

NIVALDO DA SILVA

Mamite no rebanho bovino da Escola Média de Agricultura de Florestal - UFV-MG; I - Controle através da desinfecção pós-ordenha e do uso do Trimethoprim-Sulfametoxazole. II - Frequência e etiologia

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária (Área de Medicina Veterinária Preventiva)


Belo Horizonte

Julho/1977

Tese aprovada em: 14/7/77.

Banca Examinadora:


Prof. JOSÉ BRITTO FIGUEIREDO


Prof. ÉLVIO CARLOS MOREIRA


Prof. FRANCISCO CECÍLIO VIANA

À Empresa Brasileira de Pesquisa
Agropecuária (EMBRAPA) que pos-
sibilitou a realização deste tra-
balho.

Ao meu pai, *in memoriam*;
ã minha mãe,
ã minha esposa,
ãs minhas filhas,
pelo estímulo recebido.

- Ao Professor JOSÉ BRITTO FIGUEIREDO, orientador - Professor Titular da disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias dos Animais Domésticos (Doenças I), do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG.

- Aos professores e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG.

- Ao Conselho de Pesquisas e aos servidores da Escola Média de Agricultura de Florestal da Universidade Federal de Viçosa - Minas Gerais.

O presente trabalho teve o apoio financeiro das seguintes Instituições:

- Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) - Belo Horizonte, Minas Gerais;

- Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária Preventiva (FEP-MVP) - Belo Horizonte, Minas Gerais;

- Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, Minas Gerais.

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	1
2. LITERATURA CONSULTADA	5
2.1. Controle das mamites	6
2.1.1. Desinfecção pós-ordenha	6
2.1.2. Funcionamento da ordenhadeira	7
2.2. Frequência de microorganismos	9
2.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	10
2.2.2. <i>Staphylococcus coagulase-negativa</i>	10
2.2.3. <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	12
2.2.4. <i>Streptococcus uberis</i>	12
2.3. Tratamento	13
2.3.1. Trimethoprim-Sulfametoxazole (TMP-SMZ)	13
2.3.2. Veículo aquoso/oleoso	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Rebanho utilizado	17
3.2. Manejo	17

	<u>Página</u>
3.3. Desinfecção pós-ordenha	18
3.4. Manejo da ordenhadeira	19
3.5. Diagnóstico de mamite	20
3.5.1. Clínico	20
3.5.2. Exames auxiliares	20
3.5.2.1. Prova da caneca de fundo escuro("strip cup").	20
3.5.2.2. California Mastitis Test (C.M.T.)	20
3.5.2.3. Contagem celular e bacterioscopia	21
3.5.3. Exames culturais	21
3.6. Uso do Trimethoprim-Sulfametoxazole (TMP-SMZ) para o tratamento de mamite .	22
3.6.1. Determinação da concentração inibidora mínima (CIM)	22
3.6.2. Emulsão aquosa/oleosa	24
3.6.3. Tratamento dos animais	25
4. RESULTADOS	28
5. DISCUSSÃO	42
5.1. Efeito da desinfecção pós-ordenha sob diferentes condições	43

	<u>Página</u>
5.2. Frequência dos microorganismos isolados no rebanho da Escola Média de Agricultura de Florestal - UFV-MG . . .	51
5.3. Tratamento de mamite com Trimethoprim-Sulfametoxazole (TMP-SMZ)	54
5.3.1. Determinação da Concentração Inibidora Mínima (CIM)	54
5.3.2. Tratamento	55
5.4. Irritabilidade provocada pelo veículo aquoso/oleoso	56
6. CONCLUSÕES ,	59
7. RESUMO	62
8. SUMMARY	66
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1. INTRODUÇÃO

A grande dificuldade a ser enfrentada no controle da mamite bovina, é a capacidade de disseminação da doença. Para MACDONALD (1969), tal escopo será conseguido através de três importantes itens: higiene, controle do funcionamento da ordenhadeira e tratamento adequado.

De há muito, a higiene e a desinfecção têm sido advogadas para o controle e prevenção das infecções de úbere. Sabe-se que a presença de microorganismos patogênicos, mesmo em pequeno número, na área do meato galactóforo, representa perigo potencial (NEWBOULD, 1965), uma vez que podem penetrar para o interior da glândula durante o intervalo entre ordenhas (NEAVE et alii, 1969). A imersão das tetas em solução desinfetante facilita a destruição desses patógenos, sendo efetiva para prevenção de novas infecções intramamárias (WESEN & SCHULTZ, 1970; SCHULTZ & SMITH, 1972).

Diversos autores, como BECKLEY & SMITH (1962),

STANLEY et alii (1962), BRAUND & SCHULTZ (1963) e COUSINS et alii (1973), verificaram que irregularidades na ordenha, provocadas pela ordenhadeira, predispõe o úbere à infecções.

A eficiência do tratamento das mamites é variável. Segundo PHILPOT (1970), depende do microorganismo, do grau de reação da glândula e das drogas utilizadas. Há dezenas de esquemas medicamentosos usados ou testados no tratamento das mamites bovinas. Além do importante papel do veículo, há outros fatores influenciando sua eficiência. Assim para PHILPOT (1970) o tratamento das mamites por *Staphylococcus aureus* pode resultar mais em falhas terapêuticas, que propriamente resistência bacteriana, devido a presença de tecido fibroso que envolve dentro do úbere os focos desse microorganismo.

A principal arma utilizada para higienizar a glândula mamária, no momento, é a imersão das tetas em solução iodo⁽¹⁾ glicerinada (LANGOIS & PYLES, 1975; PANKEY & PHILPOT, 1975), enquanto que novas drogas, bactericidas e/ou bacteriostáticas favorecem, em muito, a eficácia do tratamento. Uma delas, a associação Trimethoprim-

(¹) BOVIDINE - West Agro Chemical, Long Island, NY - USA

Sulfametoxazole (TMP-SMZ), cuja ação baseia-se na inibição da dihidrofolato redutase bacteriana, enzima importante na ativação do ácido fólico, é altamente efetiva contra bactérias, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sendo de baixa toxidez para espécies mamíferas (BURCHALL, 1973).

O presente trabalho, realizado em condições naturais de campo, teve os seguintes objetivos:

- 1) comparar, sob diferentes condições, a desinfecção após a ordenha;
- 2) estudar a frequência de microorganismos causadores de infecções, clínicas e subclínicas, no rebanho bovino da Escola Média de Agricultura de Florestal-UFV-MG (EMAF);
- 3) empregar a associação TMP-SMZ, via canal galactóforo, no tratamento das mamites crônicas e, eventualmente, agudas;
- 4) observar o grau de irritabilidade causada às glândulas mamárias pelo veículo aquoso/oleoso.

2. LITERATURA CONSULTADA

2.1. Controle das mamites

2.1.1. Desinfecção pós-ordenha

A desinfecção das tetas após a ordenha reduz significativamente as novas infecções intramamárias causadas por estafilococos e estreptococos, exceção daquelas por *Streptococcus uberis* (OLIVER et alii, 1956; PLASTRIDGE, 1958; NEWBOULD, 1965), em até mais de 50%, segundo MARSHAL et alii (1969); WESEN & SCHULTZ (1970); MARX(1971); EBERHART & BUCKALEW (1972); SCHULTZ & SMITH (1972); LANGOIS & PYLES (1975); PANKEY & PHILPOT(1975); PEARSON et alii (1975).

Entretanto, para GROOTENHUIS et alii (1974), o mal funcionamento da ordenhadeira pode reduzir o efeito da desinfecção pós-ordenha. Ao utilizarem, nessa condição, a desinfecção em metade das glândulas, mantendo tetas controle no mesmo animal, não observaram diferenças significativas entre os grupos de glândulas mamárias desinfetadas e controle.

2.1.2. Funcionamento da ordenhadeira

Criada para substituir o trabalho do homem e melhorar a eficiência da ordenha, a ordenhadeira mecânica deve funcionar sob condições controladas, pois, caso contrário influirá negativamente produzindo danos à glândula mamária.

MOCHRIE et alii (1953) não encontraram diferenças significativas, com relação ao teor de células, ao ordenharem vacas com níveis de vácuo de 10-13-17 polegadas de Hg (25,4-33,02-43,18 centímetros de Hg) porém, ao prolongarem a ordenha além do tempo normal, o número de células aumentou, mesmo naqueles animais livres de infecções (MOCHRIE et alii, 1953a e 1955).

LAING & MALCOLM (1956), encontraram uma incidência de 14% de mamites onde não se pode fazer isolamentos de agentes causais. Segundo eles, as altas contagens celulares resultaram de alterações inflamatórias provocadas pela ordenhadeira.

Para WILSON (1958), BECKLEY & SMITH (1962), STANLEY et alii (1962) e BRAUND & SCHULTZ (1963), quando ocorre mal funcionamento da máquina de ordenhar, conseqüente às flutuações de vácuo e sobreordenha, produz-

se grande irritabilidade glandular, caracterizada por aumento no conteúdo celular e alta frequência de reações positivas ao "California Mastitis Test (C.M.T.)". Além disso, a ordenha torna-se mais lenta constituindo-se, assim, fator predisponente para mamites.

FELL (1964), assinalou que a instabilidade do vácuo pode afetar o úbere, tanto alterando o tempo de ordenha como permitindo um fluxo reverso de leite pelo canal do teto. Além disso, qualquer demora na retirada do copo da ordenhadeira, cessado o fluxo de leite agravará, ainda mais, os danos produzidos pelo mal funcionamento da ordenhadeira.

SCHMIDT et alii (1964) não verificaram qualquer aumento na contagem leucocitária no leite de animais ordenhados com vácuo instável.

As flutuações irregulares de vácuo induzem mamite, sendo alta a porcentagem de quartos infectados e reações celulares, sendo estas tanto maiores quanto maiores foram as flutuações observadas (NYHAN & COWHIG, 1967; KIRKBRIDGE & ERHART, 1969; COUSINS et alii, 1973).

Segundo SCHALM & LASMANIS (1968), quando o tecido mamário é traumatizado, a exsudação de células

ocorre na proporção da extensão da lesão, podendo continuar por longos períodos após cessar a causa predisponente.

MACDONALD (1969) assegurou que, ocorrendo sobreordena, microorganismos são introduzidos dentro da glândula mamária pelo fluxo reverso de leite ocasionado pelas alterações na pressão diferencial no canal do teto.

PEARSON et alii (1971), encontraram dois rebanhos com altas contagens celulares sem causa infecciosa. Afirmaram que mamite verdadeira não estava presente nesses casos, devendo-se procurar imediatamente a origem mecânica da injúria.

Para THIEL et alii (1973), as altas taxas de infecções intramamárias estão associadas com o impacto de gotículas de leite contaminado sobre a ponta do teto, resultante do fluxo reverso de leite quando as borraças do copo se dilatam ao final da ordenha.

MACDONALD (1975), estudando o efeito da ordenhadeira sobre as novas infecções do úbere assinalou que, uma alta pressão sobre o canal do teto pode resultar em injúrias, permitindo a colonização bacteriana

nessas áreas e, com isso, aumentar a exposição do canal do teto às infecções. Flutuações de vácuo nesse caso constituem-se causa comum para o aumento no número de mamites.

2.2. Frequência de microorganismos

Segundo MURPHY (1956) e ROBERTS (1967), mamite pode ser causada por mais de 20 tipos diferentes de bactérias patogênicas, riquetsias, fungos (especialmente leveduras) e vírus. Destes microorganismos, o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus* sp e bacilares, são responsáveis por 97% a 99% das infecções do úbere.

2.2.1. *Staphylococcus aureus*

As mamites por *Staphylococcus aureus* têm crescido de importância, principalmente devido a ineficiência dos tratamentos e à persistência do microorganismo fora da glândula mamária (DAVIDSON, 1961).

Sua incidência é variável, dependendo da região e dos métodos empregados para o diagnóstico, sendo responsável por 50% a 80% das mamites encontradas, se-

gundo SCHALM & LASMANIS (1957); FIGUEIREDO (1962); RENDEL & SUNDBERG (1962); LANGENEGGER et alii (1970); HARROP et alii (1975).

2.2.2. *Staphylococcus* coagulase-negativa

Durante muito tempo os estafilococos coagulase-negativa não foram considerados patogênicos para o úbere.

FIGUEIREDO (1962), em seu trabalho no Município de Betim-MG, ignorou as infecções por estes microorganismos.

Entretanto, FORBES & HEBERT (1968) sugerem que em muitos casos eles podem ser importantes, pois encontraram oito amostras consideradas patogênicas que se relacionavam com contagens médias de 1.000.000 células/ml de leite.

KINGWILL et alii (1970), também ignoraram estes microorganismos em trabalhos de controle das mamas bovinas.

HOLMBERG (1973), mostrou ser *Staphylococcus epidermidis* (coagulase-negativa) patogênico para o úbere, encontrando contagens acima de 500.000 células/

ml de leite em casos de infecções experimentais.

Segundo PEARSON & GREER (1974), os estafilococos coagulase-negativa são muito comuns em rebanhos leiteiros, estando frequentemente relacionados com fortes reações ao C.M.T.

2.2.3. *Streptococcus dysgalactiae*

LITTLE & PLASTRIDGE (1946), afirmaram que este estreptococos pode infectar apenas alguns animais isoladamente ou, então, até 50% do plantel. Não havendo portador (doente ou sadio) as infecções por *Streptococcus dysgalactiae* desaparecem, espontaneamente, do rebanho.

FROST (1962) encontrou baixa incidência (0,48%) entre 44 rebanhos no Sudoeste da Austrália.

LANGENEGGER et alii (1970) e HARROP et alii (1975), em levantamentos realizados no Rio de Janeiro e Pernambuco, respectivamente, encontraram este microorganismo como responsável por 17,2% e 18,9% das mamites nas principais bacias leiteiras desses Estados.

2.2.4. *Streptococcus uberis*

As mamites devidas ao *Streptococcus uberis*

usualmente são subclínicas, porém, quando ocorrem injúrias de tetas ou o mal funcionamento da máquina de ordenhar, tornam-se clínicas (FERGUSSON, 1944; DODD et alii, 1957; PLASTRIDGE, 1958).

Segundo HUGHES (1960); WILSON (1963) e EDWARDS & SMITH (1966) este microorganismo foi responsável por 16% a 20% das mamites por eles diagnosticadas.

Para CULLEN (1969) a importância do *Streptococcus uberis* prende-se ao fato de poder permanecer muito tempo no úbere sem ser detectado. Uma vez instalado num rebanho é difícil a sua eliminação pois, muito embora tratamentos intramamários tenham eficiência, a presença do microorganismo na pele, boca e rúmen, pode favorecer a recolonização da glândula quando as condições forem favoráveis.

2.3. Tratamento

2.3.1. Trimethoprim-Sulfametoxazole (TMP-SMZ)

RASMUSSEN (1971) estudando *in vitro* a ação do TMP-SMZ sobre bactérias isoladas em casos de mamite, observou alta sensibilidade a essa associação, indicando seu uso para tratamento das mamites.

BRUMFITT et alii (1973), assinalaram que embora a proporção 1:5 de TMP-SMZ não seja a ideal, sua performance clínica encoraja sua utilização em preparações comerciais.

BUSHBY (1973), também encontrou *in vitro* alta sensibilidade das bactérias causadoras de mamite frente ao TMP-SMZ. Utilizou a proporção de 1:20.

2.3.2. Veículo aquoso/oleoso

Bons resultados no tratamento das mamites bovinas dependem, grandemente, do veículo empregado como agente diluidor.

SPENCER et alii (1947), aplicaram penicilina em diferentes veículos, via canal galactóforo. Observaram que a maior irritação ocorreu nas primeiras 24 horas após a aplicação, sendo que o óleo de amendoim foi menos irritante, quando comparado aos veículos aquoso e à emulsão água/óleo mineral.

Segundo FOLEY et alii (1949) e EDWARDS (1964), o veículo aquoso/oleoso apresentou os melhores resultados quando comparado com soluções aquosas. Tem grande poder de penetração e efeito prolongado, podendo ficar retido na glândula por prazo de 48-72 horas.

LEITE et alii (1976), ao injetarem, via canal galactóforo, penicilina em veículos aquoso (250ml) e oleoso (25ml), induziram aumento de leucócitos, indicativos de irritação, da ordem de $2,7 \times 10^7$ x $1,0 \times 10^7$ células/ml de leite, respectivamente. Observaram que até cinco dias, após a aplicação do veículo aquoso, alguns animais ainda apresentavam reações máximas ao C.M.T.

. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Rebanho utilizado

O rebanho bovino utilizado neste experimento pertence à Escola Média de Agricultura de Florestal (EMAF) da Universidade Federal de Viçosa - MG, sendo composto de 82 animais em diferentes estágios de lactação (Quadro I), ordenhadas mecanicamente. Os animais são o resultado do cruzamento das raças Schwitz, Jersey e Holandês, tendo uma produção média de leite de 10kg diários, em duas ordenhas.

3.2. Manejo

Os animais são mantidos em regime de campo, recebendo no momento da ordenha suplementação alimentar composta de resíduos de cevada, mandioca, farelo de trigo e sais minerais. Durante o período de seca recebem silagem de sorgo. Emprega-se nesse rebanho a inseminação artificial.

A ordenhadeira utilizada é do tipo "balde de

ordenha"⁽²⁾, sendo destinadas três a quatro unidades de ordenha por ordenhador. Antes da ordenha os animais tinham as partes inferiores do úbere e tetas lavadas com pano embebido em solução morna de iodophor⁽³⁾ 1:320. As vacas com sinais clínicos de mamite eram tratadas, via intramamária ou parenteral, segundo recomendações do Veterinário da EMAF, sendo o restabelecimento baseado no desaparecimento dos sinais clínicos da doença.

3.3. Desinfecção pós-ordenha

Neste trabalho, para a desinfecção pós-ordenha, foi utilizada solução de iodo glicerizada imediatamente após a retirada dos copos da ordenhadeira. Foi usada a desinfecção diagonal das tetas posterior direita (PD) e anterior esquerda (AE), mantendo-se as outras (posterior esquerda - PE e anterior direita - AD) como controle individual. A solução iodo-glicerizada foi preparada através da seguinte fórmula:

Iodo metálico	50g
Iodeto de potássio	50g
Glicerina	800ml
Água destilada qsp	5.000ml

(²) Balde de ordenha HP 100 B. Fornecido por Separadores Alfa Laval S.A. Av. Nações Unidas, 3115, Santo Amaro - SP.

(³) Biocid - fornecido por Pfizer Quim. Ltda. Via Presidente Dutra, Km 391. Guarulhos, SP.

3.4. Manejo da ordenhadeira

Durante a primeira etapa do trabalho, de agora em diante denominada Fase I, no período de janeiro-abril/76, foram mantidas as mesmas condições de manejo do rebanho sendo, entretanto, introduzida a desinfecção pós-ordenha. A ordenhadeira apresentava flutuações irregulares de vácuo em consequência de defeito no regulador da bomba de vácuo e da penetração de leite dentro do sistema de tubos da máquina de ordenhar. Foi constatado, ainda, a sobreordenha ("overmilking") devido ao excesso de permanência da máquina sobre os animais. Existiam nessa fase 82 animais em lactação.

Na segunda etapa, denominada por nós de Fase II, compreendendo os meses de maio-agosto/76, foi modificado o sistema de ordenha, procedendo-se ao conserto do regulador da bomba de vácuo⁽⁴⁾ e a limpeza do sistema de tubos, facilitando-se a passagem do ar e, assim, estabilizando-se o vácuo. A fim de evitar-se a sobreordenha diminuiu-se o tempo de permanência do copo da ordenhadeira na teta, sendo os animais repassados manualmente.

(4) Executado por técnico da "Separadores Alfa Laval S.A."

A desinfecção passou a ser feita imediatamente após o repasse manual, colhendo-se, nessa fase, dados relativos à frequência dos novos casos de mamite sob condições normais de ordenha. Foram utilizados 61 animais durante esse período.

3.5. Diagnóstico de mamite

3.5.1. Clínico

O exame clínico era realizado após a ordenha, através de palpação das glândulas mamárias e dos linfonodos inguinais superficiais (mamários), procurando-se evidências de sinais inflamatórios, bem como a presença de fibroses e fístulas no parênquima e lesões de tetas.

3.5.2. Exames auxiliares

3.5.2.1. Prova da caneca de fundo escuro ("strip cup"): realizada diariamente nos primeiros jatos de leite, a fim de observar alterações macroscópicas.

3.5.2.2. California Mastitis Test (C.M.T.): esse teste era realizado quinzenalmente após a prova da caneca, segundo técnica descrita por SCHALM & NOORLANDER (1957).

3.5.2.3. Contagem celular e bacterioscopia: foi utilizada a Contagem Microscópica Direta (CMD) de PREESCOT & BREED (1910), modificada com relação à área do esfregaço. Com uma alça de platina calibrada 0,001ml de leite era semeado em área de $0,5\text{cm}^2$. As lâminas eram coradas pelo método de NEWMAN, modificado por CHARLETT (1954), pois numa só preparação eram feitas a contagem celular e a bacterioscopia. As amostras antes da preparação dos esfregaços eram incubadas, durante uma noite, a 37°C . Este método foi utilizado por FIGUEIREDO (1957 e 1962).

A bacterioscopia para os estreptococos, foi feita segundo o critério proposto por BRYAN (1941), que admite como patogênicos aqueles com mais de seis cocos em cadeia.

3.5.3. Exames culturais

As amostras de leite C.M.T. positivas, sem incubação prévia, eram semeadas sobre os meios de "Agar Sangue Esculina"⁽⁵⁾ e "Staphylococcus Medium 110"⁽⁶⁾ e in-

(⁵) Edwards Medium(Modified) - fornecido por Oxoid Ltd., Southwark Bridge Road, London, Great Britain.

(⁶) Fornecido por Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA,

incubadas a 37°C durante 24 horas. Após esse período, observada a morfologia, coloração e tipo de hemólise, as colônias eram transferidas para tubos contendo "Brain Heart Infusion"⁽⁷⁾ e incubadas a 37°C/24 horas. As placas que não apresentavam crescimento após as primeiras 24 horas eram reincubadas por igual período de tempo antes de serem descartadas. Após o crescimento no Brain Heart Infusion, verificada a pureza da cultura pelo método de Gram, procediam-se as provas de identificação dos microorganismos de acordo com os métodos empregados por FIGUEIREDO (1962).

3.6. Uso do Trimethoprim-Sulfametoxazole (TMP-SMZ) para o tratamento de mamite

3.6.1. Determinação da concentração inibidora mínima (CIM)

A determinação do CIM foi feita, segundo BUSHBY & HITCHINGS (1968), para o grupo dos principais germes causadores de mamite no rebanho da EMAF.

Preparou-se dez diluições da mistura TMP-SMZ,

(7) Fornecido por Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA.

em placas com 20ml de "Trypticase Soy Agar"⁽⁸⁾ a 10% de sangue equino. As concentrações finais de TMP-SMZ variavam, respectivamente, de 0,25 - 1,25 a 128 - 640µg/ml de meio de cultura, mantendo-se inalterada a proporção de 1:5 entre os medicamentos. Estas placas foram feitas em duplicata numa tentativa de minimizar possíveis erros de técnica. Usou-se, como inóculo, 20 amostras de microorganismos isoladas em casos de mamite no rebanho da EMAF e assim classificadas:

<i>Staphylococcus aureus</i>	12
<i>Staphylococcus coagulase-negativa</i>	03
<i>Streptococcus uberis</i>	04
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	01

Diluições a 10^{-3} de culturas crescidas em "Trypticase Soy Broth"⁽⁹⁾, durante 18 horas/37°C, eram semeadas com alça de platina com um milímetro de diâmetro numa área de 1 cm². Após 24 horas era feita a leitura e o CIM estabelecido como a mais alta diluição que

(⁸) Fornecido por Baltimore Biological Laboratories
Cockeysville, Maryland, USA.

(⁹) Fornecido por Baltimore Biological Laboratories,
USA.

melhor inibia o crescimento. As soluções de TMP-SMZ foram preparadas segundo BUSHBY (1973).

3.6.2. Emulsão aquosa/oleosa

A emulsão foi preparada após testes de estabilidade e capacidade de dissociação pela gota pendente, ficando estabelecida a seguinte fórmula:

1. Emulsão aquosa/oleosa

Óleo de amendoim ⁽¹⁰⁾ a 10% de Arlancel 83 ⁽¹¹⁾	330ml
Propilenoglicol ⁽¹¹⁾	200ml
Água destilada qsp	800ml

2. TMP

Trimethoprim ⁽¹²⁾	0,6 g
Ácido lactico 0,1N	0,6ml
Água destilada qsp	100,0ml

(¹⁰) Óleo comercial "Flor de Lírio".

(¹¹) Fornecido por Atlas Ind. Químicas S.A. Rua Cons. Crispiniano, 72 - São Paulo, SP.

(¹²) Fornecido por I.C.N. Usafarma Ltda. Rua Humberto I, São Paulo, SP.

3. SMZ

Sulfametoxazole ⁽¹³⁾	3,0 g
Hidróxido de sódio 1N	15,0ml
Água destilada qsp	100,0ml

O produto empregado no tratamento das mamites era constituído pela reunião das três fórmulas, sendo utilizado 10ml/glândula tratada.

3.6.3. Tratamento dos animais

Os animais foram tratados, a intervalos de 24 horas, utilizando-se a dose estabelecida pelo CIM em veículo aquoso/oleoso, via canal galactóforo. Foram divididos em três grupos, conforme o seguinte esquema:

<u>Grupos</u>	<u>Nº de doses utilizadas</u>	<u>Nº de glândulas</u>
I	uma	17
II	duas	17
III	três	08

⁽¹³⁾ Fornecido por I.C.N. Usafarma Ltda. Rua Humberto I, São Paulo, SP.

As amostras foram colhidas antes do tratamento e após 24 - 48 - 72 horas e sete dias, a fim de verificar a ação bactericida ou mesmo bacteriostática, bem como o grau de irritação provocada pelo veículo aquoso/oleoso. Foram empregadas nas amostras de leite as mesmas técnicas descritas anteriormente, ou sejam: C.M.T., contagem celular e bacterioscopia, isolamento e identificação de microorganismos.

3.7. Análise estatística

Feita através do Teste do Qui-quadrado (SNEDECOR, 1970) para verificar a significância, a nível de 5% de erro das diferenças encontradas entre os diversos tratamentos.

QUADRO I

Composição do rebanho da EMAF - UFV-MG, distribuído segundo meses de lactação e produção média de leite, 1976

Fases	Nº de animais	Meses de lactação ⁽¹⁾			Produção média diária de leite(kg)		
		-1	1 - 9	+9	-9	10 - 15	+15
I	82	10	71	1	42	39	1
II	61	4	57	0	23	38	0

(¹) Período de lactação - 300 dias

4. RESULTADOS

No Quadro II encontram-se os resultados da desinfecção pós-ordenha, analisados frente às reações acumuladas, ao C.M.T. Nota-se na Fase I (janeiro-abril/76), ligeira diferença entre o número de reações C.M.T. positivas e negativas para os dois grupos de glândulas. Na segunda fase (maio-agosto/76), as reações C.M.T. positivas foram em menor número para o grupo de glândulas desinfetadas (44,68%) do que no grupo controle (55,32%). O teste do Qui-quadrado, aplicado à Fase II, foi igual a 12,06.

Para as Fases I e II, em ambos os grupos de glândulas, as mamites clínicas, purulentas, foram incluídas na categoria de +++ ao C.M.T., enquanto as reações negativas e traços foram interpretadas como resultados negativos.

O Quadro III, refere-se as contagens celulares, distribuídas segundo as reações acumuladas ao C.M.T. Os números médios de células/ml, encontrados para os meses compreendidos entre maio-agosto/76 (Fase II), foram me-

nores para ambos os grupos de glândulas que no período janeiro-abril/76 (Fase I). Em ambas as fases, a média de células/ml nas reações C.M.T. positivas, foram maiores para as glândulas controle.

O efeito da desinfecção pós-ordenha sobre a população bacteriana é apresentado no Quadro IV. Os achados bacterioscópicos diferem entre os grupos e dentro de cada grupo de glândulas, quando comparadas as Fases I e II.

O Quadro V mostra, comparativamente, os casos novos e acumulados de mamite. Medindo-se os efeitos da desinfecção pós-ordenha sobre o aparecimento de novas infecções, o teste do Qui-quadrado foi igual a 3,12 e 12,72, respectivamente, para as Fases I e II. Os casos acumulados referem-se além das novas infecções às mami-tes anteriormente existentes e consideradas clinicamente "curadas" após tratamento.

A distribuição dos microorganismos para as glândulas desinfetadas e controle é mostrada pelo Quadro VI. Em ambos os grupos os estafilococos coagulase-positiva são os principais responsáveis. A redução do número de infecções devidas a cada germe está ali re-

presentada observando-se que, durante os meses de maio-agosto/76 (Fase II), atingiu a 67,60% dos *Staphylococcus aureus* isolados. As infecções causadas por *Streptococcus uberis* foram reduzidas em 44,44% na Fase II.

No Quadro VII são apresentados os germes isolados nos casos de mamite envolvendo as glândulas desinfetadas e as controle. A maior frequência foi devida ao *Staphylococcus aureus* (83,54%) enquanto, em segundo lugar, o *Streptococcus uberis* contribuiu com 13,98% da totalidade dos casos de mamites estudados.

O Quadro VIII indica a concentração inibidora mínima da associação TMP-SMZ usada no tratamento das mamites do rebanho da EMAF. Os resultados do tratamento intramamário na concentração ideal de 2µg de TMP - 10µg de SMZ/ml são mostrados no Quadro IX. O *Streptococcus uberis* foi o mais sensível (76,00%), enquanto o restabelecimento comprovado nos casos de *Staphylococcus aureus* foi em menor número (34,28%).

A irritabilidade induzida pelo veículo usado para o tratamento, traduzida pela contagem celular média, encontra-se no Quadro X e Gráfico I.

QUADRO II

Resultados das reações acumuladas ao C.M.T. das glândulas desinfetadas pós-ordenha e das controle, no rebanho da EMAF-UFV-MG, 1976

Reações ao C.M.T.	Fase I			Fase II		
	Nº de glândulas		Soma	Nº de glândulas		Soma
	Desinfetadas	Controle		Desinfetadas	Controle	
Negativas ⁽¹⁾	552	546	1098	554	489	1043
Traços ⁽¹⁾	54	38	92	40	30	70
+	209	207	416	139	143	282
++	238	239	447	110	148	258
+++	135	154	289	28	52	80
Total	1188	1184	2372	871	862	1733
Número de negativas	606	584	1190	594	519	1113
%	50,92	49,08	100	53,37	46,63	100
Número de positivas	582	600	1182	277	343	620
%	49,24	50,76	100	44,68	55,32	100

(¹) Interpretação negativa

QUADRO III

Resultados das contagens celulares acumuladas, agrupadas segundo as reações ao C.M.T., das glândulas desinfetadas pós-ordenha e das controle, no rebanho da EMAF-UFV-MG, 1976

Contagens celulares (10 /ml)	Fase I				Fase II				
	Reações ao California Mastitis Test								
	Gl. desinfetadas	Gl. controle	Gl. desinfetadas	Gl. Controle	Gl. desinfetadas	Gl. Controle	Gl. desinfetadas	Gl. Controle	
Neg. ⁽¹⁾	Pos.	Neg. ⁽¹⁾	Pos.	Neg. ⁽¹⁾	Pos.	Neg. ⁽¹⁾	Pos.	Neg. ⁽¹⁾	Pos.
0-200	441	-	386	-	504	-	441	-	-
201-500	103	27	123	8	41	4	38	-	-
501-1500	46	167	66	160	46	99	35	91	91
1501-5000	-	177	-	179	-	105	-	119	119
+5000	-	190	-	232	-	66	-	128	128
Total	590	561	575	579	591	274	514	338	338
Contagem média de células/ml	213,94	3033,66	256,95	3289,68	187,47	2816,22	179,84	3307,26	3307,26

(¹) Incluindo reações categorizadas como "traços"

QUADRO IV

Resultados dos achados bacteriosc6picos acumulados, agrupados segundo as reações ao C.M.T., das glândulas desinfetantes pós-ordenha e das controle, no rebanho da EMAF-UFV-MG, 1976

Resultados do C.M.T.	Glândulas	Fase I				Fase II				
		Negativa		Positiva		Negativa		Positiva		
		Número	%	Número	%	Número	%	Número	%	
Negativo (1)	Desinfetadas	566 ⁽²⁾	95,94	24	4,06	589 ⁽⁴⁾	99,67	2	0,33	591
	Controle	538	93,56	37	6,44	498	96,88	16	3,12	514
Positivo	Desinfetadas	333 ⁽³⁾	59,35	228	40,65	204 ⁽⁵⁾	74,46	70	25,54	274
	Controle	271	46,80	308	53,20	155	45,85	183	54,15	338
Total		1708	74,10	597	25,90	1446	84,22	271	15,78	1717

(1) Incluindo reações categorizadas como "traços"

(2) $\chi^2 = 3,39$
 (3) $\chi^2 = 18,25$
 (4) $\chi^2 = 13,0$
 (5) $\chi^2 = 51,09$

QUADRO V

Casos novos e acumulados de mamite nos grupos das glândulas desinfetadas pós-ordena e das controle, distribuídos segundo as Fases I e II, no rebanho da EMAF-UFV-MG, 1976

Fases	Desinfecção		Controle	
	Novos	Acumulados	Novos	Acumulados
I	72 ⁽¹⁾	119	88 ⁽²⁾	146
II	18	35	42	91
Total	90	154	130	237

(¹) Um diagnóstico clínico, clássico, sem tentativa de isolamento

(²) Cinco diagnósticos clínicos, clássicos, sem tentativas de isolamento

QUADRO VI

Efeitos da desinfecção pós-ordenha sobre os microorganismos isolados de casomites, no rebanho da EMAF-UFV-MG, 1976

Número de amostras isoladas	Fase I		Fase II		Redução ⁽¹⁾ (%)
	Desinfecção	Controle	Desinfecção	Controle	
<i>Staphylococcus aureus</i>	123	161	46	142	67,60
<i>Staphylococcus coagulase-negativa</i>	0	2	1	1	0,00
<i>Streptococcus uberis</i>	32	33	5	9	44,44
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2	2	0	0	-
Infecções ⁽²⁾ mistas	1	5	0	0	-
Total	158	203	52	152	65,78

⁽¹⁾ Redução = $\frac{\text{Número de microorganismos nas glândulas controle} - \text{Número de microorganismos nas glândulas desinfetadas}}{\text{Número de microorganismos nas glândulas controle}} \times 100$

⁽²⁾ *Staphylococcus aureus* + *Streptococcus uberis* - 4
Staphylococcus aureus + *Staphylococcus coagulase-negativa* - 1
Staphylococcus aureus + *Streptococcus dysgalactiae* - 1

QUADRO VII

Distribuição dos casos de mamite nas Fases I e II nos grupos das glândulas desinfetadas pós-ordem e das controle, segundo os microorganismos isolados no rebanho da EMAF-UFV-MG, 1976

Número de amostras isoladas	Número de isolamentos	Porcentagem
<i>Staphylococcus aureus</i>	472	83,54
<i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa	4	0,71
<i>Streptococcus uberis</i>	79	13,98
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	4	0,71
Infecções mistas	6	1,06
Total	565	100,00

QUADRO VIII

Diluições utilizadas para determinar a concentração inibidora mínima (CIM) da associação TMP-SMZ (1:5), para 20 amostras de microorganismos isoladas em casos de mamites, no rebanho da EMAF-UFV-MG, 1976

Microorganismos	Nº de amostras	Concentração de TMP-SMZ (1:5) e número de amostras inibidas			
		2-10µg/ml	1-5µg/ml	0,5-2,5µg/ml	0,25-1,25µg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	12	11	11	09
<i>Staphylococcus coagulase-negativa</i>	03	03	03	03	00
<i>Streptococcus uberis</i>	04	04	03	01	00
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	01	01	01	01	00
Total	20	20	18	16	09

QUADRO IX

Resultados do tratamento intramamário com TMP-SMZ (1:5) distribuídas segundo o número de doses utilizadas no rebanho bovino da EMAF-UFV-MG, 1976

Doses por	Uma		Duas		Três		Total	
	Tratadas	Curadas Nº %	Tratadas	Curadas Nº %	Tratadas	Curadas Nº %	Tratadas	Curadas Nº %
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	6 37,50	11	4 36,36	8	2 25,00	35	12 34,28
<i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>	1	0 0,00	2	1 50,00	0	0 0,00	3	1 33,33
<i>Streptococcus uberis</i>	10	7 70,00	12	9 75,00	3	3 100,00	25	19 76,00
Total	27	13 48,15	25	14 56,00	11	5 45,45	63 ⁽¹⁾	32 50,74

(1) $X^2 = 0,77$

QUADRO X

Contagem celular média antes e após a aplicação do TMP-SMZ (1:5) em veículo aquoso/oleoso, via intramamária, no rebanho da EMAF-UFV-MG, 1976

Nº de doses	Contagem média de células x (10^6 /ml) em relação ao tratamento			
	Antes	24 horas	48 horas	72 horas
Uma	3,4	3,3	7,9	7,3
Duas	6,7	7,6	18,6	15,9
Três	6,3	7,5	14,8	19,2

4,6

5,1

3,3

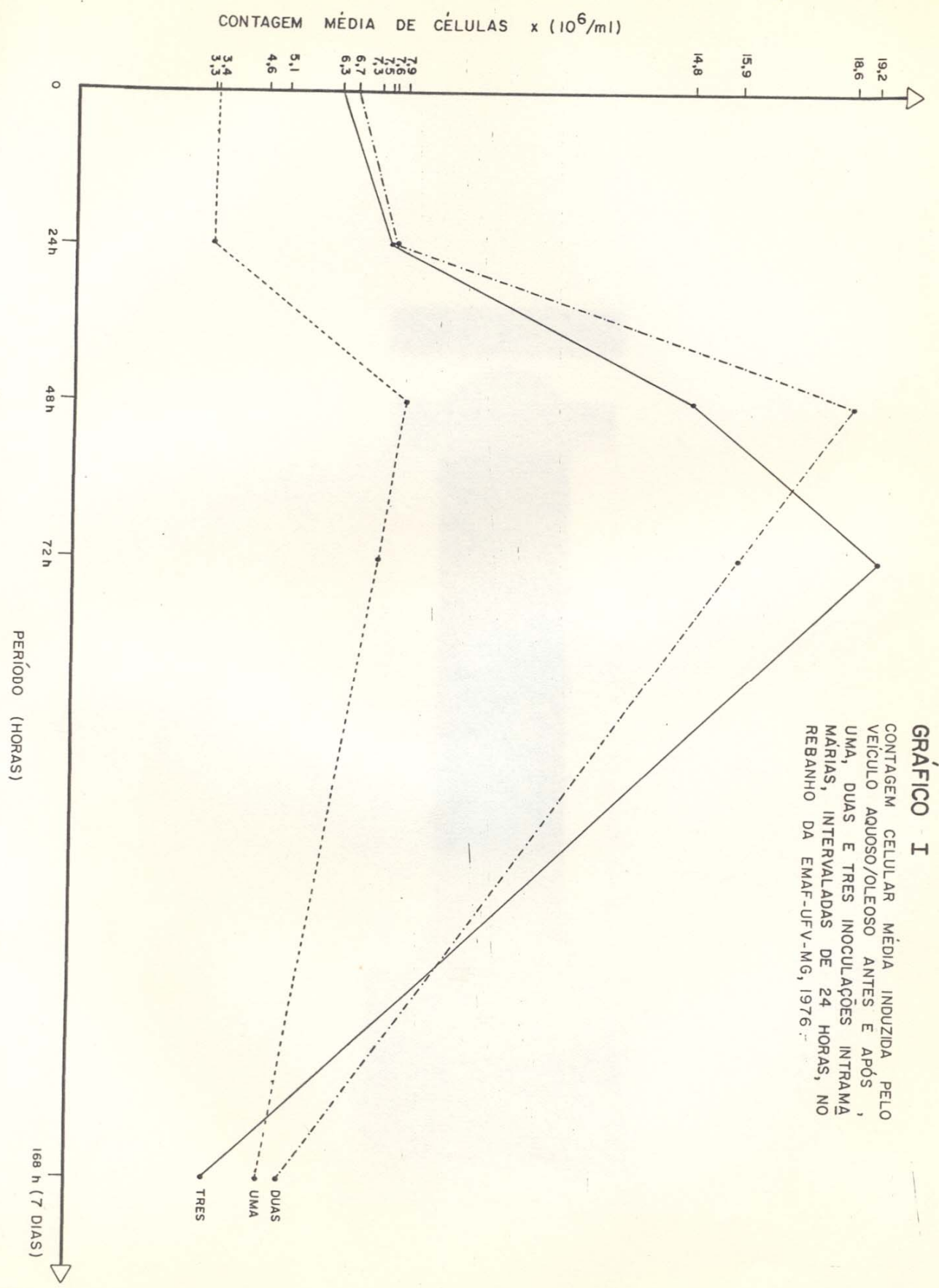


GRÁFICO - I
CONTAGEM CELULAR MÉDIA INDUZIDA PELO VEÍCULO AQUOSO/OLEOSO ANTES E APÓS UMA, DUAS E TRES INOCULAÇÕES INTRAMÁRIAS, INTERVALADAS DE 24 HORAS, NO REBANHO DA EMAF-UFV-MG, 1976.

5. DISCUSSÃO

5.1. Efeito da desinfecção pós-ordenha sob diferentes condições

A divisão do trabalho em duas fases distintas (I e II), foi motivada pelo encontro inicial de uma situação anormal (Fase I), verificada com relação a ordenha mecânica. A Fase II serviu para comparar os resultados da desinfecção quando a ordenha é feita em condições normais.

A fim de que nenhum outro fator influísse nos resultados, acerca da eficácia da desinfecção pós-ordenha, os animais trabalhados concentraram-se numa mesma faixa de lactação e de produção (Quadro I) e o controle estabelecido no mesmo animal, procurando-se, desse modo, evitar outras possíveis variáveis que alterassem os resultados obtidos.

Na primeira Fase (janeiro-abril/76) pelo exame dos Quadros II e III, observa-se elevado número de reações C.M.T. positivas com altas contagens de células

nos grupos das glândulas desinfetadas e controle. Estes resultados são concordantes com os trabalhos de BECKLEY & SMITH (1962); STANLEY et alii (1962); BRAUND & SCHULTZ (1963); NYHAN & COWHIG (1967); KIRKBRIDGE & ERHART (1969); COUSINS et alii (1973), que verificaram alta correlação entre as flutuações de vácuo e a sobreordenação com o aumento de células no leite. MOCHRIE et alii (1953; 1953a e 1955), não encontraram resultados semelhantes, afirmando que diferentes níveis de vácuo não provocaram alterações no úbere, porém, os níveis por eles estabelecidos eram fixos não havendo instabilidade durante a ordenha. Tal não foi o nosso caso, onde as flutuações eram constantes e possibilitaram o aumento no conteúdo celular do leite, tanto para as glândulas desinfetadas como controle. SCHMIDT et alii (1964) também não evidenciaram qualquer alteração, mas as flutuações de vácuo encontradas por eles foram pequenas para produzirem efeitos sobre o úbere.

Nota-se, ainda, que são mínimas as diferenças entre as glândulas desinfetadas e as controle, quanto ao número de reações C.M.T. positivas e ao número médio de células/ml de leite. Isto não evidencia qualquer efeito da desinfecção sobre as reações celulares, fato

esse já expressado por PEARSON et alii (1975), quando afirmaram que a imersão de tetas em solução desinfetante reduz apenas os novos casos de mamite não interferindo, pois, com alterações físico-químicas já estabelecidas. Ainda no Quadro III, são encontradas para a Fase I, as contagens celulares médias de $3.033,66 \times 10^3$ e $3.289,68 \times 10^3$, respectivamente, para as glândulas desinfetadas e controle, C.M.T. positivas. Valores aproximados foram achados por PEARSON et alii (1971) para dois rebanhos, onde não havia evidência de mamite típica, mas de injúria mecânica produzida pela ordenhadeira. LAING & MALCOLM (1956), denominaram essa alteração de mamite não-infecciosa, encontrando sua incidência em torno de 14%. Pode-se deduzir, então, que provavelmente, neste nosso trabalho as altas contagens celulares verificadas foram conseqüentes, não só aos casos de mamite como, também, ao mal funcionamento da ordenhadeira.

O efeito da desinfecção pós-ordenha sobre os achados bacterioscópicos acumulados, mostrados pelo Quadro IV, foram analisados estatisticamente.

As diferenças encontradas entre o número de achados bacterioscópicos, nas reações C.M.T. negativas,

para as glândulas desinfetadas e controle, não foram significativas a nível de 5% (Qui-quadrado igual a 3,39).

A bacterioscopia e as reações C.M.T., ambas negativas, demonstram não estarem essas glândulas frente a processo infeccioso. Os poucos achados bacterioscópicos, da ordem de 4,06% e 6,43%, respectivamente, para as glândulas desinfetadas e controle, podem possivelmente serem atribuídos à contaminação durante a colheita do material por bactérias presentes no canal do teto ou circunvizinhanças sem, contudo, estarem produzindo infecção mamária típica.

As reações C.M.T. positivas com bacterioscopia negativa (59,35% e 46,80%), observadas em ambos os grupos de glândulas, sugerem mais injúria mecânica que propriamente mamite. Segundo FIGUEIREDO (1962), a bacterioscopia negativa concorda em 83,33% com o exame bacteriológico podendo-se, deste modo, considerar que nas glândulas com reações C.M.T. positivas e bacterioscopia negativa não existe mamite típica.

O mesmo não ocorre nas glândulas com reações C.M.T. e bacterioscopia, ambas positivas, as quais podem ser consideradas como portadoras de mamite. A con-

cordância entre a bacterioscopia positiva e o exame bacteriológico está entre 95,40% e 85,18%, como verificou FIGUEIREDO (1957 e 1962).

Entre as glândulas desinfetadas e controle existem diferenças significativas a nível de 5% (Qui-quadrado igual a 18,25). A desinfecção pós-ordenha mostrou-se eficiente, pois, atuando contra infecções do meato e canal do teto, resultantes da colonização bacteriana nas áreas traumatizadas pela ordenhadeira, diminuiu o número de achados bacterioscôpicos nesse grupo de glândulas.

Entretanto, essa desinfecção analisada no Quadro V para o mesmo período (janeiro-abril/76), revelou pelo teste do Qui-quadrado (3,12) diferenças não significativas, não sendo, pois, efetiva para prevenção de novas infecções. Isso poderia ser explicado devido a infecção induzida pelo mal funcionamento da ordenhadeira, uma vez que o fluxo reverso do leite que ocorre durante as flutuações de vácuo (WILSON, 1958 e FELL, 1964) e a sobreordenha (MACDONALD, 1969 e 1975; THIEL et alii, 1973) é capaz de introduzir microorganismos dentro da glândula.

Como no rebanho trabalhado ocorriam estes dois fatores, tanto as flutuações de vácuo como a sobreordenação, a desinfecção após a ordenha não foi capaz de prevenir as infecções induzidas por esse mecanismo, podendo apenas agir sobre os microorganismos localizados no meato galactóforo. Nossos resultados concordam com GROOTENHUIS et alii (1974) ao afirmarem que, quando ocorrem irregularidades na ordenhadeira, os resultados da desinfecção das tetas, aplicadas experimentalmente à metade do úbere, não são satisfatórios uma vez que, tanto as desinfetadas como as controle, sofrem os mesmos efeitos danosos da ordenhadeira.

Para a segunda Fase (maio-agosto/76), sob condições normais de ordenha, o exame dos Quadros II e III, indica que não ocorreram diminuições acentuadas no número de reações C.M.T. positivas e do conteúdo celular.

Para SCHALM & LASMANIS (1968), a exsudação de células pode continuar por longos períodos após cessar a causa predisponente.

Como neste trabalho as Fases I e II foram muito próximas entre si, as reações celulares observadas podem ser creditadas, tanto ao efeito residual do traumatismo causado pela ordenhadeira (Fase I) como aos ca-

sos de mamite que ocorreram em ambos os grupos durante a Fase II. A proximidade das fases deveu-se à necessidade de se trabalhar com vacas no mesmo estágio de lactação.

A análise do Quadro IV (Fase II), mostra serem evidentes os efeitos da desinfecção pós-ordenha sobre os achados bacterioscópicos. As diferenças encontradas foram significativas, a nível de 5% (Qui-quadrado igual a 13,00 e 51,09) entre as glândulas desinfetadas e controle, para as reações C.M.T. negativas e positivas. O grupo que recebeu a desinfecção pós-ordenha, apresentou, em ambos os casos, menor número de achados bacterioscópicos.

Sob condições normais de ordenha a desinfecção, ao eliminar bactérias localizadas no canal do teto, diminui a contaminação das amostras de leite e previne as infecções intramamárias. Isto pode ser observado no Quadro V, onde está comprovado o valor da desinfecção pós-ordenha para a prevenção de novas infecções (Qui-quadrado igual a 12,72). Os resultados obtidos são concordantes com diversos autores, MARSHAL et alii (1969); WESEN & SCHULTZ (1970); MARX (1971); EBERHART & BUCKALEW

(1972); LANGOIS & PYLES (1975); PANKEY & PHILPOT(1975); PEARSON et alii (1975), que verificaram a eficiência da desinfecção sob condições normais de ordenha.

Pelo Quadro VI, observa-se que durante os meses de janeiro-abril/76 (Fase I), a desinfecção pós-ordenha teve pequeno efeito sobre o número de isolamentos efetuados com relação ao *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis*, fato outra vez explicável, face às condições anormais da ordenha. A redução para os outros microorganismos não pode ser considerada elevada devido ao número não significativo de isolamentos.

Os resultados obtidos durante o período maio-agosto/76(Fase II), concordam com OLIVER et alii(1956); PLASTRIDGE (1958); NEWBOULD (1965); EBERHART & BUCKALEW (1972); SCHULTZ & SMITH (1972), exceção para a anormal redução do *Streptococcus uberis*. Isto pode ser explicado pelo fato de que em dois animais aconteceram três reisolamentos nas glândulas controle.

5.2. Freqüência dos microorganismos isolados nos casos de mamite no rebanho bovino da Escola Média de Agricultura de Florestal - UFV-MG

O grande número de isolamentos bacteriológi-

cos encontrados no Quadro VII, são devidos a dois fatores:

- muitos animais clinicamente recuperados permaneciam eliminando germes patogênicos durante longos períodos;

- como os exames eram realizados quinzenalmente, os resultados expressados neste Quadro, são acumulados.

A frequência encontrada de *Staphylococcus aureus* (83,54%) se equipara às observadas por SCHALM & LASMANIS (1957); FIGUEIREDO (1962); RENDEL & SUNDBERG (1962); LANGENEGGER et alii (1970); HARROP et alii (1975). Essa grande incidência pode ser atribuída às condições de ordenha verificadas na Fase I deste trabalho.

Segundo WILSON (1954), a mamite estafilocócica é favorecida pela ordenha mecânica inadequada e, para DODD et alii (1957), relaciona-se com as injúrias e lesões de tetas produzidas pelo mal funcionamento da ordenhadeira. Essa condição encontrada na Fase I e, a natural presença desse microorganismo na pele, meato galactóforo e ambiente, bem demonstrado por DAVIDSON (1961), facilitaram a sua implantação no rebanho, ocasionando a alta incidência da mamite estafilocócica. A-

lém disso, a dificuldade de acesso das drogas usadas no seu tratamento, segundo PHILPOT (1970), torna essa mamite crônica, permitindo uma eliminação constante desse germe para o meio exterior e a sua grande difusão entre o rebanho da EMAF.

O *Streptococcus uberis* foi responsável por 13,38% das mamites, sendo esta frequência semelhante às observadas por HUGHES (1960); WILSON (1963) e EDWARDS & SMITH (1966).

Segundo PLASTRIDGE (1958), as mamites causadas por esse germe são geralmente subclínicas, podendo para CULLEN(1969) permanecer a glândula infectada por longos períodos sem manifestações de mamite.

FERGUSSON (1944) baseado em experimentos de campo, afirma que as injúrias de tetas podem exacerbar essa infecção tornando-a clínica, enquanto DODD et alii (1957) observaram efeitos análogos devido ao mal funcionamento da ordenhadeira.

No rebanho da EMAF, as mamites por *Streptococcus uberis* podem ser consideradas conseqüentes aos efeitos danosos da ordenhadeira (Fase I), bem como pela ocorrência desse microorganismo em outros locais além da

glândula mamária, o que segundo CULLEN (1969), dificultaria o controle dessa mamite, independentemente da eficácia dos tratamentos.

A incidência de *Streptococcus dysgalactiae* foi, como esperada, baixa. Segundo LITTLE & PLASTRIDGE (1946), eles podem atingir apenas alguns animais do plantel isoladamente e desaparecer após o tratamento, com recuperação total dos quartos infectados. Esse fato foi constatado neste trabalho, sendo os nossos resultados semelhantes aos encontrados por FROST (1962), no Sudeste da Austrália.

Os *Staphylococcus* coagulase-negativa não foram considerados patogênicos por FIGUEIREDO (1962) e por KINGWILL et alii (1970), pois, acreditava-se que apenas a coagulação do plasma sanguíneo era indicativo de patogenicidade para os estafilococos. Entretanto, FORBES & HEBERT (1968); HOLMBERG (1973) e PEARSON et alii (1974), asseguram que este microorganismo está relacionado com o aumento no conteúdo celular do leite e fortes reações ao C.M.T., sendo, esta maneira, considerado patogênico para o úbere.

Neste trabalho, embora sua incidência tenha

sido pequena, eles foram considerados patogênicos por estarem relacionados a altas contagens celulares.

As infecções mistas, no total de seis (1,06%) foram causadas pela associação de dois microorganismos diferentes numa mesma glândula. O *Staphylococcus aureus*, muito prevalente no rebanho, esteve presente em todas essas associações, conforme estampado no Quadro VI sendo, sem dúvida, o responsável maior pelas manifestações dessa doença no rebanho da EMAF. Foi constatado, que após o tratamento ocorria restabelecimento parcial dessas mamites, permanecendo o *Staphylococcus aureus* na glândula enquanto desapareciam os outros microorganismos.

Sendo o rebanho da EMAF fechado, onde a substituição de animais é feita por outros do próprio plantel, pode-se considerar que a flora bacteriana é definida, não sendo esperado encontrar outros gêneros de microorganismos. Este fato, aliás, concorda com as afirmações de MURPHY (1956) e ROBERTS (1967) de serem estas bactérias as responsáveis por 97%-99% das mamites em todo o mundo.

5.3. Tratamento de mamite com Trimethoprim-Sulfametoxazole (TMP-SMZ)

5.3.1. Determinação da Concentração Inibidora Mínima (CIM)

Os resultados obtidos não foram semelhantes aos de RASMUSSEN (1971) e BUSHBY (1973) que, trabalhando com métodos análogos, verificaram a sensibilidade das principais bactérias causadoras de mamite frente a essa associação. Isso deveu-se, possivelmente, ao uso de proporções diferentes para cada droga o que altera seu poder bactericida e/ou bacteriostático. A proporção de 1:5 (TMP-SMZ) é, segundo BRUMFITT et alii (1973), a indicada para essa associação medicamentosa, razão pela qual foi a utilizada neste trabalho.

5.3.2. Tratamento

O tratamento de mamite foi feito via canal galactóforo, empregando-se diferente número de doses. Os resultados do Quadro IX, mostram não haver diferenças estatísticas, de modo geral, entre o número de doses de TMP-SMZ, uma vez que o teste do Qui-quadrado igual a 0,77 não foi significativo a nível de 5%. Isso provavelmente foi devido à maior sensibilidade do *Streptococcus*

uberis ao tratamento de 70,00% a 100,00% de acordo com o número de doses, concordando com CULLEN (1969) que afirmou ser fácil tratar as mamites por esse microorganismo.

Para as mamites estafilocócicas os resultados não foram bons. Concordamos com PHILPOT (1970) que a dificuldade de ação de drogas dentro do úbere poderá ter sido a responsável pela baixa eficiência da terapêutica com TMP-SMZ, contrastada com a observada *in vitro*. Pode-se dizer, ainda, que talvez, se a mistura TMP-SMZ possuísse maior velocidade de ação bactericida, poderíamos ter melhores resultados à medicação. A constante drenagem da medicação devida a produção e retirada do leite exige características deste tipo. A turbidimetria seria um índice adequado para comprovação da velocidade de ação. Dado a exigência de adição de sangue equino aos meios de cultivo, não nos foi possível executar a prova.

5.4. Irritabilidade provocada pelo veículo aquoso/oleoso

Pelo Quadro X e Gráfico I, observa-se que entre as 48-72 horas ocorreu aumento nas contagens médias

de células dos animais tratados com TMP-SMZ em veículo aquoso/oleoso. Nota-se, ainda, que ao sétimo dia essas contagens retornaram as proximidades dos limites iniciais. A irritabilidade, traduzida pela elevação do conteúdo celular, foi proporcional ao número de doses utilizadas, como esperado, não se observando, entretanto, grandes diferenças entre duas e três aplicações. Isso pode ser, possivelmente, atribuído à intensa exsudação de leucócitos induzida por duas aplicações intervaladas de 24 horas. Uma terceira dose, com o mesmo intervalo, não foi suficiente para produzir uma irritação maior, pois a curva leucocitária estaria representando o máximo de exsudação.

SPENCER et alii (1947), observaram que essa irritação ocorreu nas primeiras 24 horas da aplicação de penicilina em veículos aquoso, oleoso e aquoso/oleoso. Entretanto, LEITE et alii (1976), encontraram reações máximas ao C.M.T. até o quinto dia após a aplicação de penicilina em veículo oleoso.

Neste trabalho os maiores graus de irritação ocorreram entre 48-72 horas; esse fato seria explicado pela retenção do veículo aquoso/oleoso no úbere por até

72 horas, como foi verificado por FOLEY et alii (1949) e por EDWARDS (1964) em trabalhos semelhantes, onde o princípio medicamentoso era antibiótico.

6. CONCLUSÕES

1. Sob condições normais de funcionamento da ordenhadeira mecânica, a desinfecção pós-ordenha reduz em 65,78% as novas infecções intramamárias.
2. As flutuações de vácuo e a sobreordenha, são prejudiciais ao úbere, provocando aumento no conteúdo celular do leite e predispondo a mamite.
3. A desinfecção após a ordenha, realizada nas condições do item anterior, não é eficaz para a prevenção de novas infecções (redução somente de 22,16%).
4. Os estafilococos coagulase-positiva foram os principais microorganismos causadores de mamite no rebanho da EMAF (83,54%), seguindo-se o *Streptococcus uberis* (13,98%), os estafilococos coagulase - negativa (0,71%) e o *Streptococcus dysgalactiae* (0,71%). Ocorreram 1,06% de infecções mistas.
5. O *Staphylococcus aureus* mostrou-se sensível

in vitro ao TMP-SMZ; a droga, entretanto, foi de baixa eficiência (34,28%) para curar infecções do úbere causados por aqueles germes.

6. A associação TMP-SMZ foi eficiente para o tratamento das mamites por *Streptococcus uberis* ao nível de 76,00%.

7. A emulsão aquosa/oleosa, à base de óleo de amendoim, pode ser empregada como veículo no tratamento de mamite.

8. A irritação provocada pela emulsão aquosa/oleosa, medida em termos de aumento do conteúdo celular, provoca efeitos irritantes pronunciados entre 48-72 horas, regredindo às proximidades dos limites iniciais em torno dos sete dias.

A desinfecção pós-ordenha com solução iodo-glicerinada foi testada, no rebanho da EMAF-UFV-MG, sob condições normais e anormais de funcionamento da ordenhadeira mecânica, durante oito meses, através do California Mastitis Test, contagem celular e bacterioscopia, isolamento e identificação de microorganismos. Foram encontrados os seguintes resultados:

Fase I - foram utilizados 82 animais nessa fase (janeiro-abril/76), não sendo encontradas diferenças significativas entre as glândulas desinfetadas e controle, para as reações ao C.M.T., contagens celulares e achados bacterioscópicos, através do teste do Qui-quadrado. Nessa fase, onde a ordenhadeira funcionou com flutuações de vácuo e sobreordenha, a desinfecção pós-ordenha não foi capaz de prevenir os novos casos de mamite (Qui-quadrado igual a 3,12). A redução obtida foi de 23,60% e 3,03%, respectivamente, para o

Staphylococcus aureus e *Streptococcus uberis*, os principais microorganismos causadores de mamite no rebanho da EMAF.

Fase II- realizada durante o período maio-agosto / 76, sob condições normais de funcionamento da ordenhadeira, não havendo flutuações de vácuo ou sobreordena. Foram utilizados 61 animais nessa fase. Os resultados da desinfecção pós-ordena não foram afetados pela ordenhadeira, sendo efetiva para prevenção dos novos casos de mamite. O teste do Qui-quadrado para essa fase foi de 12,72. A redução encontrada foi de 67,60% e 44,44%, respectivamente, para o *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis*.

Foi estabelecida, também, a frequência dos microorganismos isolados nos casos de mamite do rebanho da EMAF. O *Staphylococcus aureus* foi o principal responsável (83,54%) seguindo-se o *Streptococcus uberis* (13,98%).

A associação TMP-SMZ foi empregada em veículo aquoso/oleoso, via canal galactóforo, para tratamento

de mamite, de uma a três doses, intervaladas de 24 horas. O teste do Qui-quadrado mostrou diferenças não significativas entre as doses empregadas, sendo baixa a eficiência do TMP-SMZ (34,28%) para tratamento via canal galactóforo, das mamites estafilocócicas, porém, o *Streptococcus uberis* foi mais sensível (76,00%) a essa associação medicamentosa.

A elevação do conteúdo celular, indicativo de irritação, provocada pelo veículo aquoso/oleoso, foi mais evidente entre 48-72 horas, sendo que com três doses foi registrada a maior contagem celular. Após sete dias, o conteúdo celular regrediu às proximidades dos limites iniciais.

The efficiency of glycerine iodine teat dip under normal and abnormal milking machine operation was observed in the EMAF-UFV-MINAS GERAIS-BRAZIL dairy herd during an 8 month period. California Mastitis Test (C.M.T.), Direct Microscopic Count (DMC), Bacterioscopic and Bacteriology were used for evaluation purposes.

The results:

Phase I - In the period from january-april/76, 82 animals were observed. When C.M.T., DMC, and Bacterioscopic results were analyzed by Chi-square, teat dip vs no teat dip were not significantly difference. Post milking teat dip did not avoid the new intramammary infections ($X^2 = 3,12$). The reduction of *Staphylococcus aureus* infections was 23,60% and *Streptococcus uberis* infections was 3,03% when there was

evidence of milking machine vacuum fluctuation and overmilking. These conditions are considered abnormal.

Phase II - In the period may to august/76, 61 animals were observed under normal milk procedures (no overmilking or vacuum fluctuations). The post-milking teat dip results under the above condition did prevent new mastitis cases ($X^2 = 12,45$). The reduction of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* was 67,60% and 44,44%.

The frequency of microorganism isolated in mastitis cases was determined. *Staphylococcus aureus* incidence was 83,54% and *Streptococcus uberis* was 13,98%. They were the most common bacteria in the herd.

The treatment of mastitis was made by Trimethoprim-Sulphametoxazole (TMP-SMZ), into teat canal, with one, two or three doses at 24 hours intervals. No significance difference ($X^2 = 0,77$) was found among number of doses. TMP-SMZ showed low efficiency for staphylococcal mastitis (34,28%). *Streptococcus uberis*

(76,00%) was more sensitive to treatment.

The increase number of cells indicated irritation, induced by vehicle water/oil, was more evident between 48-72 hours. After seven days DMC indicated cell counts had returned to initial levels.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BECKLEY, M.S. & SMITH, F.F. Vacuum stability in the pipeline milker. Jour. Dairy Sci., 45(5):700, 1962.
- BRAUND, D.G. & SCHULTZ, L.H. Physiological and environmental factors affecting the California Mastitis Test under field conditions. Jour. Dairy Sci., 46(3):197-203, 1963.
- BRUMFITT, W., HAMILTON-MILLER, J.M.T. & KOSMIDIS, J. Trimethoprim-Sulphamethoxazole: The present position. Jour. Infect. Dis., 128(Suppl.):778-791, 1973.
- BRYAN, C.S. The microscopic detection on bacterial defects of milk. Vet. Med., 36(8):415-419, 1941.
- BURCHALL, J.J. Mechanism of action of TMP-SMZ. II. Jour. Infect. Dis., 128(Suppl):437-441, 1973.
- BUSHBY, S.R.M. Trimethoprim-Sulphamethoxazole: *in vitro* microbiological aspects. Jour. Infect. Dis., 128(Suppl.):442-462, 1973.

- BUSHBY, S.R.M. & HITCHINGS, G.H. Trimethoprim: A
Suphonamide potentiator. Br. Jour. Pharmac.
Chemother., 33:72-90, 1968.
- CHARLETT, S.M. An improved staining method for the
direct microscopical counting of bacteria in milk.
Dairy Industry, 19(8):652-653, 1954.
- COUSINS, C.L., THIEL, C.C., WESTGARTH, D.R. & HIGGS,
T.M. Further short-term studies of the
influence of milking machine on the rate of
new mastitis infections. Jour. Dairy Res., 40
(2):289-292, 1973.
- CULLEN, G.A. *Streptococcus uberis*: A Review. Vet.
Bull., 39(3):155-165, 1969.
- DAVIDSON, I. Observations on the pathogenic
staphylococci in the dairy herd during a period of
six years. Res. Vet. Sci., 2(1):22-40, 1961.
- DODD, F.H., OLIVER, J. & NEAVE, F.K. The effect of
design of teat-cup liners on mastitis incidence.
Jour. Dairy Res., 24(1):20-26, 1957.
- EBERHART, R.J. & BUCKALEW, J.M. Evaluation of hygiene

- and dry period therapy program for mastitis control. Jour Dairy Sci., 55(12):1683-1691, 1972.
- EDWARDS, S.J. The diffusion and retention of penicillin after injection into the bovine udder. Vet. Rec., 76(20):545-549, 1964.
- EDWARDS, S.J. & SMITH, G.S. Epidemiology of mastitis in three dairy herds. Jour. Comp. Path., 76(3):231-240, 1966.
- FELL, L.R. Machine milking and mastitis. Dairy Sci. Abst., 26(12):551-569, 1964.
- FERGUSSON, J.A. Bacteriological studies of the infections with follow injury to the bovine udder. Amer. Jour. Vet. Res., 5(14):87-92, 1944.
- FIGUEIREDO, J.B. A comparison of the California Mastitis Test with the other commonly employed diagnostic test. Michigan, Michigan State University Library, 1957. 47p. (Thesis, M.S.).
- FIGUEIREDO, J.B. Estudo sobre a mamite bovina no município de Betim - Minas Gerais (comparação dos métodos de diagnóstico, frequência e sensibilidade dos germes isolados). Arq. Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte, 14:257-295, 1962.

- FOLEY, E.J., STULTS, A.W., LEE, S.W. & BYRNE, J.W.
Vehicles for sustaining penicilin levels in the
bovine mammary gland. Amer. Jour. Vet. Res., 10(34)
:66-70, 1949.
- FORBES, D. & HEBERT, C.N. Studies in the pathogenesis
of staphylococcal mastitis. Vet. Rec., 82(3):69-73,
1968.
- FROST, A.J. Incidence of udder infection and mastitis
in South-East Queensland. Austr. Vet. Jour., 38(4):
110-118, 1962.
- GROOTENHUIS, G., BRANDSMA, S. & FLAMAND, A.M.G.
Prevention of mastitis by post-milking disinfection
of the teats. Tijdschr. Diergeness., 99(14):691-698,
1974.
- HARROP, H.M.V., PEREIRA, L.J.G., BRITO, J.F.P. & MELO,
A.M.B. Incidência de mastite bovina na bacia leitei-
ra da zona do agreste meridional de Pernambuco. Pesq.
AgroPec. Bras., (serie Vet.), 10(8):65-67, 1975.
- HOLMBERG, C. *Staphylococcus epidermitis* isolated from
bovine milk. Acta Vet. Scand., 45 (Suppl.):1-144,
1973.
- HUGHES, D.L. Some epidemiological patterns in bovine
mastitis. Vet. Rec., 72(25):485-498, 1960.

- KINGWILL, R.G., NEAVE, F.K., DODD, F.H., GRIFFIN, T.K., WESGTGARRH, T.R. & WILSON, C.D. The effect of a mastitis control system on levels of subclinical and clinical mastitis in two years. Vet. Rec., 87(4): 94-100, 1970.
- KIRKBRIDGE, C.A. & ERHART, A.B. The effect of milking machine function on udder health. Jour. Amer. Vet. Med. Ass., 155(9):1499-1506, 1969.
- LAING, C.M. & MALCOLM, F.G. The incidence of bovine mastitis with special reference to the non-specific condition. Vet. Rec., 68(27):447-455, 1956.
- 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. Agro-Pec. Bras. (série Vet.), 5:437-440, 1970.
- LANGOIS, B.E. & PYLES, W.M. Effect of post-milking teat dip "Bovadine" on the incidence of *Staphylococcus aureus* and mastitis. Jour. Milk Food Technol., 38(1):16-19, 1975.
- LEITE, R.C., BRITO, J.R.F. & FIGUEIREDO, J.B. Alterações de glândulas mamárias de vacas tratadas intensamente, via mamária, com penicilina em veículos

- aquoso e oleoso. I. Variações de contagem de leucócitos e leitura de "California Mastitis Test". II. Presença de estafilococos, bacilares e *Candida sp.* Arq. Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte, 28(1):27-31, 1976.
- LITTLE, R.B. & PLASTRIDGE, W.N. Bovine Mastitis. A symposium. New Your, London, McGraw Hill Book Comp. Inc., 1946. p.1-546.
- MACDONALD, J.S. Relationship of hygiene, milking machine function, and intramammary therapy to udder diseases. Jour. Amer. Vet. Med. Ass., 155(6):903-914, 1969.
- MACDONALD, J.S. Effect of milking machine design and function on new intramammary infection. Jour. Food Milk Technol., 38(1):44-51, 1975.
- MARSHAL, R.T., SIKES, J.D. & MORGAN, R.D. After milking teat disinfection with acid-types iodophor and spray containing hexachlorophene. Jour. Dairy Sci., 52(6): 938, 1969.
- MARX, G.D. Quarter milking machine and post-milking teat dip to study factors involved in mastitis. Jour. Dairy Sci., 54(5):797, 1971.
- MOCHRIE, R.D., HALE, H.H., EATON, H.D., ELLIOTT, F. I., PLASTRIDGE, W.N. & BEALL, G. Effects of vacuum level

and milking duration on udder health in mastitis-free first calf heifers. Jour. Dairy Sci., 36(5):504-515, 1953.

MOCHRIE, R.D., HALE, H.H., DEMBICZAK, C.M., EATON, H.D., PLASTRIDGE, W.N., JOHNSON, R.E. & BEALL, G. Effects of vacuum level and milking duration on Guernseys and holsteins differing with respect to lactation number and status of udder health. I. Udder health. Jour. Dairy Sci., 38(11):1272-1282, 1955.

MOCHRIE, R.D., HALE, H.H., EATON, H.D., JOHNSON, R.E. & PLASTRIDGE, W.N. A further study of effects of vacuum level and milking duration on udder health and milk production. Jour. Dairy Sci., 36(11):1223-1232, 1953a.

MURPHY, J.M. Mastitis. The struggle for understanding. Jour. Dairy Sci., 29(12):1768-1773, 1956.

NEAVE, F.K., DODD, F.H., KINGWILL, R.G. & WESTGARTH, D.R. Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. Jour. Dairy Sci., 52(5):696-707, 1969.

NEWBOULD, F.H.S. Disinfection in the prevention of udder infections: A review. Canad. Vet. Jour., 6(2):29-37, 1965.

NYHAN, J.F. & COWHIG, M.J. Inadequate milking machine

vacuum reserve and mastitis. Vet. Rec., 81(5):122-124, 1967.

OLIVER, J., DODD, F.H. & NEAVE, F.K. Udder infections in the dry-period. V. The effect of teat disinfection at drying-off on the incidence of infections in the early dry period. Jour. Dairy Res., 23(2):212-216, 1956.

PANKEY, J.W. & PHILPOT, W.N. Hygiene in the prevention of udder infections. I. Comparative efficacy of four teat dips. Jour. Dairy Sci., 58(2):202-204, 1975.

PEARSON, J.K.L. & GREER, D.O. Relationship between somatic cell counts and bacterial infections of the udder. Vet. Rec., 95(12):252-256, 1974.

PEARSON, J.K.L., GREER, D.O., POOLEN, N., GORDON, F.J. & ACHESON, M.D. Evaluation of an iodophor teat spray in the control of infections and cellular reactions in the udder. Vet. Rec., 96(19):423-427, 1975.

PEARSON, J.K.L., GREER, D.O. & SPENCER, B.K. The relationship between bulk milk cell count and cow and quarter mastitis incidence. Vet. Rec., 88(19):488-494, 1971.

PLASTRIDGE, W.N. Bovine Mastitis. A review. Jour.

- Dairy Sci., 41(9)1141-1181, 1958.
- PHILPOT, W.N. Modern mastitis management. Vet. Scope, 15(1):2-10, 1970.
- PREESCOT, S.C. & BREED, R.S. The determination of the number of body cells in milk by a direct method. Jour. Infect. Dis., 7(5):632-640, 1910.
- RASMUSSEN, F. *In vitro* antibacterial activity of trimethoprim and sulphonamide on bacteria causing bovine mastitis. Acta Vet. Scand., 12:131-133, 1971.
- RENDEL, J. & SUNDBERG, T. Factors influencing the type and incidence of mastitis in Swedish dairy cattle. Acta Vet. Scand., 3(1):13-32, 1962.
- ROBERTS, S.J. Prevention and control of clinical infections. Mastitis Proceedings National Mastitis Council, Inc., 1967. In PHILPOT, W.N. Modern mastitis management. Vet. Scope, 15(1):2-10, 1970.
- SCHALM, O.W. & LASMANIS, J. Distribution of micrococci and other bacteria in milk samples from a single dairy herd after twelve years of mastitis control. Amer. Jour. Vet. Res., 18(69):778-784, 1957.
- SCHALM, O.W. & LASMANIS, J. The leukocytes: origin and function in mastitis. Jour. Amer. Vet. Med. Ass.,

153:1688-1694, 1968

- SCHALM, O.W. & NOORLANDER, D.O. Experiments and observations leading to development of California Mastitis Test. Jour. Amer. Vet. Med. Ass., 130(5):199-204, 1957.
- SCHMIDT, G.H., SWITZER, K.O., GUEST, R.W. & GUTHRIE, R.S. Effect of teat-end vacuum fluctuations on milking rate and mastitis. Jour. Dairy Sci., 47(7):761-765, 1964.
- SCHULTZ, W.D. & SMITH, J.W. Effectiveness of post-milking teat dips. Jour. Dairy Sci., 55(4):426-431, 1972.
- SNEDECOR, G.W. Datos enumerados con mas de un grado de liberdade. In: _____. Metodos estadisticos aplicados à la investigación agrícola e biológica. Mexico, Cia. Editorial Continental S.A., 1970. 626 págs.
- SPENCER, G.R., KRAFT, M.E. & UNDERBJERG, G.K.L. Efficacy of intramammary infusion with penicillin and diluents on streptococci mastitis. Amer. Jour. Vet. Res., 8(29):325-329, 1947.
- STANLEY, D.E., KESLER, E.M. & BORTREE, A.L. Effect of a fluctuating milking vacuum on certain measures of

- udder health. Jour. Dairy Sci., 45(11):1345-1347, 1962.
- THIEL, C.C., COUSINS, C.L., WESGARTH, D.R. & NEAVE, F. K. The influence of some physical characteristics of the milking machine on the rate of new mastitis infections. Jour. Dairy Res., 40(1):117-129, 1973.
- WESEN, D.P. & SCHULTZ, L.H. Effectiveness of a post-milking teat dip in preventing new udder infections. Jour. Dairy Sci., 53(10):1391-1403, 1970.
- WILSON, C.D. The present position with regard to bovine mastitis and a review of recent trials of various antibiotics for bovine mastitis. Vet. Rec., 66(49):775-783, 1954.
- WILSON, C.D. Factors that predispose to mastitis with special reference to milking technique. Vet. Rec., 70(8):159-1966, 1958.
- WILSON, C.D. The microbiology of bovine mastitis in Great Britain. Bull. Of. Int. Epiz., 60(1):553-551, 1963.