônias até o número 300 e estimados os valores nas faixas de 300 a 600 e acima de 600 colônias por placa. Para efeito de cálculo, números de colônias superiores a 600 por placa, foram fixados em 600.

Os esfregaços de tetas e meatos foram obtidos antes e depois das tetas serem ordenhadas manualmente, sem lavagem ou desinfecção prévia das mesmas.

Os dois primeiros jatos de leite eram utilizados para as provas da coadura do leite ("strip cup") e "California mastitis test" (CMT).

O terceiro jato de leite, utilizado para bacteriologia e contagem global de leucócitos, era colhido em vidro de boca larga, estéril, com tampa de rosca, após desinfecção do meato galactóforo externo e extremidade distal da teta, com álcool-iodado a 10%.

O material colhido era enviado ao laboratório, sem refrigeração, dentro de duas horas.

Os quartos e tetas foram denominados com as siglas AD (anterior direito), PD (posterior direito), AE (anterior esquerdo) e PE (posterior esquerdo), nas apresentações dos resultados.

### 3.3. Provas utilizadas

### 3.3.1. Coadura do leite

O primeiro jato de leite era colhido em caneca contendo tela de malha fina. A prova é considerada positiva, quando a amostra de leite contém grumos ou coágulos que ficam retidos nessa malha.

### 3.3.2. "California mastitis test" (CMT)

Este método foi empregado segundo SCHALM & NOORLANDER (1957).

### 3.3.3. Contagem global de leucócitos

Os esfregaços de leite foram preparados de acordo com a técnica de PRESCOTT & BREED (1910), com ligeira modificação empregada por FIGUEIREDO (1957). Para coloração, foi utilizado o método de Newman, modificado por CHARLETT (1954).

### 3.3.4. Bacterioscopia

O mesmo esfregaço de leite usado para contagem global de leucócitos, era utilizado para a visualização de bactérias. As amostras de leite eram incubadas a 37°C por 12 a 20 horas, antes dos esfregaços serem preparados, conforme empregado por FIGUEIREDO (1957).

### 3.3.5. Isolamento e identificação

Os "swabs" e lavados de mão (terceira salina utilizada para enxaguar as mãos dos ordenhadores) eram inoculados em meios de cultura, logo após a chegada do campo, ou eram conservados em refrigerador (4-7°C), até o dia seguinte, quando eram inoculados. As amostras de leite eram incubadas a 37°C por 12 a 20 horas, antes de serem inoculados em meios de cultura. A inoculação era feita com alça de platina.

Tanto os "swabs" quanto as amostras de leite, eram inoculados em placas contendo ágar triptose com 8% de sangue desfibrinado de bezerro

(NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1969) e em meios seletivos para estreptococos (EDWARDS, 1933), estafilococos (ZEBOVITZ et alii, 1955) e bacilares (HOLT-HARRIS & TEAGUE, 1916).

O material colhido por esfregaços com "swabs" era inoculado em placas, com os próprios "swabs", após comprimi-los contra a parede do tubo com 3C, para diminuir o volume do "inoculum".

O lavado da mão do ordenhador era inoculado com pipeta de 1,0ml, em quantidades de 0,1 ml por placa de 10 cm de diâmetro com ágar sangue, e espalhado com alça de Drigalski.

As placas inoculadas, eram incubadas a 37°C por 24 - 48 horas. As colônias isoladas, eram transferidas para 3C em tubos e deixadas crescer a 37°C por 24 horas.

As placas com ágar sangue foram usadas para possíveis isolamentos de Corynebacterium pyogenes e para contagem de colônias das mãos e lavados de mãos de ordenhadores.

Verificada a pureza e aspectos morfo-tinturiais das culturas em caldo, pelo método de Gram, procedia-se os testes específicos para a identificação de espécies ou grupos de microorganismos frequentes causadores de mamite.

Para a identificação presuntiva dos microorganismos, além do crescimento em meios seletivos e características morfo-tinturiais pelo método de Gram, foram empregados métodos recomendados pelo "NATIONAL MASTITIS COUNCIL", 1969. Os estreptococos foram identificados de acordo com a reação CAMP (Christie, Atkins e Munch-Petersen), fermentação da esculina, hidrólise do hipurato de sódio e tipo de hemólise em ágar sangue de bezerro; os estafilococos, de acordo com a capacidade de coagular plasma de coelho (teste da coagulase) e os coliformes, de acordo com a capacidade de produzir ácido na inclinação, e ácido e gás, no fundo do tubo com Ágar Triplíce Açúcar-Ferro (TSI)\*.

---

\* Triple Sugar Iron Agar. DIFCO LABORATORIES. Detroit - Michigan - USA.

### CAMP Teste

Esta prova foi realizada de acordo com o método descrito em "NATIONAL MASTITIS COUNCIL" (1969), sem a prova de desdobraimento da esculina, que foi realizada separada. Uma cultura de estafilococo, capaz de produzir hemólise "beta", era inoculada através do centro de uma placa contendo ágar sangue de bezerro. A colônia a ser testada, retirada da placa com ágar sangue, era inoculada perpendicular a dois ou três milímetros da linha de inoculação do estafilococo. Cultura de estreptococo CAMP positivo, era incluída em cada teste, para controle. Desta forma, testávamos oito culturas por placa.

As placas inoculadas, após incubação a 37°C por 18 -24 horas, eram examinadas para hemólise e reação CAMP. Reação CAMP positiva é indicada por uma zona semicircular de lise completa, na zona de hemólise "beta" produzida pelo estafilococo.

### Fermentação da Esculina

Nesta prova, utilizamos o método descrito em LITTLE & PLASTRIDGE (1946). Caldo contendo 0,1% de esculina era inoculado com a cultura a ser testada, e incubado a 37°C por um período de 48 horas. Uma gota de uma solução aquosa a 1% de citrato férrico era então adicionada. Quando a esculina é fermentada, a fluorescência azulada original desaparece e uma cor marron escura desenvolve na adição da solução de citrato férrico.

### Hidrólise do Hipurato de Sódio

Para esta prova, foi utilizado o método descrito em BIER (1975). Caldo simples contendo 1% de hipurato de sódio era inoculado com a cultura a ser testada e incubado a 37°C, durante quatro dias.

A redução do hipurato a ácido benzóico era verificada pela adição de uma solução de cloreto férrico, 12g; ácido clorídrico concentrado, 0,25ml; água destilada q.s. 100ml. A quantidade de solução férrica a-

dicionada, era determinada numa pesquisa prévia. O cloreto férrico era adicionado rapidamente e a mistura agitada. A formação de precipitado era interpretado como positivo (presença de ácido benzóico).

#### Teste da Coagulase

Foi empregado basicamente o método descrito por SCHALM et alii (1971). O plasma foi obtido de sangue de coelho, oxalatado a 0,2%, por centrifugação a 1.500 r.p.m., durante 30 minutos.

As provas eram realizadas em tubos de hemólise, onde se colocava 0,6 ml de solução de cloreto de sódio a 0,4%, uma alça de cultura de estafilococo de 24 horas de crescimento em ágar sangue e 0,2 ml de plasma. Os tubos eram agitados e incubados a 37°C por quatro horas. A leitura era feita de hora em hora, por inversão dos tubos. Os tubos eram deixados em observação por mais 24 horas em temperatura ambiente. A presença de coágulo, total ou parcial, era considerado como positivo.

A associação entre patógenos presentes em possíveis elos da cadeia epidemiológica da mamite, foi analisada através do teste de Qui-quadrado, com correção de Yates, com  $p < 0,05$ . As frequências desses microorganismos, presentes na pele e meatos das tetas, antes da ordenha e imediatamente após ordenha manual, com mãos previamente lavadas ou desinfetadas, foram comparadas pelo teste "t" de Student, com  $p < 0,05$ , conforme STEEL & TORRIE (1960).

#### 4. RESULTADOS

Todas as amostras de leite foram negativas para as provas de coadura do leite e CMT.

Os dados referentes à contagem global de leucócitos e bacterioscopia são apresentados na TAB. I.

Os resultados dos isolamentos de microorganismos, das mãos dos ordenhadores, são apresentados nas TAB. II, III, IV, V e VI.

Os resultados da TAB. II mostram que das mãos dos nove ordenhadores, Streptococcus agalactiae foi isolado de seis delas (66,7%); Streptococcus dysgalactiae de uma (11,1%); Streptococcus uberis de sete (77,8%); Staphylococcus aureus de uma (11,1%); e outros microorganismos, das nove (100%).

Os resultados da TAB. III mostram que das mãos lavadas com salina e sabão, Streptococcus dysgalactiae foi isolado de uma delas (33,3%); das desinfetadas com iodoform, Streptococcus agalactiae e Staphylococcus aureus foram isolados de uma delas (33,3%); e das desinfetadas com clorhexidina, não foi isolado microorganismo considerado patogênico para a glândula mamária.

Os resultados da TAB. IV mostram que das mãos lavadas com salina e sabão, Staphylococcus aureus foi isolado de uma delas (33,3%); das desinfetadas com iodoform, Streptococcus agalactiae foi isolado de uma de-



las (33,3%), Streptococcus uberis das três (100%), Staphylococcus aureus de uma (33,3%) e coliforme de uma (33,3%); e das desinfetadas com clorhexidina, não foi isolado microorganismo considerado patogênico para a glândula mamária.

Os dados referentes ao isolamento de microorganismos de amostras de leite, são apresentados na TAB. VII. Os resultados dessa tabela mostram que das 35 amostras de leite, provenientes de nove vacas, foram isolados microorganismos considerados patogênicos para a glândula mamária, de 10 amostras (28,6%), em um total de oito vacas (88,9%).

Dentre os microorganismos, Streptococcus agalactiae foi isolado de dois quartos (5,7%), em duas vacas (22,2%); Streptococcus dysgalactiae, de três quartos (8,6%), em três vacas (33,3%); Streptococcus uberis, de dois quartos (5,7%), em duas vacas (22,2%); Staphylococcus aureus, de seis quartos (17,1%), em cinco vacas (55,6%); e coliforme, de um quarto (2,9%), em uma vaca (11,1%).

Os dados referentes ao isolamento de microorganismos da pele das tetas, são apresentados nas TAB. VIII e IX, e dos meatos galactóforos externos, nas TAB. X e XI.

Os resultados da TAB. VIII mostram que das 35 tetas, de nove vacas, foram isolados patógenos para a glândula mamária, de 31 tetas (88,6%) nas nove vacas (100%).

Dentre os microorganismos, Streptococcus agalactiae foi isolado de 17 tetas (48,6%), em sete vacas (77,8%); Streptococcus uberis, de 10 tetas (28,6%), em cinco vacas (55,6%); Staphylococcus aureus, de quatro tetas (11,4%), em três vacas (33,3%); e coliformes, de nove tetas (25,7%), em seis vacas (66,7%).

Os resultados da TAB. IX mostram que das 35 tetas, de nove vacas, foram isolados patógenos para a glândula mamária, de 21 tetas (60,0%), em oito vacas (88,9%).

Dentre os microorganismos, Streptococcus agalactiae foi isolado de oito tetas (22,9%), em cinco vacas (55,6%); Streptococcus dysga-

lactiae, de uma teta (2,9%), em uma vaca (11,1%); Streptococcus uberis, de 10 tetas (28,6%), em quatro vacas (44,4%); Staphylococcus aureus, de três tetas (8,6%), em uma vaca (11,1%); e coliformes, de cinco tetas (14,4%), em quatro vacas (44,4%).

Os resultados da TAB. X mostram que dos meatos das 35 tetas, de nove vacas, foram isolados patógenos para a glândula mamária, de 16 meatos (45,7%), em sete vacas (77,8%).

Dentre os microorganismos, Streptococcus agalactiae foi isolado de seis meatos (17,1%), em três vacas (33,3%); Streptococcus dysgalactiae, de quatro meatos (11,4%), em quatro vacas (44,4%); Streptococcus uberis, de dois meatos (5,7%), em duas vacas (22,2%); Staphylococcus aureus, de seis meatos (17,1%), em quatro vacas (44,4%); e coliformes, de cinco meatos (14,3%), em quatro vacas (44,4%).

Os resultados da TAB. XI mostram que dos meatos das 35 tetas, de nove vacas, foram isolados patógenos para a glândula mamária, de 15 meatos (42,9%), em oito vacas (88,9%).

Dentre os microorganismos, Streptococcus agalactiae foi isolado de oito meatos (22,9%), em quatro vacas (44,4%); Streptococcus dysgalactiae, de um meato (2,9%), em uma vaca (11,1%); Streptococcus uberis, de dois meatos (5,7%), em duas vacas (22,2%); Staphylococcus aureus, de cinco meatos (14,3%), em cinco vacas (55,6%); e coliformes, de três meatos (8,6%), em três vacas (33,3%).

TABLE I - Contagem global de leucócitos e bacterioscopia em amostras individuais de leite.

N.º de orden da vaca	Quarto	N.º de leucócitos por ml	Bacterioscopia	Características morfológicas
1	AD	174.640	N	
	FD	349.280	N	
	AE	0	N	
	PE	0	N	
2	AD	0	N	
	PD	87.320	P	Cocos Gram P em cachos
	AE	87.320	N	
	PE	174.640	N	
3	AD	0	N	
	PD	87.320	N	
	AE	174.640	N	
4	AD	523.920	P	Cocos Gram P em cachos e em cadeias
	PD	873.200	N	
	AE	960.520	N	
	PE	436.600	N	
5	AD	0	P	Cocos Gram P em cachos
	PD	87.320	N	
	AE	87.320	P	Cocos Gram P em cadeias longas
	PE	174.640	N	
6	AD	174.640	N	
	FD	0	N	
	AE	87.320	N	
	PE	174.640	N	
7	AD	0	N	
	FD	349.280	P	Cocos Gram P em cachos
	AE	349.280	N	
	PE	261.960	N	
8	AD	174.640	P	Cocos Gram P em cadeias curtas e em cachos
	PD	87.320	N	
	AE	174.640	P	Cocos Gram P em cadeias curtas e longas
	PE	—**		
9	AD	—***		
	PD	174.640	P	Cocos Gram P em cadeias curtas e médias
	AE	261.960	N	
	PE	436.600	P	Cocos Gram P em cadeias curtas e em cachos

\* Ausência de teta

\*\* Secreção escassa e purulenta

\*\*\* Secreção abundante, não purulenta

TABELA II - Isolamento de microorganismos das mãos de ordenhadores, sem lavagem ou desinfecção prévia, imediatamente antes da ordenha.

N.º de orden do ordenhador	Microorganismos					Total
	Streptococcus			Staphylococcus	Outros*	
	agalactiae	dysgalactiae	uberis	aureus		
1	P	-	P	-	P	3
2	P	-	-	-	P	2
3	-	-	P	-	P	2
4	-	-	P	-	P	2
5	P	-	P	P	P	4
6	-	P	P	-	P	3
7	P	-	P	-	P	3
8	P	-	P	-	P	3
9	P	-	-	-	P	2
Total	6	1	7	1	9	24

\* Microorganismos não enquadrados nos objetivos do trabalho.

TABELA III - Isolamento de microorganismos das mãos de ordenhadores, depois de submetidas a três tratamentos\* diferentes, antes da ordenha.

N.º de orden do ordenhador	Trata- mentos	Microorganismos				Total
		Streptococcus		Staphylococcus	Outros**	
		agalactiae	dysgalactiae	aureus		
1	A	-	P	-	P	2
2	B	P	-	P	P	3
3	C	-	-	-	P	1
4	A	-	-	-	P	1
5	B	-	-	-	P	1
6	C	-	-	-	P	1
7	A	-	-	-	P	1
8	B	-	-	-	P	1
9	C	-	-	-	P	1
Total		1	1	1	9	12

\* Tratamentos: A - Lavagem com salina estéril e sabão. B - Desinfetadas com iodoform. C - Desinfetadas com clorhexidina.

\*\* Microorganismos não enquadrados nos objetivos do trabalho.

TABELA IV - Isolamento de microorganismos das mãos de ordenhadores, depois de submetidas a três tratamentos\* diferentes e pós-ordenação manual de tetas\*\* não lavadas.

N.º de ordem do ordenhador	Tra- ta- men- tos	N.º de tetas orde- nhadas	Microorganismos				Total	
			Streptococcus agalactiae	Streptococcus uberis	Staphylococcus aureus	Coli- Ou- forme tros***		
1	A	4	-	-	P	-	P	2
2	B	4	P	P	P	-	P	4
3	C	3	-	-	-	-	P	1
4	A	4	-	-	-	-	P	1
5	B	4	-	P	-	-	P	2
6	C	4	-	-	-	-	P	1
7	A	4	-	-	-	-	P	1
8	B	3	-	P	-	P	P	3
9	C	3	-	-	-	-	P	1
Total		33	1	3	2	1	9	16

\* Tratamentos: A - Lavagem com salina estéril e sabão. B - Desinfetadas com iodoform. C - Desinfetadas com clorhexidina.

\*\* Todas sem lesões externas aparentes.

\*\*\* Microorganismos não enquadrados nos objetivos do trabalho.

TABELA V - Número de colônias em agar sangue, de lavado de mão de ordenhador, após três tratamentos\* diferentes.

N.º de ordem do ordenhador	Trata- mentos	N.º de colônias por ml de lavado	N.º médio de colônias por ml de lavado, por tratamento
1	A	60	
2	B	250	A = 377
3	C	10	
4	A	700	
5	B	810	B = 1020
6	C	0	
7	A	370	
8	B	2000	C = 33
9	C	90	

\* Tratamentos: A - Lavagem das mãos com salina estéril e sabão. B - Desinfecção das mãos com iodoform. C - Desinfecção das mãos com clorhexidina.

TABELA VI - Número de colônias em placas de agar sangue, inoculadas com "swabs" de mãos de ordenhadores, obtidos antes e depois de ordenha manual de tetas\* não lavadas, com ou sem tratamento\*\* prévio das mãos.

N.º de ordem do or- denha dor	N.º de tetas ordc- nhadas	Tra- ta- men- tos	Antes da ordenha			% média de redu- ção por trat.	Pós ordenha N.º de colô- nias por placa
			N.º de colônias por placa		% de re- dução por trat.		
			Sem trat.	Após trat.			
1	4	A	0	>600	0		285
2	4	B	>600	>600	0	A: 46,5	>600
3	3	C	>600	18	97,0		0
4	4	A	>600	255	57,5		>600
5	4	B	>600	>600	0	B: 29,3	>600
6	4	C	>600	27	95,5		450
7	4	A	>600	108	82,0		>600
8	3	B	>600	72	88,0	C: 97,3	>600
9	3	C	>600	3	99,5		195

\* Todas sem lesões externas aparentes.

\*\* Tratamentos: A - Lavagem com salina estéril e sabão. B - Desinfecção com Iodoform. C - Desinfecção com clorhexidina.

TABELA VII - Isolamento de microorganismos, frequentes causadores de mamite, de amostras individuais de leite.

N.º de ordem da vaca	Quarto	Microorganismos					Total
		Streptococcus			Staphylococcus	Coli- forme	
		agal.	dysgal.	uberis	aureus		
1	AD	-	-	-	-	-	0
	PD	-	-	-	-	-	0
	AE	-	-	-	-	-	0
	PE	-	P	-	-	-	1
2	AD	-	-	-	P	-	1
	PD	-	-	-	P	-	1
	AE	-	-	-	-	-	0
	PE	-	-	-	-	-	0
3	AD	-	-	-	-	-	0
	PD	-	-	-	-	-	0
	AE	-	-	-	P	-	1
	-*	-	-	-	-	-	-
4	AD	-	-	-	-	-	0
	PD	-	-	-	-	-	0
	AE	-	-	-	-	-	0
	PE	P	-	P	-	-	2
5	AD	-	-	-	-	-	0
	PD	-	-	-	-	-	0
	AE	-	P	-	P	-	2
	PE	-	-	-	-	-	0
6	AD	-	-	-	-	-	0
	PD	-	-	-	-	-	0
	AE	-	-	-	-	-	0
	PE	-	-	-	-	-	0
7	AD	-	-	-	-	-	0
	PD	-	-	P	-	-	1
	AE	-	-	-	-	-	0
	PE	-	-	-	-	-	0
8	AD	-	-	-	-	-	0
	PD	-	-	-	-	-	0
	AE	P	-	-	P	-	2
	PE**	-	-	-	-	P	1
9	AD***	-	P	-	P	-	2
	PD	-	-	-	-	-	0
	AE	-	-	-	-	-	0
	PE	-	-	-	-	-	0
Total	35	2	3	2	6	1	14

\* Ausência da teta.

\*\* Secreção escassa e purulenta.

\*\*\* Secreção aquosa, não purulenta.

TABELA VIII.- Isolamento de microorganismos, frequentes causadores de mamite, da pele de tetas, sem lavagem prévia, antes da ordenha.

N.º de ordenha da vaca	Teta	Microorganismos			Total	
		Streptococcus		Staphylococcus		Coli-formes
		agalactiae	uberis	aurcus		
1	AD	P	-	P	-	2
	PD	P	-	-	-	1
	AE	P	-	-	-	1
	PE	P	-	P	-	2
2	AD	P	-	-	-	1
	PD	P	-	-	-	1
	AE	P	-	-	-	1
	PE	P	-	P	-	2
3	AD	-	-	-	P	1
	PD	-	P	-	-	1
	AE	-	P	-	-	1
	..*	-	-	-	-	-
4	AD	-	P	-	-	1
	PD	P	-	-	P	2
	AE	-	P	-	P	2
	PE	P	-	-	-	1
5	AD	-	P	-	-	1
	PD	P	P	-	-	2
	AE	P	-	-	-	1
	PE	P	P	-	-	2
6	AD	-	P	P	-	2
	PD	-	-	-	-	0
	AE	-	-	-	P	1
	PE	-	-	-	-	0
7	AD	-	P	-	-	1
	PD	-	-	-	P	1
	AE	-	P	-	-	1
	PE	P	-	-	-	1
8	AD	-	-	-	-	0
	PD	-	-	-	-	0
	AE	P	-	-	P	2
	PE**	P	-	-	-	1
9	AD***	-	-	-	P	1
	PD	-	-	-	P	1
	AE	-	-	-	P	1
	PE	P	-	-	-	1
Total	35	17	10	4	9	40

\* Ausência da teta.  
 \*\* Secreção escassa e purulenta.  
 \*\*\* Secreção aquosa, não purulenta.



TABELA IX - Isolamento de microorganismos, freqüentes causadores de mamite, da pele de tetas, sem lavagem prévia, após ordenha com mãos anteriormente submetidas a três tratamentos diferentes.

N.º de ordem da vaca	Tratamento das mãos	Teta	Microorganismos					Total	
			Streptococcus			Staphylococcus	Coli-formes		
			agal.	dysgal.	uberis	aureus			
1	A	AD	P	-	-	P	-	2	
		PD	P	-	-	-	-	1	
		AE	P	-	-	P	-	2	
		PE	-	-	-	P	-	1	
2	B	AD	-	-	-	-	-	0	
		PD	-	-	P	-	-	1	
		AE	-	-	P	-	-	1	
		PE	P	-	P	-	-	2	
3	C	AD	-	-	-	-	-	0	
		PD	P	-	-	-	-	1	
		AE	-	-	-	-	-	0	
		***	-	-	-	-	-	-	
4	A	AD	-	-	P	-	-	1	
		PD	-	-	-	-	-	0	
		AE	-	-	P	-	-	1	
		PE	-	-	-	-	-	0	
5	B	AD	-	-	P	-	-	1	
		PD	-	-	P	-	-	1	
		AE	-	-	P	-	-	1	
		PE	-	-	-	-	P	1	
6	C	AD	-	-	-	-	-	0	
		PD	-	-	-	-	-	0	
		AE	-	-	-	-	-	0	
		PE	-	-	-	-	-	0	
7	A	AD	-	-	-	-	-	0	
		PD	-	-	-	-	-	0	
		AE	-	-	-	-	P	1	
		PE	-	-	-	-	-	0	
8	B	AD	-	-	P	-	P	2	
		PD	-	P	P	-	-	2	
		AE	P	-	-	-	-	1	
		PE***	P	-	-	-	-	1	
9	C	AD****P	-	-	-	-	P	2	
		PD	-	-	-	-	P	1	
		AE	-	-	-	-	-	0	
		PE	-	-	-	-	-	0	
Total			35	8	1	10	3	5	27

\* Tratamentos: A - Lavagem com salina e sabão. B - Desinfecção com iodoform.  
C - Desinfecção com clorhexidina.

\*\* Ausência da teta.

\*\*\* Secreção escassa e purulenta.

\*\*\*\* Secreção aquosa, não purulenta.

TABELA X - Isolamento de microorganismos, frequentes causadores de mamite, do leite galactóforo externo, de tetas, sem lavagem prévia, antes da ordenha.

N.º de orden da vaca	Teta	Microorganismos					Total
		Streptococcus			Staphylococcus	Coli-	
		agal.	dysgal.	uberis	aurcus	formes	
1	AD	P	P	-	-	-	2
	PD	P	-	-	-	-	1
	AE	P	-	P	-	-	2
	PE	-	-	-	-	P	1
2	AD	-	-	-	P	-	1
	PD	P	-	-	-	-	1
	AE	-	-	-	-	-	0
	PE	-	-	-	-	-	0
3	AD	-	P	-	-	-	1
	PD	-	-	-	-	-	0
	AE	-	-	P	-	-	1
	*	-	-	-	-	-	-
4	AD	-	-	-	-	P	1
	PD	-	-	-	-	-	0
	AE	-	-	-	-	-	0
	PE	-	-	-	-	-	0
5	AD	-	-	-	-	-	0
	PD	-	-	-	-	-	0
	AE	-	P	-	P	-	2
	PE	-	-	-	-	-	0
6	AD	-	-	-	-	-	0
	PD	-	-	-	-	-	0
	AE	-	-	-	-	-	0
	PE	-	-	-	-	-	0
7	AD	-	-	-	-	-	0
	PD	-	-	-	-	-	0
	AE	-	-	-	-	-	0
	PE	-	-	-	-	-	0
8	AD	-	-	-	P	P	2
	PD	-	P	-	-	-	1
	AE	P	-	-	P	-	2
	PE**	P	-	-	P	P	3
9	AD***	-	-	-	P	-	1
	PD	-	-	-	-	P	1
	AE	-	-	-	-	-	0
	PE	-	-	-	-	-	0
Total	35	6	4	2	6	5	23

\* Ausência da teta.

\*\* Secreção escassa e purulenta.

\*\*\* Secreção aquosa, não purulenta.

TABELA XI - Isolamento de microorganismos, freqüentes causadores de mamite, do leite galeotóforo externo, de tetas, sua lavagem prévia, após ordenha com mãos anteriormente submetidas a três tratamentos diferentes.

N.º de ordem da vaca	Tratamen to das mãos	Teta	Microorganismos					Total
			Streptococcus		Staphylococcus	Coli- formes		
			agal.	dysgal.	uberis		aureus	
1	A	AD	P	-	-	P	-	2
		PD	-	-	P	-	-	1
		AE	P	-	-	-	-	1
		PE	-	-	-	-	-	0
2	B	AD	-	-	-	P	-	1
		PD	-	-	-	-	-	0
		AE	-	-	-	-	-	0
		PE	-	-	-	-	-	0
3	C	AD	-	-	-	-	-	0
		PD	-	-	-	-	-	0
		AE	-	-	-	-	-	0
		PE**	-	-	-	-	-	-
4	A	AD	P	-	-	P	-	2
		PD	-	-	P	-	-	1
		AE	P	-	-	-	-	1
		PE	-	-	-	-	-	0
5	B	AD	-	-	-	-	-	0
		PD	-	-	-	P	-	1
		AE	-	-	-	-	-	0
		PE	-	-	-	-	-	0
6	C	AD	-	-	-	-	-	0
		PD	-	-	-	-	-	0
		AE	-	-	-	-	-	0
		PE	-	-	-	-	P	1
7	A	AD	P	-	-	-	-	1
		PD	-	-	-	-	-	0
		AE	-	-	-	-	-	0
		PE	P	-	-	-	-	1
8	B	AD	P	-	-	-	-	1
		PD	-	-	-	-	-	0
		AE	P	-	-	-	P	2
		PE***	-	P	-	-	-	1
9	C	AD****	-	-	-	P	P	2
		PD	-	-	-	-	-	0
		AE	-	-	-	-	-	0
		PE	-	-	-	-	-	0
Total		35	8	1	2	5	3	19

\* Tratamentos: A - Lavagem com salina e sabão. B - Desinfecção com iodoform. C - Desinfecção com clorhexidina.

\*\* Ausência de teta.

\*\*\* Secreção escassa e purulenta.

\*\*\*\* Secreção aquosa, não purulenta.

## 5. DISCUSSÃO

5.1. Frequência de patógenos nas mãos de ordenhadores e ação de desinfetantes entre elos da cadeia epidemiológica da mamite.

As publicações a respeito de isolamento de microorganismos patogênicos das mãos de ordenhadores, são em parte, contraditórias (NEWBOULD, 1965).

O isolamento de estreptococo, principalmente Streptococcus agalactiae, das mãos de ordenhadores, tem sido registrado por vários autores, dentre os quais, JONES (1918), U.K. AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL (1944), SPENCER et alii (1946), CHODKOWSKI & LANCASTER (1949) e CHODKOWSKI (1949). Quanto a estafilococos, ênfase no Staphylococcus aureus, isolamentos tem sido registrados por NEAVE et alii (1962a) e DODD et alii (1966). Por outro lado, SPENCER et alii (1946) e SPENCER & LASMANIS (1952) não conseguiram isolar, respectivamente, Streptococcus agalactiae e micrococos (estafilococos), produtores de coagulase, das mãos de ordenhadores que utilizavam máquinas de ordenhar.

Os resultados obtidos no presente trabalho (TAB. II), de mãos de ordenhadores, sem lavagem ou desinfecção, antes da ordenha, mostram uma frequência de isolamento de 100% para germes habitualmente patogênicos para a glândula mamária, assim distribuídos: 66,7% para Streptococcus agalactiae; 11,1% para Streptococcus dysgalactiae; 77,8% para Streptococcus

uberis; 11,1% para Staphylococcus aureus e, também, 100% para outros microorganismos não enquadrados nos objetivos do estudo.

Nas mãos dos nove ordenhadores, foram isolados mais de uma espécie de microorganismos. Em uma delas, todos eles.

Após lavagem ou desinfecção das mãos (TAB. III), a frequência de mãos contaminadas com microorganismos considerados patogênicos para a glândula mamária diminuiu 4,5 vezes (22,2%), quando comparada com os resultados da TAB. II, ao passo que outros microorganismos foram isolados de todas elas (100%). Das mãos lavadas com salina e sabão, Streptococcus dysgalactiae foi isolado de uma (33,3%); das desinfetadas com iodoform, Streptococcus agalactiae e Staphylococcus aureus foram isolados de uma (33,3%); e das desinfetadas com clorhexidina, nenhum microorganismo considerado patogênico foi isolado.

Tomando-se como base os resultados dos tratamentos preventivos realizados nas mãos dos ordenhadores, resumidos na TAB. III, após ordenha manual de tetas não lavadas (TAB. IV) houve aumento de duas vezes (44,4%) na frequência de mãos contaminadas com microorganismos considerados patogênicos para a glândula mamária, embora daquelas mãos que haviam sido desinfetadas com clorhexidina não foi possível isolar nenhum microorganismo patogênico. Das mãos lavadas com salina e sabão, Staphylococcus aureus foi isolado de uma (33,3%); das desinfetadas com iodoform, Streptococcus agalactiae foi isolado de uma (33,3%), Streptococcus uberis, das três (100%), Staphylococcus aureus, de uma (33,3%) e coliforme de uma (33,3%). A falta de isolamento de patógenos, das mãos desinfetadas com clorhexidina, após ordenharem tetas não lavadas (TAB. IV), acreditamos poder ser explicada pela possibilidade de presença de resíduos do desinfetante nas mãos, apesar das medidas de precauções tomadas. O isolamento de microorganismos, de todas as mãos, embora não considerados patogênicos em sua totalidade, demonstra a possibilidade de veiculação de germes de animal a outro através da mão do ordenhador, mesmo desinfetada previamente.

As frequências de isolamento de microorganismos, das mãos de ordenhadores, obtidos por outros pesquisadores, são bastante variadas, como também, são os métodos de colheita do material. Alguns obtiveram o material de mãos lavadas ou desinfetadas e outros não. Algumas dessas frequências se aproximam às nossas, ao passo que outras diferem. O isolamento de estreptococo hemolítico da mão de ordenhador, foi obtido antes e após lavagem com água e sabão, por JONES (1918). As frequências de isolamento de Streptococcus agalactiae encontradas por U.K. AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL (1944), SPENCER et alii (1946), CHODKOWSKI & LANCASTER (1949) e CHODKOWSKI (1949) foram, respectivamente, 71,1%, 20%, 80% e 39%, sendo que a frequência obtida por SPENCER et alii (1946) foi a partir de mãos lavadas com água e sabão e desinfetadas com solução contendo 200 ppm de cloro disponível, e a obtida por CHODKOWSKI & LANCASTER (1949), a partir de mãos lavadas com água de torneira.

Os resultados encontrados no presente trabalho (TAB. III, V e VI) mostram uma melhor ação da clorhexidina sobre microorganismos das mãos dos ordenhadores. Resultados superiores da clorhexidina sobre Staphylococcus aureus presente nas mãos de ordenhadores, foram também encontrados por NEAVE et alii (1962a).

Uma frequência de mãos infectadas com Staphylococcus aureus de 50% antes da ordenha e de 100% durante a ordenha, foi encontrada por DODD et alii (1966) pesquisando mãos de ordenhadores. Esses valores foram superiores aos encontrados em nosso trabalho, que foram 11,1% antes da ordenha (TAB. II) e 22,2% após ordenha (TAB. IV). O fato de termos encontrado uma frequência menor antes da ordenha pode ser devido a diferenças de técnicas mas, após ordenha, certamente foi devido ao poder residual dos desinfetantes usados nas mãos dos ordenhadores antes da ordenha.

Apesar de ser esperado maior frequência de coliforme nas mãos dos ordenhadores, isto não aconteceu. Dos "swabs" obtidos, antes da ordenha (TAB. II e III), não nos foi possível isolar nenhum coliforme. Somen-

te de uma mão desinfetada com iodoform e após ordenha manual de tetas não lavadas (TAB. IV), isolamos coliforme.

Os resultados das TAB. V e VI mostram que a clorhexidina foi mais eficiente do que salina com sabão e iodoform, na redução do número de colônias isoladas das mãos dos ordenhadores. Por outro lado, a lavagem das mãos com salina e sabão mostrou mais efetiva do que o iodoform. Os resultados superiores da salina com sabão sobre o iodo talvez possa ser explicado pela ação mecânica da lavagem, ou inibição do iodo, face à presença de matéria orgânica.

O iodoform, em valores médios, apresentou menor eficiência na eliminação ou redução de microorganismos das mãos dos ordenhadores. Ele foi ineficiente em reduzir o número de microorganismos das mãos dos ordenhadores de números dois e cinco mas, para o de número oito, foi bastante eficiente (TAB. VI). Acreditamos que esta disparidade de resultados seja em função da maior ou menor quantidade de matéria orgânica nas mãos dos ordenhadores.

O resultado contraditório obtido com a mão do ordenhador de número um (TAB. VI), onde não se isolou bactéria alguma, embora não tenha sido submetida a nenhum tratamento, a nosso ver poderia ser explicado por deficiências de técnicas de colheita do material, pouco provável, ou eventual presença de algum agente inibidor dos comumente empregados em sala de ordenha.

Na maioria das mãos, o número total de bactérias isoladas aumentou, quando as mãos, anteriormente lavadas ou desinfetadas, ordenharam tetas não lavadas. Excessão para as mãos dos ordenhadores de números um e três, que tiveram o número de bactérias diminuído e, para os de números dois e cinco, que tiveram o número inalterado (TAB. VI). Esse resultado contraditório obtido com as mãos dos ordenhadores de números um e três, onde se isolou número menor de bactérias, no primeiro caso, e nenhuma bactéria no segundo, apesar deles terem ordenhado tetas não lavadas, a nosso ver poderia ser explicado por deficiências de técnicas de colheita do ma-

terial, também pouco provável, ou eventual presença de agente inibidor nas tetas ordenhadas.

As porcentagens médias de redução do número total de bactérias das mãos dos ordenhadores (TAB. VI), foram 29,3, 46,5 e 97,3, para mãos lavadas ou desinfetadas, respectivamente, com iodoform, salina com sabão e clorhexidina.

Os nossos resultados com relação a clorhexidina, se aproximam daqueles de GERRING et alii (1968), que encontraram redução de Staphylococcus aureus sobre as tetas, de 81, 97 e 97% em três grupos de vacas estudadas, e também com os de SCHULTZE & SMITH (1970), que encontraram uma redução de 95% sobre a microflora residente sobre o ápice da teta.

A eficiência do iodoform e clorhexidina, na redução ou eliminação de microorganismos dos ápices das tetas, também tem sido mostrada, respectivamente, por ZARKOWER & SCHEUCHENZUBER (1977) e SILVA (1979). O iodoform quando comparado com o hipoclorito de sódio e hexaclorofeno, não mostrou diferenças significativas (HANSEN, 1971).

## 5.2. Frequência de patógenos em amostras de leite.

Os resultados encontrados no presente estudo (TAB. VII) mostram uma frequência de isolamento de microorganismos considerados patogênicos para a glândula mamária, em 28,6% das amostras de leite examinadas e 88,9% das vacas examinadas. Com relação ao número de vacas, os nossos achados se aproximam muito daqueles obtidos por FIGUEIREDO (1959), LANGENEGGER et alii (1970) e GIESECKE et alii (1971), que encontraram, respectivamente, frequências de 72,7, 85,7 e 84,1%. Outros autores, no entanto, encontraram frequências menores do que as nossas. Estas variavam de 6,2 a 56% (MARTINEZ, 1958; ZIV & NACHMAN, 1972; HAVELKA, 1973; HARROP et alii, 1975; HAVELKA et alii, 1977). Tais discrepâncias podem ser devidas a diversidade de técnicas ou métodos de estudo utilizados.

Com relação ao número de amostras examinadas, autores como



FERNANDES et alii (1973) e BRYSON & THOMSON (1976) encontraram frequências superiores à do presente trabalho, respectivamente, 45 até 100% e 53,0%. Admite-se como fator importante para o isolamento a presença de sinais clínicos de mamite. Estes autores usaram este tipo de material enquanto nós não nos ativemos a tal categoria de animais. Ao contrário, se verificarmos os dados do CMT, reação intimamente ligada ao aumento de leucócitos na glândula mamária, todos nossos animais eram negativos.

Dentre os microorganismos isolados (TAB. VII), Streptococcus agalactiae foi isolado de dois quartos (5,7%), em duas vacas (22,2%); Streptococcus dysgalactiae, de três quartos (8,6%), em três vacas (33,3%); Streptococcus uberis, de dois quartos (5,7%), em duas vacas (22,2%); Staphylococcus aureus, de seis quartos (17,1%), em cinco vacas (55,6%); e coliforme, de um quarto (2,9%), em uma vaca (11,1%).

Os nossos achados mostram uma frequência de isolamento de Streptococcus agalactiae, próxima àquelas encontradas por LANGENEGER et alii (1970) e HAVELKA et alii (1977), respectivamente, 24,7 e 16,3% e superior às de ZIV & NACHMAN (1972), HAVELKA (1973) e HARROP et alii (1975), respectivamente, 3,2, 12,5 e 14,1%, sendo, no entanto, inferior às encontradas por HOARE & BARTON (1972) e FERNANDES et alii (1973), respectivamente, 12,7 e 33%.

Com relação ao Streptococcus dysgalactiae, a frequência de nossos achados é superior àquelas encontradas por LANGENEGER et alii (1970), HOARE & BARTON (1972), FERNANDES et alii (1973) e HARROP et alii (1975), respectivamente, 17,2, 0,9, 4 e 18,9%.

Com relação ao Streptococcus uberis, a frequência de nossos achados é superior àquelas encontradas por LANGENEGER et alii (1970) e HOARE & BARTON (1972), respectivamente, 4,6 e 1,4% e inferior à de HARROP et alii (1975), que foi 31,2%.

A frequência de Staphylococcus aureus, encontrada no presente trabalho, foi superior à de todos os outros microorganismos estudados. Es-

se fato, foi também encontrado por FIGUEIREDO (1959), LANGENEGGER et alii (1970), HOARE & BARTON (1972), LAUERMAN et alii (1973), FERNANDES et alii (1973), HARROP et alii (1975) e SILVA (1977). Já em 1955, no Brasil, mamite por Staphylococcus aureus, era uma preocupação (ZANI NETO, 1955). Esta frequência de aproxima daquelas encontradas por LANGENEGGER et alii (1970) e HARROP et alii (1975), que foram, respectivamente, 53,1 e 59,2%. No entanto, foi superior às encontradas por ZIV & NACHMAN (1972), HAVELKA (1973) e HAVELKA et alii (1977), respectivamente, 20,6, 5,3 e 2,5% e inferior às encontradas por HOARE & BARTON (1972), LAUERMAN et alii (1973) e FERNANDES et alii (1973), respectivamente, 34,1, 27,1 e 50%.

Com relação aos microorganismos coliformes, a frequência encontrada neste trabalho foi baixa, ou seja, somente isolados de uma amostra de leite (2,9%), em uma vaca (11,1%). Com relação ao número de isolamentos, a frequência foi de 7,1%, sendo portanto, superior àquela encontrada para bacilares, por FIGUEIREDO (1959), que foi de 4,3% e inferior àquela encontrada para coliforme, por BRYSON & THOMSOM (1976), que foi de 29,5%.

Para efeito de comparação com outros autores, utilizamos frequências, ora entre vacas, ora entre amostras examinadas. Todos estes achados e comparações indicam a dificuldade de se analisar estudos realizados em épocas e regiões diferentes onde, talvez, técnicas e métodos empregados tenham sido substituídos devido superação ou impossibilidade de adequação à época atual ou à nossa região.

### 5.3. Frequência de microorganismos na pele e meatos das tetas.

Da pele de 35 tetas, de nove vacas (TAB. VIII), foram isolados patógenos para a glândula mamária, de 31 tetas (88,6%), nas nove vacas (100%).

Dentre os microorganismos, Streptococcus agalactiae foi isolado de 17 tetas (48,6%), em sete vacas (77,8%); Streptococcus uberis, de 10 tetas (28,6%), em cinco vacas (55,6%); Staphylococcus aureus, de quatro te-

tas (11,4%), em três vacas (33,3%); e coliformes, de nove tetas (25,7%), em seis vacas (66,7%).

Após ordenha manual das 35 tetas destas nove vacas, com mãos anteriormente lavadas ou desinfetadas (TAB. IX), foram isolados patógenos para a glândula mamária, de 21 tetas (60,0%), em oito vacas (88,9%).

Dentre os microorganismos, Streptococcus agalactiae foi isolado de oito tetas (22,9%), em cinco vacas (55,6%); Streptococcus dysgalactiae, de uma teta (2,9%), em uma vaca (11,1%); Streptococcus uberis, de 10 tetas (28,6%), em quatro vacas (44,4%); Staphylococcus aureus, de três tetas (8,6%), em uma vaca (11,1%); e coliformes, de cinco tetas (14,3%), em quatro vacas (44,4%).

Não houve diferença significativa entre as frequências de isolamento, antes e depois da ordenha.

O isolamento de Streptococcus agalactiae de pele de teta, foi feito por CHODKOWSKI & LANCASTER (1949), CHODKOWSKI (1949), LANCASTER & STUART (1949), e de Streptococcus dysgalactiae e Staphylococcus aureus, por NEAVE & OLIVER (1962).

A frequência de isolamento de Streptococcus agalactiae, encontrada neste trabalho (TAB. VIII), se aproxima daquela encontrada por CHODKOWSKI & LANCASTER (1949), que foi 87,5% e é superior à encontrada por CHODKOWSKI (1949), que foi 38%. A frequência de isolamento deste microorganismo da pele de teta é variável de acordo com o método utilizado. CHODKOWSKI & LANCASTER (1949) encontraram nos mesmos animais, frequências de 87,5 e 12,5, quando utilizaram métodos diferentes. O isolamento deste microorganismo, de tetas com feridas ou escoriações é mais frequente do que de tetas sem lesões (CHODKOWSKI, 1949). Não há diferenças entre vacas, na eliminação de Streptococcus agalactiae, da pele de tetas, entre ordenhas (LANCASTER & STUART, 1949).

A frequência de isolamento de Staphylococcus aureus, entre vacas examinadas, encontrada no presente trabalho (TAB. VIII), se aproxima

daquelas encontradas por NEAVE & OLIVER (1962) que foram 35,7 e 46,4%, quando utilizaram, respectivamente, plaqueamento direto e método de enriquecimento.

Com relação ao número de tetas examinadas, a frequência encontrada neste trabalho (TAB. VIII), foi inferior às de NEAVE & OLIVER (1962), obtidas de tetas contaminadas experimentalmente com Staphylococcus aureus, que foram 16,1 e 23,3%.

O isolamento de microorganismos de pele de tetas, de quartos infectados, é mais frequente do que dos não infectados. Utilizando-se métodos de enriquecimento, a frequência de isolamento de Staphylococcus aureus, da pele de tetas, aumenta (NEAVE & OLIVER, 1962). Por outro lado, métodos seletivos de isolamento não dão 100% de isolamento de microorganismos de material altamente contaminado (CHODKOWSKI, 1949).

Dos meatos das 35 tetas, de nove vacas (TAB. X), foram isolados patógenos para a glândula mamária, de 16 meatos (45,7%), em sete vacas (77,8%).

Dentre os microorganismos, Streptococcus agalactiae foi isolado de seis meatos (17,1%), em três vacas (33,3%); Streptococcus dysgalactiae, de quatro meatos (11,4%), em quatro vacas (44,4%); Streptococcus uberis, de dois meatos (5,7%), em duas vacas (22,2%); Staphylococcus aureus, de seis meatos (17,1%), em quatro vacas (44,4%); e coliformes, de cinco meatos (14,3%), em quatro vacas (44,4%).

Após ordenha manual das 35 tetas destas nove vacas, com mãos anteriormente lavadas ou desinfetadas (TAB. XI), foram isolados patógenos para a glândula mamária, de 15 meatos (42,9%), em oito vacas (88,9%).

Dentre os microorganismos, Streptococcus agalactiae foi isolado de oito meatos (22,9%), em quatro vacas (44,4%); Streptococcus dysgalactiae, de um meato (2,9%), em uma vaca (11,1%); Streptococcus uberis, de dois meatos (5,7%), em duas vacas (22,2%); Staphylococcus aureus, de cinco meatos (14,3%), em cinco vacas (55,6%); e coliformes, de três meatos (8,6%),

em três vacas (33,3%).

Não houve diferença significativa entre as frequências de isolamento, antes e depois da ordenha.

O isolamento de Streptococcus uberis, do meato de teta, foi obtido, também, por NEAVE & OLIVER (1962), e de Staphylococcus aureus, por NEAVE & OLIVER (1962) e SCHULTZE & SMITH (1970). Também o isolamento de estafilococos, estreptococos e organismos Gram-negativos, foi feito por ZARKOWER & SCHEUCHENZUBER (1977).

A frequência de isolamento de Streptococcus uberis, de meato de teta, encontrada neste trabalho (TAB. X), foi ligeiramente superior àquela encontrada por NEAVE & OLIVER (1962) que foi 3,9%.

Com relação ao Staphylococcus aureus, os nossos achados (TAB. X) mostram uma frequência superior àquela encontrada por NEAVE & OLIVER (1962), a partir de tetas contaminadas naturalmente, que foi de 7,1% e inferior à obtida pelos mesmos autores, de teta contaminada experimentalmente, que foi 33,3%.

O número total de bactérias e números de estafilococos, estreptococos e organismos Gram-negativos, sobre o ápice das tetas, não diferem significativamente quando as tetas são lavadas ou não, com uma solução à base de iodo (ZARKOWER & SCHEUCHENZUBER, 1977).

Os microorganismos, cocos Gram-positivos, usualmente são encontrados em números maiores sobre as extremidades das tetas, do que microorganismos coliformes (MCDONALD & PACKER, 1968).

As discrepâncias entre as frequências de patógenos na pele e meatos de tetas, do presente trabalho, com as encontradas por outros autores, podem ser explicadas pela diversidade de métodos empregados na colheita e processamento do material e, também devido, talvez, a manejos peculiares de cada propriedade.

Nossas observações autorizam a aventar a possibilidade de que as desinfecções por nós procedidas, com técnicas experimentais ou consa-

gradas, aplicadas às mãos dos ordenhadores, não interferiram com a flora microbiana encontrada na pele (TAB. VIII e IX) e meatos (TAB. X e XI) das tetas.

5.4. Associação de microorganismos entre elos da cadeia epidemiológica da mamite.

As associações entre microorganismos considerados patogênicos para a glândula mamária, presentes na pele e em meatos das tetas, antes da ordenha (TAB. VIII e X), na pele das tetas, antes da ordenha e em amostras de leite (TAB. VIII e VII), nos meatos das tetas, antes da ordenha e em amostras de leite (TAB. X e VII), nas mãos dos ordenhadores e na pele das tetas, após ordenha (TAB. IV e IX), nas mãos dos ordenhadores, após ordenha e em amostras de leite (TAB. IV e VII), não foram significativas, excessão, para o Streptococcus agalactiae, presente na pele e nos meatos das tetas, antes da ordenha, e, para o Staphylococcus aureus, presente nos meatos das tetas, antes da ordenha, e em amostras de leite, que foram associados significativamente.

Embora não tenhamos encontrado uma associação significativa, entre Streptococcus agalactiae, presente na pele de tetas e em amostras de leite, mãos de ordenhadores e amostras de leite, SPENCER et alii (1946) afirmam que se Streptococcus agalactiae vive como flora residente sobre a pele das tetas, a disseminação pode ocorrer via o canal do leite, para dentro do canal da teta, em qualquer época. Além disso, LANCASTER & STUART (1949 e 1951) reproduziram infecção na glândula mamária, com Streptococcus agalactiae, através de ordenha manual com mãos dos ordenhadores contaminadas, em 12 de 18 vacas (66,7%), em um total de 27 quartos e em 13,5% dos quartos de 23 vacas.

Do total de 3.120 exposições experimentais de quartos, à culturas mistas de Streptococcus agalactiae e Aerobacter aerogenes, resultaram 25(0,8%) infecções intramamárias, sendo 13(0,4%) com Streptococcus aga-

lactiae e 12 (0,4%) com Aerobacter aerogenes. A incidência de infecção intramamária, causada por amostras desses microorganismos, pode ser regulada pelo grau de exposição da extremidade da teta (MCDONALD & PACKER, 1968).

Os resultados encontrados no presente trabalho mostram que não houve uma associação significativa entre Staphylococcus aureus, presentes em amostras de leite (TAB. VII) e na pele de tetas (TAB. VIII), e que houve uma maior frequência de isolamento no primeiro do que no segundo caso. Esses resultados discordam daqueles encontrados por SPENCER & LASMANIS (1952) de que vacas, frequentemente, tinham micrococos (estafilococos) hemolíticos sobre a pele das tetas e nenhum no leite. Existe uma relação positiva entre altos números de estafilococos ou Staphylococcus aureus sobre a pele e orifício da teta e infecções estafilocócicas intramamárias (NEAVE & OLIVER, 1962; NEAVE et alii, 1962b; ZARKOWER & SCHEUCHENZUBER, 1978). Quanto mais organismos colocados sobre a teta e orifício da teta, tanto mais infecções intramamárias ocorrerão (NEWBOULD, 1968 e ZARKOWER & SCHEUCHENZUBER, 1978); embora o primeiro autor tenha conseguido produzir infecção intramamária através de inoculação no ducto da teta com, tão pouco quanto, 36 u.f.c. de Staphylococcus aureus.

As frequências, de colonização do ápice da teta com Staphylococcus aureus e de infecção intramamária, por Aerobacter aerogenes e Streptococcus agalactiae, dependem do grau de exposição da extremidade da teta (MCDONALD & PACKER, 1968 e BRAMLEY et alii, 1979).

Os nossos resultados mostram que a frequência de isolamento de coliformes de amostras de leite (TAB. VII), foi muito baixa (somente isolado de um quarto), ao passo que, foi bem alta da pele e meatos de tetas (TAB. VIII e X). A fragilidade destes microorganismos Gram-negativos frente às defesas do animal-fatores específicos e inespecíficos podem justificar tais encontros díspares. Aliás, estes resultados concordam com aqueles de BRAMLEY & NEAVE (1975), que encontraram que taxas de novas infecções com coliformes, são muito mais baixas do que com Staphylococcus aureus, apesar da alta

frequência com que extremidades das tetas tornam-se contaminadas com coliformes. Por outro lado, a inoculação no ducto da teta com até  $43 \times 10^6$  u. f.c. de Escherichia coli, resultou em somente uma colonização transitória do ápice da teta, que raramente persistia por mais do que três a quatro dias (BRAMLEY et alii, 1979).

Além dos fatores já discutidos que procuram justificar as inconstâncias dessas associações, acreditamos que fatores, tais como, características morfológicas das tetas e de seus meatos e resistência específica individual do animal, sejam também importantes.



## 6. CONCLUSÕES

Nas condições em que se realizou a presente pesquisa, obtivemos as seguintes conclusões:

1. O encontro de microorganismos considerados patogênicos para a glândula mamária em todas as mãos de ordenhadores, examinadas antes da ordenha e sem prévio tratamento, revela a possibilidade de veiculação de patógenos para a glândula mamária.

2. Por ordem de eficiência, a clorhexidina, a salina com sabão e o iodoform, nas condições deste trabalho, foram capazes de reduzir o número total de bactérias sobre as mãos dos ordenhadores.

3. O número de amostras de leite das quais se isolou patógenos para a glândula mamária, pode ser considerado alto (28,6%), principalmente por terem sido os animais escolhidos ao acaso e que, nenhuma dessas amostras foi considerada anormal pelos testes da coadura do leite, "California mastitis test" e contagem global de leucócitos.

4. O isolamento de microorganismos de amostras de leite, sem o respectivo aumento do número de leucócitos, indica provável infecção do canal da teta, ainda sem comprometimento da glândula mamária.

5. Da pele (88,6%) e meatos de tetas (45,7%), antes da ordenha e sem lavagem prévia, foram isolados microorganismos considerados patogênicos para a glândula mamária. Estas frequências altas demonstram a importân

cia que estes sítios representam como reservatórios.

6. As frequências sobre a pele e meatos de tetas, de microorganismos considerados patogênicos para a glândula mamária, antes e após ordenha manual com mãos lavadas ou desinfetadas, não mostraram diferenças significativas.

7. Associação significativa entre os sítios nos quais foi possível isolar patógenos, somente foi encontrada quando as amostras foram colhidas antes da ordenha, nos seguintes casos: meatos e pele de tetas, com relação ao Streptococcus agalactiae e meatos de tetas e amostras de leite, no caso do Staphylococcus aureus.

## 7. BIBLIOGRAFIA

01. ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL, Rio de Janeiro, v.37, 1976. 816p.
02. BIER, O. Bacteriologia e imunologia, em suas aplicações à medicina e à higiene. 16.ed. São Paulo, Melhoramentos, Ed. da Universidade de São Paulo, 1975. 1056p.
03. BRAMLEY, A.J.; KING, J.S.; HIGGS, T.M.; NEAVE, F.K. Colonization of the bovine teat duct following inoculation with Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Br. Vet. J., London, 135(2):149-62, 1979.
04. BRAMLEY, A.J. & NEAVE, F.K. Br. Vet. J., 131:160, 1975 apud BRAMLEY, A.J.; KING, J.S.; HIGGS, T.M.; NEAVE, F.K. Colonization of the bovine teat duct following inoculation with Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Br. Vet. J., London, 135(2):149-62, 1979.
05. BRYSON, R.W. & THOMSON, J.W. Laboratory and field control of clinical mastitis in dairy cows around Bulawayo. J. South Afr. Vet. Assoc., Pretoria, 47(3):201-3, 1976.
06. CHARLETT, S.M. An improved staining method for the direct microscopical containing of bacteria in milk. Dairy Ind., London, 19(8):652-3, 1954.

07. CHODKOWSKI, A. The distribution of Streptococcus agalactiae outside the bovine udder and its survival. J. Comp. Pathol., New York, 59(4): 275-83, 1949.
08. CHODKOWSKI, A. & LANCASTER, J.E. Methods for the recovery of Streptococcus agalactiae from outside the bovine udder. J. Comp. Pathol., New York, 59(4):265-74, 1949.
09. DOBBINS JR., C.N. Mastitis losses. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 170(10, II):1129-32, 1977. ;
10. DODD, F.H.; NEAVE, F.K.; KINGWILL, R.G.; THIEL, C.C.; WESTGARTH, D. The importance of hygiene in the control of udder disease. In: INT. DAI. CONG. A., 17<sup>o</sup>, 1966. p.1-8 apud NEWBOULD, F.H.S. Epizootiology of mastitis due to Staphylococcus aureus. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 153(2):1683-7, 1968.
11. EDWARDS, S.J. Studies on bovine mastitis. IX. A selective medium for the diagnosis of Streptococcus mastitis. J. Comp. Pathol. Ther., New York, 46(4):211- 7, 1933.
12. FERNANDES, J.C.T.; MOOJEN, V.; FERREIRO, L. Agentes etiológicos das mastites bovina na bacia leiteira de Porto Alegre, RS, Brasil. Arq. Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre, 1(1):41-6, 1973.
13. FIGUEIREDO, J.B. A comparison of the California mastitis test with the other commonly employed diagnostic tests. E. Lansing, Michigan State University, 1957. 47p. (Tese, M.S.).
14. FIGUEIREDO, J.B. Estudo sobre a mamite bovina no município de Betim, Minas Gerais. Belo Horizonte, Esc. Sup. Vet., Univ. Rur. Est. Minas Gerais, 1959. 70p. (Tese, Cátedra).
15. GERRING, E.L.; HALL, R.; SANDOE, A.J. The evaluation of a teat-dipping formulation chlorhexidine. Vet. Rec., London, 83(5):112- 5, 1968.

16. GIESECKE, W.H.; VAN DEN HEEVER, L.W.; DUTOIT, I.J. Bovine mastitis in the Republic of South Africa. Bull. Off. Int. Epizoot., Paris, 76 (1429):621-54, 1971.
17. HANSEN, S.R. Mastitis prophylaxis. A comparative study on udder wash with sodium hypochlorite, iodophor and hexachlorophene. Acta Vet. Scand., Copenhagen, 12(1):80-5, 1971.
18. HARROP, M.H.V.; PEREIRA, L.J.C.; BRITO, J.R.F.; MELLO, A.M.B. Incidência de mastite bovina na bacia leiteira da zona do Agreste Meridional de Pernambuco. Pesq. Agropec. Bras., Série Vet., Rio de Janeiro, 10(8):65-7, 1975.
19. HAVELKA, B. Etiológia mastitíd hovadzieho dobytku na Slovensku za r. 1967-1971. Vet. Med., Prague, 18(3):135-8, 1973.
20. HAVELKA, B.; HALASA, M.; BORY, J.; MALOUSEK, M. Aetiology of bovine mastitis in cattle in Slovakia in 1976. Veterinarstvi, Bratislava, 27 (9):389-90, 1977 apud Vet. Bull., Farnham Royal, 48(3):1439, 1978.
21. HIPÓLITO, O.; FREITAS, M.G.; FIGUEIREDO, J.B. Doenças infecto-contagiosas dos animais domésticos. 4.ed., Belo Horizonte, Ed. Melhoramentos, 1965. 596p.
22. HOARE, R.J.T. & BARTON, M.D. Investigations in mastitis problem herds. I. Bacteriological examination. Aust. Vet. J., Brunswick, 48(12):657-60, 1972.
23. HODGES, H.G. Bovine mastitis. A challenge to veterinarians. North Am. Vet., Santa Barbara, 38(3):65-76, 1957.
24. HOLFORD, F.D. Mastitis and its effect upon the milk industry. Cornell Vet., Ithaca, 20(2):190-7, 1930.
25. HOLT-HARRIS, J.E. & TEAGUE, C. A new culture medium for the isolation of Bacillus typhosus from stools. J. Infect. Dis., Chicago, 18(6):596-601, 1916.

26. HULL, T.G. Animal diseases of minor public health significance. In: HULL, T.G., ed. Diseases transmitted from animals to man. 5.ed. Springfield, Charles C. Thomas, 1963. p.839-50.
27. HULL, T.G. The role of different animals and birds in diseases transmitted to man. In: HULL, T.G., ed. Diseases transmitted from animals to man. 5.ed. Springfield, Charles C. Thomas, 1963. p.876-924.
28. JANZEN, J.J. Economic losses resulting from mastitis. A review. J. Dairy Sci., Champaign, 53(9):1151-61, 1970.
29. JONES, F.S. Studies on bovine mastitis. J. Exp. Med., New York, 28(6): 735-48, 1918.
30. LANCASTER, J.E. & STUART, P. Experiments on the transmission of Streptococcus agalactiae infection by milking with infected hands. J. Comp. Pathol., New York, 59(1):19-30, 1949.
31. LANCASTER, J.E. & STUART, P. Further experimental infections of the bovine udder with Streptococcus agalactiae. Vet. Rec., London, 63(8): 141-5, 1951.
32. LANGENEGGER, J.; COELHO, N.M.; LANGENEGGER, C.H.; CASTRO, R.P. Estudo da incidência da mastite bovina na bacia leiteira do Rio de Janeiro. Pesq. Agropec. Bras., Série Vet., Rio de Janeiro, 5(3):437-40, 1970.
33. LAUERMAN, J.H.; GREIG, W.A.; BUCK, H.A.; LUTU, W.Z. Bovine mastitis in Kenya. Bull Epizoot. Dis. Afr., Nairobi, 21(2):167-70, 1973.
34. LITTLE, R.B. & PLASTRIDGE, W.N. eds. Bovine mastitis. New York, McGraw-Hill Book Company, 1946. 546p.
35. MARTINEZ, F.S. Doenças do úbere nas vacas leiteiras do P.Z.C. Dir. Prod. Animal - DIPAN, Porto Alegre, 10(115-116):5-11, 1958.
36. MCDONALD, J.S. & PACKER, R.A. Incidence of intramammary infections during lactation in dairy cattle repeatedly exposed to Streptococcus agalactiae and Aerobacter aerogenes. Am.J.Vet.Res., Schaumburg, 29(8):1525-32, 1968.

37. MURPHY, J.M. Mastitis - The struggle for understanding. J. Dairy Sci., Champaign, 39(3):1768-73, 1956.
38. NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine mastitis. Washington, University of New Hampshire Press, 1969. 27p.
39. NEAVE, F.K.; DODD, F.H.; KINGWILL, R.G. Nat. Inst. Res. in Dairying (U.K.). Annual Report, 1962 apud NEWBOULD, F.H.S. Disinfection in the prevention of udder infections. A review. Can. Vet. J., Ottawa, 6(2):29-37, 1965.
40. NEAVE, F.K. & OLIVER, J. The relationship between the number of mastitis pathogens placed on the teats of dry cows, their survival, and the amount of intramammary infection caused. J. Dairy. Res., London, 29(1):79-93, 1962.
41. NEAVE, F.K.; OLIVER, J.; DODD, F.H. The effect of prolonged milking on the incidence of mastitis. In: INT. DAI. CONG. A., 16<sup>o</sup>, 1962. p.304-12 apud NEWBOULD, F.H.S. Epizootiology of mastitis due to Staphylococcus aureus. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 153(2):1683-7, 1968.
42. NEWBOULD, F.H.S. Disinfection in the prevention of udder infections. A review. Can. Vet. J., Ottawa, 6(2):29-37, 1965.
43. NEWBOULD, F.H.S. Epizootiology of mastitis due to Staphylococcus aureus. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 153(2):1683-7, 1968.
44. PRESCOTT, S.C. & BREED, R.S. The determination of the number of the body cells in milk by a direct method. J. Infect. Dis., Chicago, 7(5):632-40, 1910.
45. SCHALM, O.W.; CARROLL, E.J.; JAIN, N.C. Bovine mastitis. Philadelphia, Lea & Febiger, 1971, 360p.

46. SCHALM, O.W. & NOORLANDER, D.O. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. J. Am. Vet. Med. Assoc., Schaumburg, 130(5):199-204, 1957.
47. SCHULTZE, W.D. & SMITH, J.W. Effectiveness of chlorhexidine in a post-milking teat dip. J. Dairy. Sci., Champaign, 53(1):38-45, 1970.
48. SILVA, N. Mamite no rebanho bovino da Escola Média de Agricultura de Florestal - UFV - MG. I. Controle através da desinfecção pós-ordena e do uso do Trimethoprim-sulfametoxazole. II. Frequência e etiologia. Belo Horizonte, Escola de Veterinária - UFMG, 1977. 81p. (Tese, Mestrado).
49. SILVA, N. Uso da chlorhexidine no controle da mamite bovina. Científica, Jaboticabal, 6(especial):37-41, 1979. (Separata).
50. SPENCER, G.R. & LASMANIS, J. Reservoirs of infection of Micrococcus pyogenes in bovine mastitis. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 13(49):500-3, 1952.
51. SPENCER, G.R.; MCCARTER, J.; BEACH, B.A. Reservoirs of infection of Streptococcus agalactiae. Am. J. Vet. Res., Schaumburg, 7(22):32-6, 1946.
52. STEEL, R.G.D. & TORRIE, J.H. Principles and procedures of statistics. New York, McGraw-Hill Book Company, 1960. 481p.
53. TATTERSFIELD, J.G.; ELLIOTT, R.E.W.; BROOKBANKS, E.O. NewZeland national mastitis survey: 1965-6. Measures of mastitis prevalence. N. Z. Vet. J., Wellington, 24(3):40-4, 1976.
54. U.K. AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL. Bureau of Animal Health, Weybridge, Review Series (2). 1944 apud NEWBOULD, F.H.S. Disinfection in the prevention of udder infections. A review. Can. Vet. J., Ottawa, 6(2):29-37, 1965.
55. ZANI NETO, L. Estudo sobre Micrococcus pyogenes de mastite bovina. Rev. Fac. Med. Vet., São Paulo, 5(3):353-60, 1955.



56. ZARKOWER, A. & SCHEUCHENZUBER, W.J. Teat apex microflora: influence of washing and dipping procedures. Cornell Vet., Ithaca, 67(3):404-12, 1977.
57. ZARKOWER, A. & SCHEUCHENZUBER, W.J. Relationships between teat-end bacteria and intramammary infections. Cornell Vet., Ithaca, 68(1):40-50, 1978.
58. ZEBOVITZ, E.; EVANS, J.B.; NIVEN, JR., C.F. Tellurite-glycine agar. A selective plating medium for the quantitative detection of coagulase-positive staphylococci. J. Bacteriol., Washington, 70(6):686-90, 1955.
59. ZIV, G. & NACHMAN, I. An abattoir survey of udder pathogens from culled dairy cows. Refu. Vet., Tel-Aviv, 29(4):161-6, 1972.