

**Geraldo Márcio da Costa**

**MAMITE BOVINA EM REBANHOS LEITEIROS DA REGIÃO SUL DO  
ESTADO DE MINAS GERAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção de título de Doutor em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Nivaldo da Silva

**Belo Horizonte  
UFMG Escola de Veterinária-  
2008**

C837m Costa, Geraldo Márcio da, 1961-  
Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do estado de  
Minas Gerais / Geraldo Márcio da Costa. – 2008.  
123 p. : il.

Orientador: Nivaldo da Silva  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais,  
Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

1. Bovino de leite – Doenças – Teses. 2. Mastite – Diagnóstico –  
Teses. 3. Mastite – Controle – Teses. 4. Leite – Análise – Teses.  
5. Epidemiologia - Teses. I. Silva, Nivaldo da. II. Universidade  
Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.089 692





## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho ao povo brasileiro que sempre custeou os meus estudos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades...

Aos meus filhos, Amanda, Lucas, Thiago, Sílvia e Victória, por me mostrarem a necessidade de continuar sempre. Ficam também registradas as desculpas pelas ocasiões em que tive que me ausentar do convívio de vocês para me dedicar a este e a outros trabalhos.

Aos meus pais e irmãos, pelos esforços despendidos para minha formação e por me estimularem sempre.

Aos meus avôs paternos, Joaquim e Dinorah, pelos exemplos de coragem e de honestidade.

À minha avó materna, Antônia, pelo exemplo de fibra, sinceridade e honestidade.

Ao meu orientador e amigo, professor Dr. Nivaldo da Silva, que me iniciou na bacteriologia, com o qual trabalhei durante toda a graduação e pós-graduação e que muito contribui na minha formação humana e profissional.

Aos professores Rômulo Cerqueira Leite e Francisco Carlos Faria Lobato, José Sérgio Resende e José Brito de Figueiredo pela amizade e orientações neste trabalho e na minha carreira profissional.

À Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, na figura de cada um de seus funcionários, docentes, técnicos e administrativos, por ter me proporcionado todas as oportunidades para crescer humana e profissionalmente.

Ao professor Dr. Henrique César Pereira de Figueiredo (UFLA), amigo e co-orientador informal, pelo auxílio constante neste trabalho.

Aos amigos professores da UFLA, Dr. Christian Hirsch (DMV), Dra. Antônia Figueiras (Fitopatologia), Dr. João Bosco (Genética), Dr. Luciano Paiva (DQI) e Dr. Antônio Chalfun (DBI) e Dra. Magnólia Campos (DBI), pelo auxílio e orientações na execução e análises dos trabalhos de epidemiologia molecular.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de melhoria na minha qualificação profissional.

À minha namorada Vicentina, companheira em todos os aspectos.

À professora Dra. Vera Lúcia Viegas de Abreu, por estar presente nas horas decisivas de minha vida profissional e pelo doce convívio ao longo do tempo em que estivemos juntos na Escola de Veterinária da UFMG.

Ao Dr. Néelson Éder Martins, amigo inseparável e colaborador deste e de outros trabalhos.

Aos alunos de graduação dos cursos de Zootecnia e de Medicina Veterinária da UFLA que tanto colaboraram para a execução deste trabalho. Em especial a Ulisses de Pádua Pereira e Demétrio Junqueira de Figueiredo, amigos inseparáveis e colaboradores em todas as etapas deste trabalho.

Aos técnicos, Anderson Tadeu da Silva (LCBM-UFLA), Anderson Andrade Ramos (LCBM-UFLA), Lamartine Nóbrega Filho (DBI-UFLA), Dircéia Lázaro Aparecida (DMV-UFLA) e Júnia Pacheco (EV-UFMG), pela amizade e auxílio na execução deste trabalho.

Aos meus tios, em especial ao Tidim, pela amizade e ensinamentos.

Aos colegas técnico-administrativos da EV-UFMG com os quais eu passei doces momentos de minha vida, em especial à Nádia, Joãozinho, Ricardo, André, Doraci, Creuzinha, Cláudio, Ismael, Dona Neli, do DMVP; Liu, Pedrão, Adão, Joaquim, Messias e Geraldo Maconha, do Hospital Veterinário; Garrafinha, Tião e Eustáquio, do Setor de Transporte; Beth, Eliana Silva, Eliane, Mirian e Moura, da Administração; Artur, Giovani, Arlei, Teco (*in memorian*) e Conceição, da gráfica, e Danilo e Toninho, da Zootecnia.

Ao Sr. Geraldo Marçal de Faria e Prof. Dr. José Osvaldo Costa, pela oportunidade que me concederam de retomar meus estudos no Coltec/UFMG, uma etapa importante na minha formação.

Aos professores e amigos Dra. Celina Maria Modena e Dr. José Ailton da Silva, pelo estímulo e ensinamentos.

Ao Colégio Técnico da UFMG, pela formação básica, em especial aos professores Artur e José Nélio.

Às senhoras Ofélia, Isaldina (*in memorian*) e Dedé, pela orientação pedagógica e familiar.

Às minhas professoras de ensino médio, Maria Enir e Rosilene, do extinto Colégio Tristão de Athaide, em Belo Horizonte, que me iniciaram no mundo maravilhoso da ciência, pelos ensinamentos e dedicação.

À Escola Estadual José Bonifácio, em Belo Horizonte, onde cursei o ensino fundamental e tive toda a atenção do corpo docente e discente para adquirir as bases de minha formação.

Sem vocês a história não seria a mesma!

...a todos vocês meus sinceros agradecimentos!

---

## SUMÁRIO

---

	Pag.
RESUMO.....	13
ABSTRACT .....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	14
2.1 Definição e etiologia da mamite bovina.....	14
2.2 Índices de mamite em rebanhos brasileiros .....	17
2.3 Contagens de células somáticas no leite do tanque, em rebanhos brasileiros .....	18
2.4 Importância econômica da mamite bovina .....	20
2.5 Importância de saúde pública da mamite.....	20
2.6 Formas de apresentação da mamite bovina .....	21
2.7 Diagnóstico da mamite bovina .....	22
2.8 Perfil de sensibilidade antibiótica de <i>Staphylococcus aureus</i> aos antimicrobianos .....	24
2.9 Fatores de virulência de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	25
2.10 Diversidade populacional de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	27
2.11 Medidas gerais de controle e de prevenção para a mamite bovina .....	31
2.11.1 Monitoramento regular do rebanho .....	32
2.11.2 Tratamento de casos clínicos.....	32
2.11.3 Tratamento de vacas secas .....	33
2.11.4 Limpeza e anti-sepsia de tetos .....	34
2.11.5 Higiene da ordenha.....	35
2.11.6 Higiene ambiental .....	36
2.11.7 Utilização da linha de ordenha .....	37
2.11.8 Descarte de animais cronicamente infectados.....	37
2.11.9 Manutenção e uso correto da ordenhadeira .....	38
ESTUDO I AGENTES ETIOLÓGICOS, CONTAGENS DE CÉLULAS SOMÁTICAS E ÍNDICES DE MAMITE EM REBANHOS LEITEIROS DA REGIÃO SUL DO ESTADO DE MINAS GERAIS, BRASIL .....	39
ESTUDO II MAMITE POR LEVEDURAS EM BOVINOS LEITEIROS DO SUL DO ESTADO DE MINAS GERAIS, BRASIL .....	61
ESTUDO III DIVERSIDADE POPULACIONAL DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLADOS DE CASOS DE MAMITE EM BOVINOS LEITEIROS DA REGIÃO SUL DE MINAS GERAIS .....	69
ESTUDO IV AVALIAÇÃO DE ALGUMAS MEDIDAS BÁSICAS DE CONTROLE PARA A MAMITE EM BOVINOS DA BACIA LEITEIRA DO SUL DE MINAS GERAIS.....	97
3. CONCLUSÕES GERAL .....	111
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAL.....	111

---

**LISTA DE TABELAS**

---

**BIBLIOGRAFIA CONSULTADA**

Tabela 1	Correlação entre os resultados do CMT, números de células somáticas nas amostras e estimativas de perdas de produção.....	23
Tabela 2	Estimativas de prevalência de quartos infectados e de perdas de produção em relação à CCSLT .....	24

**ESTUDO I**

Tabela 1	Relação de microrganismos envolvidos na etiologia dos casos clínicos e subclínicos de mamite em 35 rebanhos bovinos da bacia leiteira da região sul do estado de Minas Gerais, no período de março de 2004 a dezembro de 2006.....	46
Tabela 2	Índices de mamite clínica (IMC), mamite subclínica (IMSC) e contagens de células somáticas no leite do tanque (CCSLT) observadas em 35 rebanhos bovinos da bacia leiteira da região sul do estado de Minas Gerais, no período de março de 2004 a dezembro de 2006 .....	48
Tabela 3	Estimativas de perdas percentuais e em litros de leite anuais, em função das contagens de células somáticas no leite do tanque (CCSLT) de 35 rebanhos leiteiros do sul de Minas Gerais .....	58

**ESTUDO II**

Tabela 1	Frequências de infecções intramamárias por leveduras em 35 rebanhos leiteiros do sul de Minas Gerais, no período de março de 2004 a dezembro de 2006.....	64
Tabela 2	Leveduras isoladas a partir de 1.645 amostras de leite procedentes de 35 rebanhos leiteiros do sul de Minas Gerais, no período de março de 2004 a dezembro de 2006.....	65

**ESTUDO III**

Tabela 1	Tipos eletroforéticos observados no estudo de restrição enzimática dos produtos de amplificação do gene da coagulase, empregando-se a enzima <i>AluI</i> , em 352 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> procedentes de 35 rebanhos leiteiros do sul de Minas Gerais, no período de março de 2004 a dezembro de 2006 .....	77
Tabela 2	Associação entre os tipos clonais mais comuns de <i>Staphylococcus aureus</i> obtidos na RFLP com casos clínicos e subclínicos de mamite...	77

**ESTUDO IV**

Tabela 1	Dados sobre manejo, índices de mamite clínica (IMC) e subclínica (IMSC) e contagens de células somáticas no leite do tanque (CCSLT) de 35 rebanhos leiteiros do sul de Minas Gerais, no período de Março de 2004 a Dezembro de 2006 .....	104
----------	---	-----

---

**LISTA DE FIGURAS**

---

**BIBLIOGRAFIA CONSULTADA**

Figura 1	Distribuição de 273.000 amostras de leite analisadas pela Clínica do Leite/SP, no período de Julho de 2005 a Agosto de 2006, em função das contagens de células somáticas observadas (adaptado de Cassoli e Machado (2007) .....	19
Figura 2	Estrutura esquemática do gene que codifica a enzima coagulase de <i>Staphylococcus aureus</i> (Adaptado de Kanemitsu et al., 2001).....	27

### ESTUDO I

Figura 1	Índices de mamite clínica em 35 rebanhos bovinos da bacia leiteira da região sul do estado de Minas Gerais, no período de março de 2004 a dezembro de 2006 .....	49
Figura 2	Índices de mamite subclínica em 35 rebanhos bovinos da bacia leiteira da região sul do estado de Minas Gerais, no período de março de 2004 a dezembro de 2006 .....	49
Figura 3	Contagens de células somáticas no leite do tanque em 35 rebanhos bovinos da bacia leiteira da região sul do estado de Minas Gerais, no período de março de 2004 a dezembro de 2006 .....	53
Figura 4	Distribuição de 35 rebanhos leiteiros da região sul de Minas Gerais de acordo com as estimativas de perdas percentuais de produção de leite .....	59
Figura 5	Ciclo de manutenção da mamite bovina .....	59

### ESTUDO III

Figura 1	Eletoforese em gel de agarose a 1,2% dos produtos de amplificação do gene <i>femA</i> . Canaletas 1 e 20 DNA Ladder 1Kb Plus (Invitrogen-Brasil); canaletas; 2-17 amostras <i>femA</i> -positivas; canaleta 18 controle negativo <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228; canaleta 19 controle positivo <i>S. aureus</i> ATCC 25923 .....	75
Figura 2	Eletoforese em gel de agarose a 1,2% dos produtos de amplificação do gene da coagulase. Canaleta 1: DNA Ladder 100 pb (Invitrogen-Brasil); canaletas 2-13 diferentes padrões de amplicons observados ....	75
Figura 3	Eletoforese dos produtos de digestão do amplicon do gene da coagulase, empregando-se a enzima <i>AluI</i> . Canaleta 1: DNA Ladder 100pb (Invitrogen-Brasil)– canaletas 2-6; 11-15 e 25 tipo I; canaletas 17-20 tipo VII; canaletas 7 e 24 tipo XIII; canaleta 8: tipo X; canaleta 10: tipo II; canaleta 16: tipo VI; canaleta 21: tipo IV; canaleta 22: tipo XII; canaletas 23 e 26 tipo III.....	76
Figura 4	BLAST do produto de sequenciamento da amostra de <i>Staphylococcus aureus</i> de número 2 (tipo eletroforético I da PCR-RFLP), confirmando a qualidade do seqüenciamento.....	81
Figura 5	Alinhamento das seqüências de nucleotídeos obtidas do sequenciamento da porção 3'-terminal do gene da coagulase, demonstrando regiões conservadas (colunas coloridas) dentro das regiões de polimorfismo .....	83
Figura 6	Alinhamento das seqüências de nucleotídeos obtidas do sequenciamento da porção 3'-terminal do gene da coagulase, demonstrando regiões bastante variáveis (colunas não coloridas) dentro das regiões de polimorfismo.....	83
Figura 7	Alinhamento de aminoácidos da porção 3'-terminal do gene da coagulase, demonstrando os sítios de restrição para <i>AluI</i> .....	85
Figura 8	Alinhamento das seqüências de nucleotídeos obtidas do sequenciamento da porção 3'-terminal do gene da coagulase, demonstrando a inserção de duas unidades repetitivas de 81 pares de bases nas amostras 51 e 299 .....	85
Figura 9	Alinhamento de aminoácidos da porção 3'-terminal do gene da coagulase, exibindo algumas das unidades repetitivas presentes nas amostras analisadas.....	87
Figura 10	Arquivo de texto, exibindo o alinhamento de aminoácidos da porção 3'-terminal do gene da coagulase, ilustrando as unidades repetitivas encontradas nas amostras analisadas .....	89

Figura 11	Relação filogenética baseada na seqüência de aminoácidos da porção 3'-terminal do gene da coagulase de 19 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de casos de mamite em bovinos da região sul do Estado de Minas Gerais, utilizando-se o método de neighbor-joining com bootstrap de 1.000 replicatas .....	93
Figura 12	Relação filogenética baseada na seqüência de nucleotídeos da porção 3'-terminal do gene da coagulase de 19 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de casos de mamite em bovinos da região sul do Estado de Minas Gerais, utilizando-se o método de neighbor-joining com bootstrap de 1.000 replicatas .....	94
Figura 13	Perfil de resistência à ampicilina (AMP), penicilina G (PEN), polimixina B (POL) e à tetraciclina (TET) de 352 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de bovinos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais, no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2006.....	95
Figura 14	Perfil de resistência à cefalotina (CEF), cefotaxima (CTX), cefoperazona (CPZ), ceftiofur (CFT), cloranfenicol (CLO), enrofloxacina (ENR), florfenicol (FLO), gentamicina (GEN), lincomicina (LIN), neomicina (NEO), nitrofurantoina (NIT), novobiocina (NVB), oxacilina (OX), sulfazotrim (SZT), cefquimona (CFQ), associação de penicilina, nafcilina e dihidroestreptomicina (NAF) e associação de neomicina, bacitracina e tetraciclina (NBT) de 352 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de bovinos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais, no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2006.....	95

#### ESTUDO IV

Figura 1	Distribuição percentual de 35 propriedades leiteiras da região sul do estado de Minas Gerais de acordo com o tipo de assistência veterinária, no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2006 .....	105
Figura 2	Distribuição percentual de 35 propriedades leiteiras da região sul do estado de Minas Gerais de acordo com a forma de monitoramento da mamite subclínica, no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2006 .	105
Figura 3	Distribuição percentual de 35 propriedades leiteiras da região sul do estado de Minas Gerais de acordo com utilização do pré e pós-dipping, no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2006.....	107
Figura 4	Distribuição percentual de 35 propriedades leiteiras da região sul do estado de Minas Gerais de acordo com a utilização do tratamento de vacas secas, no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2006 .....	107
Figura 5	Problemas mais comuns constatados nos equipamentos de ordenhas de 35 propriedades leiteiras da região sul de Minas Gerais, no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2006.....	109



## RESUMO

Aspectos etiológicos e epidemiológicos da mastite bovina foram estudados em 35 rebanhos leiteiros da região sul de Minas Gerais. Verificaram-se elevados índices de mastite e de contagens de células somáticas, sendo predominantes os agentes contagiosos representados principalmente por *Staphylococcus* coagulase positivos (34,29%) e *Streptococcus agalactiae* (21,82%). Patógenos ambientais representaram 18,35% dos isolamentos, sendo *Streptococcus uberis* (6,52%), enterobactérias (3,64%) e leveduras (3,35%) os mais frequentes. Foi obtida baixa taxa de isolamentos de leveduras, sendo *Candida* foi o principal gênero isolado. Agentes ambientais apresentaram maior participação nos casos clínicos em relação aos contagiosos, exceção para *Streptococcus agalactiae*. Testes de tipagem baseados no antibiograma e na PCR-RFLP revelaram a existência de uma grande diversidade de *Staphylococcus aureus* na população estudada e a existência de tipos clonais predominantes entre os rebanhos. O seqüenciamento dos tipos eletroforéticos obtidos na PCR-RFLP confirmou a proximidade filogenética entre os isolados. Não se observou a associação de nenhum dos tipos clonais obtidos nos testes de tipagem com as formas de apresentação da mastite. Na maioria dos rebanhos, foram observadas falhas quanto às principais medidas de controle da mastite, o que justificou os elevados índices de ocorrência da doença.

Palavras chave: mastite bovina, epidemiologia, etiologia, Minas Gerais, Brasil

## ABSTRACT

Etiological and epidemiological aspects of bovine mastitis were studied in 35 dairy herds of southern region of Minas Gerais state. High rates of mastitis associated with high somatic cell counts were observed in most herds studied. Contagious agents represented by coagulase positive *Staphylococcus* (34.29%) and *Streptococcus agalactiae* (21.82%) were the predominant isolated microorganisms. Environmental agents accounted for 18.35% of the isolates, with *Streptococcus uberis* (6.52%), Enterobacteriaceae (3.64%) and yeasts (3.35%) as predominant pathogens. It was obtained low rates of isolation of yeasts and *Candida* was the main isolated genus. Environmental agents had greater participation in clinical cases in relation to contagious agents, exception to *Streptococcus agalactiae*. Antibiotic resistance, PCR-RFLP and sequencing tests aiming the study of the population diversity of *Staphylococcus aureus* were performed. These tests revealed the existence of a great diversity in population of and predominance of few clonal types in most studied herds. Sequencing of electrophoretic types obtained in the PCR-RFLP confirmed the phylogenetic closeness among the isolates. There was no association of antibiogram or RFLP clonal types with mastitis forms. Failures on the main measures for mastitis control were observed in most analyzed herds, which justified the high occurrence of disease.

Keywords: bovine mastitis, epidemiology, etiology, Minas Gerais, Brazil

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o segundo maior rebanho leiteiro do mundo e ocupa atualmente o sexto lugar entre os países produtores de leite, contudo a produção média de 1.170 litros vaca/ano não satisfaz a exigência mínima de 180 litros por habitante ano, preconizada pela Organização Mundial de Saúde (Guimarães, 2006).

A heterogeneidade dos sistemas de produção, a disponibilidade sazonal de forragens, bem como falhas no manejo sanitário e reprodutivo são alguns dos fatores que explicam a baixa produtividade do rebanho leiteiro nacional. Desse modo, melhorias nas áreas de nutrição, genética, reprodução e controle sanitário são os pontos-chaves para o aumento da competitividade deste segmento.

Em relação ao manejo sanitário, embora doenças infecciosas de grande importância econômica como a brucelose e tuberculose ainda sejam endêmicas no rebanho brasileiro, a mamite bovina constitui atualmente um dos problemas sanitários mais importantes na pecuária leiteira nacional. Tal fato gera uma grande demanda, por parte de toda cadeia produtiva do leite, por alternativas que venham minorar os prejuízos relacionados com ocorrência dessa doença, a qual deprecia a qualidade do leite, além de diminuir a rentabilidade do empreendimento, devido principalmente à queda de produção que se verifica nos rebanhos endemicamente acometidos.

Outro aspecto relevante é a necessidade de melhoria da qualidade do leite e derivados produzidos no Brasil, de modo a atender os requisitos de qualidade do mercado internacional, determinados pelo *Codex Alimentarius* e arregimentada pela Instrução Normativa Nº 51 (Brasil, 2002). Embora se saiba que o leite obtido em várias bacias leiteiras do país já preencha os quesitos de qualidade impostos pela nova legislação, é certo que, na maioria delas, haverá grande dificuldade de adequação aos novos padrões de qualidade, sobretudo em função

da heterogeneidade dos rebanhos leiteiros nacionais e do desconhecimento que a maioria dos produtores tem em relação ao impacto da mamite bovina na qualidade do leite.

Além dos aspectos econômicos que envolvem a mamite, leite e derivados têm sido relacionados como importantes causas de intoxicações e toxi-infecções de origem alimentar entre os seres humanos. Diversos microrganismos comumente envolvidos na etiologia das infecções intramamárias de bovinos têm sido frequentemente associados com processos patogênicos em seres humanos.

Tendo em vista a relevância econômica da mamite bovina e seus reflexos na saúde pública, faz-se necessário o conhecimento das alternativas modernas de diagnóstico, bem como dos aspectos envolvidos na epidemiologia dos casos, para que medidas mais adequadas de controle para a doença possam ser adotadas nos rebanhos nacionais.

O trabalho realizado, embora pontual em relação à complexidade do fenômeno representado pela mamite bovina, faz parte da busca, por parte do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras e da Escola de Veterinária da UFMG, de um melhor conhecimento acerca da epidemiologia da mamite bovina na bacia leiteira da região sul do Estado de Minas Gerais, uma das mais importantes do país.

## 2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

### 2.1-Definição e etiologia da mamite bovina

O termo mamite designa os fenômenos inflamatórios, geralmente de natureza infecciosa, que acometem a glândula mamária (Bradley, 2002). Segundo LeBlank et al. (2006), trata-se de uma doença de cunho multifatorial que tem nas inter-relações entre o hospedeiro, o ambiente e os agentes infecciosos os fatores determinantes para sua ocorrência.

A literatura relaciona o envolvimento de diversos grupos de microrganismos na etiologia das infecções intramamárias de bovinos (IIM), representados por vírus, algas, fungos, micoplasmas e, principalmente, as bactérias. Estes podem ser classificados em patógenos contagiosos, onde se incluem *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*), *Mycoplasma* spp., *Corynebacterium bovis* (*C. bovis*), para os quais a transmissão se dá geralmente durante a ordenha; e agentes ambientais, onde se inserem os coliformes, *Pseudomonas aeruginosa*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus uberis* (*S. uberis*), *Enterococcus* spp., fungos, dentre outros. Estes têm no ambiente o local de manutenção, verificando-se as infecções normalmente no intervalo entre ordenhas (Brito e Brito, 1998; Santos e Fonseca, 2007).

Embora cerca de 137 microrganismos diferentes possam estar envolvidos na etiologia da mamite bovina, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *S. uberis* e *Escherichia coli* (*E. coli*) são responsáveis por cerca de 80% dos casos. Menos que 5% das infecções são causadas por *C. bovis*, *Pseudomonas* sp., *Mycobacterium* sp., *Nocardia asteroides*, *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *Serratia* sp. e *Prototheca* sp. (Ranjan et al., 2006).

Por apresentarem um envolvimento mais freqüente e um potencial patogênico maior em relação aos demais agentes, *S. aureus* e *S. agalactiae* são classificados como “patógenos maiores”, enquanto as demais espécies de *Streptococcus*, *C. bovis* e *Staphylococcus* coagulase negativos recebem a designação de “patógenos menores” (Myllys et al., 1994; Brito e Brito, 1998).

O gênero *Staphylococcus* possui 39 espécies, classificadas em coagulase-negativas (SCN) ou coagulase-positivas (SCP), conforme o resultado frente ao teste de coagulase (Holt et al., 1994). O grupo SCP inclui *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* subsp *schleiferi* e *S. delphini* (Bes et al., 2000; Koneman et al.,

2001). Além destas, foram propostas a inclusão no grupo SCP das espécies *Staphylococcus lutrae* (Foster et al., 1997) e *Staphylococcus pseudointermedius* (Devriese et al., 2005). Eventualmente, *S. hyicus* e *S. intermedius* têm sido associados à IIM em bovinos (Botha e Brand, 1987; Roberson et al., 1996; Capurro et al., 1999). Contudo, segundo Roberson et al. (1996), cerca de 95% de amostras de SCP isoladas a partir de IIM em bovinos são representadas por *S. aureus*.

Atualmente, *S. aureus* destaca-se como um dos microrganismos mais freqüentemente associados às IIM de bovinos em todos os continentes e o agente que isoladamente determina as maiores perdas na pecuária leiteira (Annemüller et al., 1999; Schlegelová et al., 2003; Vasudevan et al., 2003;). Fitzgerald et al. (1997) relataram que a mamite clínica e subclínica de causa estafilocócica é de considerável relevância na Suíça, onde este agente representa cerca de 40% dos isolamentos. No Brasil, *S. aureus* é considerado o principal agente causal da mamite bovina, com taxas de isolamento variáveis entre 8,3% e 49,23% (Langoni et al., 1991; Costa et al., 1995; Moretti et al., 1998; Brito et al. 1999; Laffranchi et al., 2001; Donatele et al., 2002).

*S. agalactiae*, o principal agente associado à IIM antes da descoberta dos antibióticos, permanece como um importante agente da mamite bovina. Segundo Duarte et al., (2004), as taxas de infecção para este agente variam bastante entre rebanhos, sendo encontrados altos índices de morbidade em rebanhos nos quais as medidas de controle têm sido negligenciadas.

As IIM ocasionadas por *S. agalactiae* estão geralmente associadas com elevadas contagens de células somáticas no leite do tanque (CCSLT) e contagem bacteriana total (CBT) e decréscimo na quantidade e qualidade do leite produzido pelo animal/rebanho infectado (Zafalon et al., 1999; Merl et al., 2003). Segundo Keefe (1997), trata-se de um agente altamente contagioso, que causa quadros de mamite

com baixa taxa de cura espontânea, mas que geralmente responde bem à antibioticoterapia, o que possibilita a adoção de programas de erradicação centrados no tratamento coletivo dos animais em lactação.

No Brasil, *S. agalactiae* tem sido relacionado como um dos principais agentes etiológicos da mamite bovina. Entretanto, a maioria dos trabalhos não identifica os isolados de *Streptococcus*, os quais são relatados como *Streptococcus* spp. São citadas taxas de isolamento que variam entre 4,6% e 28,05% (Brant e Figueiredo, 1994; Costa et al., 1995; Pardo et al., 1998; Brito et al. 1999; Laffranchi et al., 2001; Barbalho e Mota, 2001; Mota et al., 2004). Brito et al. (1999) relataram a ampla disseminação deste agente em rebanhos do Estado de Minas Gerais, sendo isolado em 60% dentre 48 propriedades estudadas nas regiões da Zona da Mata e Campos das Vertentes. Em rebanhos leiteiros americanos e canadenses, são citadas prevalências entre 40% e 47% (Keefe, 1997).

*Corynebacterium bovis* é um patógeno contagioso amplamente disseminado entre os rebanhos leiteiros que pode ser facilmente isolado do esfíncter dos tetos. Geralmente as taxas de isolamento deste patógeno são mais elevadas em rebanhos nos quais existem falhas com relação à anti-sepsia de tetos (Watts et al., 2000). As IIM ocasionadas por este agente são geralmente subclínicas e associadas com baixas contagens de células de somáticas (Langoni et al., 1991; Costa et al., 1995; Brito et al., 1999; Mota et al. 2004). Levantamentos realizados em rebanhos de diferentes bacias leiteiras brasileiras apontaram prevalências para *C. bovis* entre 9,3% e 55,19% (Brito et al., 1999; Pardo et al., 1999; Laffranchi et al., 2001; Barbalho e Mota, 2001; Mota et al. 2004; Costa et al., 2005

Os SCN são agentes que colonizam a pele dos tetos e causam infecções oportunistas. Trata-se de um grupo bastante heterogêneo que embora apresente comportamento predominantemente contagioso possui

espécies, *S. sciuri* e *S. xylosus*, que podem ser encontradas em altas contagens no ambiente e nas camas dos animais e ter disseminação ambiental. Estudos têm demonstrado que estes agentes apresentam grande importância na etiologia das IIM em vacas primíparas (Pardo et al., 1998; Laffranchi et al., 2001) e em rebanhos nos quais as infecções por *S. aureus* e *S. agalactiae* foram controladas (Harmon e Langlois, 1989; Silva, 1999; Sears e McCarthy, 2003).

Segundo Sears e McCarthy (2003), SCN determinam geralmente quadros subclínicos associados com baixas contagens de células somáticas, sendo *S. chromogenes*, *S. hyicus*, *S. epidermidis*, *S. hominis* e *S. xylosus* as espécies mais comumente isoladas de IIM. No Brasil, Brabes et al. (1999) identificaram *S. chromogenes* (11,81%), *S. sciuri* (9,45%), *S. simulans* (7,08%), *S. hyicus* (6,30%) e *S. xylosus* (4,72%) como as espécies mais frequentes em rebanhos de Minas Gerais e São Paulo. Levantamentos realizados em diversas regiões do Brasil apontaram prevalências de SCN variáveis entre 12,3% e 46,32% (Nader et al., 1984; Brito et al., 1999; Pardo et al., 1999; Barbalho e Mota, 2001; Donatele et al., 2002).

Dentre os agentes ambientais, coliformes e *Streptococcus uberis* são microrganismos de grande relevância, sobretudo em rebanhos bem manejados que apresentam baixa CCST, nos quais as infecções por patógenos contagiosos foram controladas (Bradley, 2002). Hillerton et al. (1993) relataram que cerca de dois terços dos casos de mamite clínica que ocorrem em rebanhos do Reino Unido, onde os patógenos contagiosos foram controlados, são causados por *E. coli* ou *S. uberis*.

*E. coli* é o coliforme mais comumente isolado nos casos de mamite ambiental. As mamicas causadas por este microrganismo que ocorrem geralmente durante o período seco e logo após o parto são geralmente transitórias e associadas com quadros clínicos agudos ou superagudos, que podem ser fatais (Hogan e Smith, 2003; Burvenich et al., 2003). Entretanto, tem sido

demonstrado que *E. coli* pode determinar infecções persistentes da glândula mamária e que as amostras dotadas desta capacidade têm maior habilidade em invadir e replicar no interior de células epiteliais (Dogan et al., 2006).

*S. uberis* tem grande importância como um microrganismo associado ao ambiente, especialmente em sistemas de confinamento, que empregam camas de palha, onde pode alcançar altas concentrações (Hillerton, 1996; Hillerton e Berry, 2003). Considera-se que vacas criadas a pasto são menos propensas à infecção por este microrganismo. Entretanto, de acordo com Harmon et al. (1992) a população deste agente em pastagens intensivamente utilizadas pode ser semelhante àquela observada em materiais de camas. Pankey et al. (1996) relataram que *S. uberis* é um dos principais agentes envolvidos na etiologia da mamite em rebanhos da Nova Zelândia que são mantidos predominantemente à pasto.

Diferentes formas de apresentação podem ser observadas quando do envolvimento de *S. uberis* na mamite bovina, inclusive infecções crônicas. Estudos conduzidos por Hogan e Smith (1997) apontaram que *S. uberis* foi responsável por 14-26% dos casos de mamite clínica verificados nos EUA, Canadá, Holanda e Reino Unido, no período 1987-1997. Segundo Hillerton e Berry (2003), os estreptococos ambientais podem ser responsáveis por até um terço dos casos clínicos de mamite nos rebanhos onde os patógenos contagiosos foram controlados.

Leveduras e algas da espécie *Prototheca zopfii* são considerados agentes incomuns da mamite bovina (Ranjan et al., 2006). Esses agentes são encontrados em locais úmidos e ricos em matéria orgânica, sendo facilmente isolados do epitélio externo dos tetos e de equipamentos de ordenha (Bexiga et al.; 2003; Buzzini et al., 2004).

A incidência de IIM provocadas por leveduras é usualmente baixa, embora ocasionalmente possam ser observados surtos, sobretudo em rebanhos

intensivamente manejados nos quais existem falhas na higiene ambiental ou naqueles em que o tratamento local de casos clínicos de mamite é feito sem a observância dos princípios básicos de assepsia e anti-sepsia (Moretti et al., 1998; Crawshaw et al., 2005; Santos e Marin, 2005).

Diversas espécies de leveduras dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Trichosporum* têm sido associadas com a etiologia das IIM de bovinos. Contudo, *Candida* é geralmente o gênero principal, verificando-se grande variação quanto às prevalências entre rebanhos e às espécies identificadas (Fansworth e Sorensen, 1972; Costa et al.; 1993; Aalbaek et al., 1994; Krukowski et al., 2000; Santos e Marin, 2005).

*Prototheca zopfii* é a principal espécie de alga envolvida na etiologia da mamite bovina, geralmente associada a casos clínicos de difícil tratamento, caracterizados por queda acentuada na produção de leite e fibrose de quartos, o que geralmente implica no descarte dos animais acometidos (Bexiga et al.; 2003; Buzzini et al., 2004; Ranjan et al., 2006). Segundo Janosi et al. (2001), a mamite causada por este agente, embora incomum, é característica de rebanhos de alta produtividade onde existem falhas na higiene de ordenha e do ambiente. Os dados disponíveis na literatura apontam baixas taxas de isolamento para *Prototheca zopfii*, sendo citados índices que variam entre 0% e 2,89% (Langoni, 1997; Fillippsen et al., 1999; Pardo et al., 1999; Mota et al., 2004), contudo, eventualmente verificam-se surtos de grandes proporções (Costa et al., 1996; Costa et al.; 1999; Ranjan et al., 2006).

## **2.2-Índices de mamite em rebanhos brasileiros**

Os índices de mamite clínica e subclínica são parâmetros importantes para se avaliar a sanidade da glândula em termos de rebanho e a eficiência das medidas de controle adotadas para a mamite na propriedade. Estes índices variam muito entre rebanhos brasileiros em função da

adoção das medidas de controle para a doença, tipo de manejo adotado, nível de técnica e dos critérios de bonificação praticados pelos laticínios e cooperativas.

Nader Filho et al. (1984) relataram 20,83% de animais acometidos pela mamite subclínica entre 192 vacas lactantes de nove rebanhos da região de Jabotical/SP.

Brant e Figueiredo (1994) observaram que a prevalência de mamite subclínica em rebanhos leiteiros do Estado de Minas Gerais variou de 33,3% a 57,1%, com média de 42,8%.

Laranja e Machado (1994) verificaram índices de mamite subclínica de 56,23% para rebanhos produtores de leite tipo B do Estado de São Paulo, sendo *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *C. bovis* os agentes mais frequentemente isolados.

Costa et al. (1995) relataram que os índices de ocorrência da mamite subclínica verificados em rebanhos dos estados de Minas Gerais e São Paulo foram da ordem de 72%, e de 17,5% para mamite clínica, com uma proporção de casos clínicos em relação a subclínicos de 1:4 e de 1:7, em relação aos animais e quartos, respectivamente.

Pardo et al. (1999), ao examinarem 1010 quartos mamários de 256 vacas em lactação, verificaram índices de mamite mamite clínica e subclínica por quartos de 2,27% e 20,69%, respectivamente.

Brito et al. (1999) submetem ao California Mastitis Test (CMT) e ao teste Tamis 1609 vacas lactantes de 48 rebanhos leiteiros localizados na Zona da Mata e Campos das Vertentes de Minas Gerais e coletaram amostras de todos os quartos para cultura. Verificaram que 0,60% dos quartos estavam acometidos pela mamite clínica e 32,47% acometidos pela mamite subclínica.

Costa et al. (2001) divulgaram os dados sobre o acompanhamento dos índices de mamite clínica e subclínica de em 19.388

animais de 257 rebanhos localizados nos estados de Minas Gerais e de São Paulo, no período de 1993 a 1997. Foram registradas no período de observação as médias anuais de 14,53% para casos clínicos e de 72,46% para casos subclínicos. Os autores relataram uma proporção média de casos clínicos em relação a subclínicos de 1:6, mas com variações entre rebanhos de 1:2 até 1:43.

Bueno et al. (2002) verificaram índices médios de mamite clínica de 7,46% por animal e de mamite subclínica por quartos de 34,31% para cinco rebanhos da região de Pirassununga/SP. Os pesquisadores relataram ainda as relações de 1:8 e de 1:15 de casos clínicos em relação aos casos subclínicos por animal e por quartos, respectivamente.

Mota et al. (2004) relataram 59,27% de quartos acometidos pela mamite subclínica dentre 124 vacas lactantes de rebanhos do estado do Pernambuco que foram submetidas ao CMT.

Donatele et al. (2002) submetem 227 vacas procedentes de 64 propriedades de 14 municípios das regiões norte e noroeste do estado do Rio de Janeiro ao CMT. Verificaram que dos 907 quartos examinados, 41,8% encontravam-se acometidos pela mamite subclínica.

Santos e Fonseca (2007) relataram índices de mamite subclínica da ordem de 40% e de mamite clínica de 3-4% para rebanhos leiteiros tipo A e B, no Brasil.

De acordo com Cassoli e Machado (2007), os dados sobre as contagens de células somáticas individuais (CCSI) de cerca de 30.000 vacas de 250 rebanhos de diversas bacias leiteiras do Brasil, assistidos pela Clínica do Leite/SP, apontaram uma prevalência média da mamite subclínica de 45%, com uma incidência média de 25%.

Os índices de mamites clínica e subclínica observados nos rebanhos brasileiros encontram-se muito distantes dos patamares de 1-2% para casos clínicos e de

15% para casos subclínicos que segundo Santos e Fonseca (2007) seriam aceitáveis para rebanhos nos quais a mamite tem um controle satisfatório.

### 2.3-Contagens de células somáticas no leite do tanque, em rebanhos brasileiros

De acordo com Cassoli e Machado (2007), os dados sobre as contagens de células somáticas no leite do tanque (CCSLT) de cerca de 273.000 amostras de leite oriundas de 172 indústrias lácteas ligadas ao SIF que foram analisadas pela Clínica do Leite/SP (Figura 1) apontaram contagens médias de 378.000 cél./mL. Verificou-se que aproximadamente 70% das amostras apresentavam escores entre 300.000 e 600.000 e que cerca de 10% das amostras apresentavam contagens superiores a  $10^6$  cél./mL, limite máximo permitido pela legislação vigente (Brasil, 2002). Segundo

estes mesmos autores, os dados obtidos pelos demais laboratórios que integram o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL) apresentam indicadores semelhantes. No Laboratório de Qualidade do Leite da Universidade Federal de Goiás, 69% das amostras analisadas apresentavam contagens inferiores a 400.000 cél./mL, enquanto que nos laboratórios integrantes da rede existentes na Escola de Veterinária da UFMG e na EMBRAPA, em Juiz de Fora/MG, as médias aritméticas observadas foram de 400.000 e 550.000, respectivamente, e o percentual de amostras inconformes, CCSLT superiores a  $10^6$ , foi de 10-12%. Estes dados demonstram que grande parte dos produtores apresenta-se em conformidade com os quesitos de CCSLT exigidos pela legislação vigente, mas que muito ainda precisa ser feito para se atingir os padrões de qualidade exigidos pelo mercado internacional.

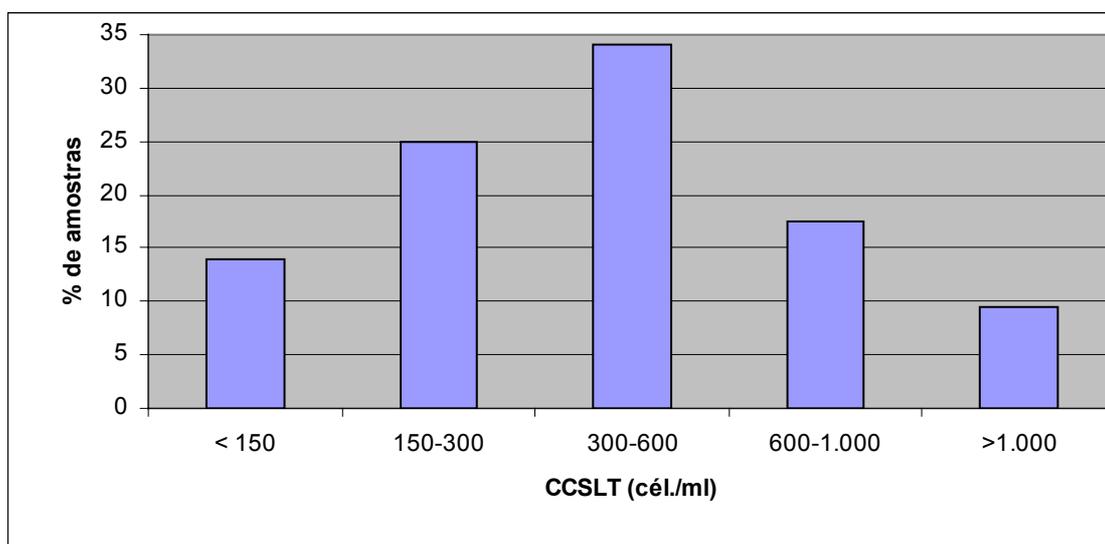


Figura 1. Distribuição de 273.000 amostras de leite analisadas pela Clínica do Leite/SP, no período de Julho de 2005 a Agosto de 2006, em função das contagens de células somáticas no leite do tanque (CCSLT) (adaptado de Cassoli e Machado (2007))

#### **2.4-Importância econômica da mamite bovina**

Apesar de todos os avanços logrados nas áreas de prevenção e de controle da mamite nas últimas décadas, esta permanece como a doença infecciosa mais prevalente e economicamente relevante de bovinos leiteiros em todos os continentes (Aarestrup e Jensen, 1997; Vintov et al., 2003). Segundo Bradley (2002), as perdas ocasionadas pela mamite na indústria leiteira mundial são estimadas em 35 bilhões de dólares anuais.

O ônus determinado pela doença se justifica pela redução na produção de leite dos animais acometidos, gastos com medicamentos, descarte de leite de animais em tratamento, reposição precoce de vacas e, eventualmente, a morte de animais. Além desses aspectos, verificam-se alterações nas características físico-químicas do leite, tais como a redução dos teores de gordura e caseína e o aumento da contagem de células somáticas, ocasionando baixo rendimento industrial, além de depreciação no valor nutricional e das características sensoriais do produto (Santos e Fonseca, 2007).

Levantamentos realizados por Costa et al. (1999) em propriedades leiteiras de São Paulo e Minas Gerais apontaram custos com a prevenção da mamite da ordem de US\$ 23.98 por vaca/ano, com perdas estimadas em US\$ 317.38 por vaca/ano, sendo os custos com prevenção, por propriedade, estimados em US\$ 1,558.59 e as perdas totais avaliadas em US\$ 20,611.32 no período de um ano. Em outra publicação, Costa (1998) relatou que as perdas decorrentes da doença são da ordem de 10-15% da produção total no rebanho nacional, o que representa cerca de dois a três bilhões de litros por ano.

Nos Estados Unidos, Degraes e Fetrow (1993) relataram perdas de US\$35 a US\$295 por vaca/ano, com custos totais estimadas em dois bilhões de dólares anuais. Nickerson (1993) observou, também nos EUA, que vacas acometidas pela

mamite subclínica produziam até 773 kg de leite a menos, em relação à média de vacas não infectadas de igual potencial produtivo.

Sob o ponto de vista econômico, a forma subclínica da mamite é a que determina os maiores prejuízos para o produtor, devido aos índices normalmente elevados com que ocorre no rebanho nacional e por ocasionar redução na produção dos quartos afetados e alterações na composição físico-química do leite (Veiga, 1998; Brito e Brito, 1998; Santos e Fonseca, 2007).

Um dos primeiros trabalhos que correlacionou as perdas na produção com a presença da mamite subclínica foi feito por Gray e Schalm (1962), no qual foram observadas perdas de 10%, 16% e de 24,4% para reações +, ++ e +++, respectivamente, em quartos positivos ao CMT, em relação ao homólogo sadio. Em Minas Gerais, Oliveira (1989) observou perdas para estas mesmas reações ao CMT de 13,8%, 24,4% e de 46,8%. Estes resultados foram endossados por Brant e Figueiredo (1994) que verificaram perdas respectivamente de 14,7%, 34,8% e de 45,0%, para reações +, ++ e +++, no CMT.

Zafalon et al. (1999) avaliaram a influência de vários agentes envolvidos em infecções subclínicas de bovinos na contagem de células somáticas individual (CCSI) e nas perdas de leite do quarto acometido em relação ao homólogo sadio. Verificaram que *S. aureus* reduziu a produção de quartos infectados em aproximadamente 23% e que as CCSIs desses mesmos quartos eram, em média, seis vezes superiores a dos quartos normais, demonstrando que além de diminuir a produção, a mamite subclínica altera a qualidade do leite.

#### **2.5-Importância de saúde pública da mamite**

O leite é um alimento rico em nutrientes e muito suscetível à contaminação por diferentes microrganismos. A presença destes no leite pode ser em decorrência de processos infecciosos instalados na glândula mamária ou de contaminação

subseqüente à ordenha, devido a falhas na coleta, estocagem ou no processamento (Tronco, 1997).

Diversos microrganismos envolvidos na etiologia da mamite bovina têm sido freqüentemente associados com infecções e toxi-infecções em seres humanos. Segundo Buyser et al. (2001), leite e derivados foram responsáveis por 6,1% dos surtos de toxi-infecções alimentares observados na França, no período de 1988 a 1997. *S. aureus* foi o agente mais freqüentemente envolvido nestes surtos, responsável 58,75% dentre os 177 surtos registrados. Segundo estes autores, leite e derivados foram veículos responsáveis por cerca de 2-5% dos casos de toxi-infecções alimentares ocorridos nos Estados Unidos, Finlândia, Holanda, Reino Unido, Alemanha e Polônia, neste mesmo período.

*S. aureus* é considerado como um dos principais agentes envolvidos nas intoxicações alimentares em várias regiões do mundo (Altekruse et al., 1998). Tal fato gera uma grande preocupação com relação à sua presença nos alimentos, principalmente lácteos, tendo em vista sua estreita associação com a mamite bovina. Carmo et al. (1995) relataram que o consumo de derivados lácteos elaborados com leite cru e sem um bom controle de qualidade pode causar casos de toxi-infecções alimentares em seres humanos, uma vez que estafilococos, principalmente *S. aureus*, que está freqüentemente associado a quadros de mamite bovina, tem sido comumente associados a estes quadros. *S. aureus* produtores de TSST-1 e enterotoxinas (SE's) que causam respectivamente a Síndrome do Choque Tóxico e intoxicações alimentares em seres humanos têm sido associados à mamite bovina (Balaban e Rasooly, 2000), já tendo sido isolados a partir de casos de mamite em rebanhos brasileiros (Cardoso et al., 1999; Silva, 2004).

Além da veiculação de microrganismos patogênicos, o leite pode ainda conter resíduos de antibióticos que podem ser originários do tratamento da mamite ou de outros processos infecciosos. A presença

destes resíduos, além de causar sérios problemas na indústria láctea, pode ocasionar graves problemas para a saúde humana (Tronco, 1997; Raia e Costa, 2006).

## **2.6-Formas de apresentação da mamite bovina**

As IIM podem se apresentar sob a forma clínica ou subclínica. A primeira se caracteriza pela presença de sinais do fenômeno inflamatório no quarto acometido, geralmente pouco evidentes na forma subclínica. Na forma subaguda, os sinais clínicos são discretos, caracterizados pela presença de grumos no teste Tamis, podendo evoluir ou não para formas mais graves, denominadas formas agudas, caracterizadas pela presença de sinais inflamatórios mais evidentes, tais como dor, calor, rubor, edema, perda de função e alterações nas características macroscópicas do leite (Costa et al., 1998; Santos e Fonseca, 2007).

Casos superagudos que estão geralmente associados com a infecção por agentes ambientais do grupo dos coliformes se caracterizam por sinais inflamatórios muito intensos nos quartos acometidos, com a presença de sinais sistêmicos tais como febre, dispnéia, hipotensão, prostração, anorexia, dentre outros (Burvenich et al., 2003; Hogan e Smith, 2003).

Outra forma clínica relevante é a crônica, na qual podem ser observados sinais de fibrose dos quartos acometidos, em alguns casos acompanhados de atrofia do mesmo e presença de fístulas. Uma característica comum nestes casos, nos quais *S. aureus* está freqüentemente associado, é o insucesso na cura bacteriológica e a recidiva do caso (Costa et al., 1998; Santos e Fonseca, 2007).

A forma subclínica da mamite caracteriza-se pela ausência de sinais externos de inflamação do quarto acometido, mas acarreta redução na produção do quarto afetado e alterações na composição do leite (Costa et al., 1998; Veiga, 1998; Brito e Brito, 1998; Santos e Fonseca, 2007). Sob o ponto de vista econômico, é aquela que se

reveste de maior significado, devido ao grande número de animais geralmente acometidos e por causar alterações físico-químicas na qualidade do leite, bem como a redução expressiva na produção do quarto acometido (Brito e Brito, 1998; Santos e Fonseca, 2007).

As diferentes formas de apresentação da mamite dependem da interação entre fatores de patogenicidade do microrganismo envolvido e os mecanismos de defesa dos hospedeiros. *S. aureus* geralmente está associado com a mamite subclínica, subaguda ou crônica, mas eventualmente pode determinar casos severos de mamite gangrenosa ou mesmo de natureza granulomatosa (botriomicose). *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Serratia* sp., além de causarem lesões nos alvéolos decorrentes da sua multiplicação na glândula mamária, produzem endotoxinas (lipopolissacárideos), ocasionando quadros geralmente superagudos, com choque endotóxico e morte do animal. Outros agentes como a *Nocardia asteroides*, *Nocardia brasiliensis* e *Arcanobacterium pyogenes* desencadeiam a formação de granulomas e abscessos intramamários, ocasionando a mamite denominada apostematosa que tem como característica a baixa taxa de cura (Costa, 1998).

## 2.7-Diagnóstico da mamite bovina

O diagnóstico correto da etiologia das IIM de bovinos é essencial para que se possa avaliar a importância relativa de cada um dos agentes envolvidos, permitindo a adoção de medidas específicas para os patógenos mais relevantes para o rebanho e, se necessária, a readequação das medidas de controle implantadas. Este pode ser executado através de métodos diretos ou indiretos. Entre os métodos diretos, a cultura bacteriológica é considerada a técnica padrão para se estabelecer o estado sanitário da glândula mamária em relação à ocorrência de IIM (Veiga, 1998; Brito e Brito, 1998), porém, resultados falso-positivos e falso-negativos possam ocorrer. Estes estão relacionados com a eliminação intermitente do agente no leite, a presença de resíduos de sanitizantes ou antibióticos (Santos e

Fonseca, 2007), a estratégia de processamento da amostra (Zecconi et al., 1997; Sol et al., 2002) ou devido à contaminação das amostras no momento da coleta (Buelow et al., 1996).

O diagnóstico da precoce da mamite clínica é feito pelo teste da Caneca de Fundo Escuro (Teste Tamis) ou por meio do exame clínico dos animais, quando se buscam as alterações decorrentes do processo inflamatório. Este teste consiste em examinar os primeiros jatos de leite previamente à ordenha dos animais. Pesquisam-se a presença de pus, grumos de fibrina, sangue e outras alterações sugestivas de reação inflamatória na glândula mamária, mas que ainda não são perceptíveis externamente no úbere. A execução diária, em todos os quartos de todos os animais em lactação, e em todas as ordenhas é importante porque permite o diagnóstico precoce da mamite clínica subaguda, ocasião em que o tratamento, se precocemente empregado, propiciará maiores chances de cura do animal, com menor gasto de medicamentos e menor descarte de leite (Veiga, 1998; Santos e Fonseca, 2007).

O diagnóstico da precoce da mamite clínica é feito pelo teste da Caneca de Fundo Escuro (Teste Tamis) ou por meio do exame clínico dos animais, quando se buscam as alterações decorrentes do processo inflamatório. Este teste consiste em examinar os primeiros jatos de leite previamente à ordenha dos animais. Pesquisam-se a presença de pus, grumos de fibrina, sangue e outras alterações sugestivas de reação inflamatória na glândula mamária, mas que ainda não são perceptíveis externamente no úbere. A execução diária, em todos os quartos de todos os animais em lactação, e em todas as ordenhas é importante porque permite o diagnóstico precoce da mamite clínica subaguda, ocasião em que o tratamento, se precocemente empregado, propiciará maiores chances de cura do animal, com menor gasto de medicamentos e menor descarte de leite (Veiga, 1998; Santos e Fonseca, 2007).

Entre os métodos indiretos, a avaliação das características físico-químicas do leite, incluindo a contagem de células somáticas (CCS), pH, condutibilidade e as dosagens de caseína, lactose, gordura e cloretos, é o recurso comumente utilizado para detecção da mamite subclínica. Em condições de campo, o diagnóstico dessa forma de apresentação é feito geralmente pelo California Mastitis Test (CMT), podendo ser utilizados também o Wisconsin Mastitis Test (WMT) e a mensuração da condutibilidade do leite. Em nível de laboratório, as alternativas de diagnóstico incluem os testes físico-químicos citados anteriormente a análise microbiológica do leite (Veiga, 1998; Brito e Brito, 1998; Santos e Fonseca, 2007).

O CMT é um teste bastante prático e eficiente para o diagnóstico a campo da mamite subclínica, possibilitando um diagnóstico rápido da condição sanitária do

rebanho com relação à mamite. O teste envolve a reação de um detergente que rompe a membrana das células somáticas presentes na amostra e libera o DNA, ocasionando uma gelificação que será proporcional à quantidade de DNA na amostra. A presença de indicador de pH (púrpura de bromocresol) auxilia na leitura e interpretação do teste, uma vez que nos casos de mamite, o pH do leite se torna ligeiramente alcalino (Veiga, 1998). O teste de CMT deve ser realizado mensalmente ou em intervalos menores caso o índice de mamite esteja muito elevado no rebanho, possibilitando avaliar a eficiência das medidas de controle preconizadas (Veiga, 1998; Santos e Fonseca, 2007).

O resultado do CMT permite estimar a concentração de células presentes na amostra de leite e a expectativa de perdas de produção do quarto afetado em função do processo infeccioso (Tabela 1).

Tabela 1. Correlação entre os resultados do CMT, números de células somáticas nas amostras e estimativas de perdas de produção no quarto afetado

<b>CMT</b>	<b>Células/mL</b>	<b>% de Perdas</b>
<b>N</b>	<b>= 100.000</b>	<b>5</b>
<b>T</b>	<b>300.000</b>	<b>8</b>
<b>+</b>	<b>900.000</b>	<b>9-18</b>
<b>++</b>	<b>2.700.000</b>	<b>19-25</b>
<b>+++</b>	<b>8.100.000</b>	<b>&gt;25</b>

Fonte: Adaptado de Santos e Fonseca (2007)

As células somáticas presentes no leite, representadas por células epiteliais e principalmente por leucócitos, desempenham papel importante na defesa da glândula mamária contra os agentes infecciosos. Fatores fisiológicos, genéticos, ambientais e infecciosos afetam a CCS do leite, contudo, a presença de infecção é o fator que mais altera este parâmetro, sendo os neutrófilos a população celular que mais aumenta nesses casos (Sordillo et al., 1997; Schukken et al., 2003).

A contagem de células somáticas individual (CCSI) é um recurso laboratorial comumente empregado para o diagnóstico da mamite subclínica, enquanto a contagem

de células somáticas do leite do tanque (CCSLT) é um parâmetro utilizado para se estimar o índice de mamite subclínica presente no rebanho e as perdas de produção. Segundo Harmon (1994), existe alta correlação entre a CCSLT, índices de mamite subclínica e as perdas de leite no rebanho (Tabela 2).

De acordo com Cassoli e Machado (2007), CCSIs entre 100.000 e 200.000 são consideradas normais, enquanto que escores superiores a 200.000 constituem um forte indício da mamite subclínica. Nos rebanhos nos quais se faz o monitoramento mensal pela CSSI, estes dados podem ser utilizados para aferir a eficiência do

programa de controle da mamite, bem como detectar animais cronicamente infectados.

Contagens de células somáticas no leite do tanque persistentemente elevadas são indicativas de alta taxa de mamite subclínica no rebanho, indicando falência das medidas de controle, sobretudo das mamites contagiosas (Schukken et al., 2003).

Tabela 2. Estimativas de prevalência de quartos infectados no rebanho e de perdas de produção em relação à CCSLT

CCSLT (1.000/mL)	% de quartos infectados no rebanho	% de perdas de produção
200	6	0
500	16	6
1.000	32	18
1.500	48	29

Fonte: Harmon (1994)

### 2.8-Perfil de sensibilidade de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos

A avaliação do perfil de resistência aos antimicrobianos por meio do antibiograma e do perfil plasmidial são alternativas para a realização de estudos populacionais. A resistência antibiótica é um fator importante no estabelecimento e disseminação de clones bacterianos em um rebanho, tendo estreita associação com mudanças no manejo, tais como a implementação de tratamento antibiótico sistemático, estabulação e a introdução de ordenhadeira mecânica, fatores que atuam como forças seletivas sobre patógenos causadores de mamite (Myllys et al., 1994).

No Brasil, vários experimentos têm sido realizados para se avaliar o perfil de sensibilidade antibiótica de amostras de *S. aureus* isolados de bovinos acometidos por IIM.

Nader Filho et al. (1984) submeteram ao antibiograma 37 amostras de *S. aureus* isoladas de IIM de bovinos em Ribeirão Preto/SP. Verificaram que gentamicina, amicacina, eritromicina e cefotaxima foram

as drogas mais eficientes e que os maiores índices de resistência ocorreram para oxacilina, penicilina, ácido nalidíxico e ampicilina.

Riedner et al. (1987) submeteram 187 amostras de *S. aureus* isoladas em Santa Maria/RS ao antibiograma e verificaram que gentamicina, cloranfenicol e sulfazotrim apresentaram os melhores resultados, enquanto penicilina e ampicilina foram as drogas menos efetivas. Por outro lado, Langoni et al. (1991), verificaram, ao submeterem 285 amostras de *S. aureus* isolados no município de Jaboticabal/SP a testes de antibiograma, que cefaloridina, gentamicina e cloranfenicol foram as drogas mais efetivas e que penicilina, ampicilina e sulfazotrim aquelas para as quais se verificaram as maiores taxas de resistência.

Em Minas Gerais, Cardoso et al. (2000), no período de 1994 a 1997, isolaram e submeteram ao antibiograma 127 amostras de *S. aureus* provenientes de 23 municípios. Os antibióticos mais efetivos foram cefotaxima (100%), enrofloxacina (98,4%), gentamicina (98,4%), rifampicina (96,1%), cloranfenicol (90,4%), sulfazotrim (86,6%) e novobiocina (85,8%). Polimixina B, ampicilina e penicilina G formam as drogas menos efetivas de acordo com os testes *in vitro*, com percentuais de sensibilidade de 8,7%, 28,6% e 29,1%, respectivamente.

Donatele et al. (2002) avaliaram o perfil de resistência a antimicrobianos de 180 amostras de *S. aureus* isoladas de mamite subclínica em rebanhos do estado do Rio de Janeiro, verificando elevados índices de resistência para os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (82,9%) e tetraciclina (24,4%). Os maiores índices de sensibilidade foram obtidos para sulfazotrim e gentamicina. Resultados divergentes foram relatados por Silveira-Filho et al. (2005) que verificaram índices de resistência superiores a 50% para gentamicina, lincomicina, tetraciclina e oxacilina em rebanhos leiteiros do estado de Pernambuco.

No que se refere à resistência antibiótica de amostras de *S. aureus* envolvidas na

etiologia da mamite bovina em rebanhos brasileiros, nota-se uma grande variação quanto à eficiência das diferentes drogas analisadas. No entanto, algumas tendências são percebidas, como susceptibilidade da maioria dos isolados de *S. aureus* à gentamicina, cefalosporinas e ao cloranfenicol, e a resistência à penicilina e ampicilina.

### **2.9-Fatores de virulência de *Staphylococcus aureus***

*S. aureus* produz vários fatores de virulência que incluem a proteína A, enzimas como a estafilocagulase, hialuronidase e termonuclease, hemolisinas, enterotoxinas e a toxina da síndrome do choque tóxico do tipo 1 (TSST-1), os quais contribuem para colonizar e lesionar o hospedeiro. A pesquisa desses fatores de virulência que geralmente atuam de forma combinada tem sido utilizada como recurso para a identificação de *S. aureus* de origem humana ou animal (Matsunaga et al.; 1993; Koneman et al., 2001).

Dentre estes diferentes fatores de virulência, as enterotoxinas e TSST-1 têm sido os mais estudados devido à implicação dos mesmos em processos patológicos nos seres humanos. As enterotoxinas estafilocócicas determinam, após período de incubação de uma a seis horas, sintomas como náuseas, vômitos, diarreia, dores abdominais, salivação intensa, cefaléia, sudorese e desidratação. TSST-1 está envolvida com a síndrome do choque tóxico em seres humanos, caracterizada por febre, hipotensão e falência múltipla de órgãos (Koneman et al., 2001).

As enterotoxinas estafilocócicas (SE) e TSST-1 pertencem à família de exotoxinas pirogênicas de estafilococos e estreptococos que exibem semelhanças estruturais, funcionais e genéticas. Estas toxinas estão envolvidas em quadros de

intoxicação alimentar, quadros alérgicos e doenças autoimunes (Balaban e Rasooly, 2000). Atualmente, são conhecidos 18 tipos de enterotoxinas estafilocócicas classificados com base em suas diferenças sorológicas em SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEM, SEO, SEP, SEQ, SER e SEU (Cunha, 2007).

Diversos pesquisadores (Takeuchi et al., 1998; Cardoso et al., 1999; Zecconi et al.; 2006; Haveri et al., 2007) têm tentado estabelecer uma ligação entre os quadros clínicos e patológicos decorrentes da mamite e a expressão de fatores de virulência de *S. aureus*, principalmente enterotoxinas e TSST-1. No entanto, os resultados obtidos demonstram a inexistência de um consenso acerca do papel destes fatores de virulência na patogenia das mamites estafilocócicas, o que demanda a realização de estudos mais detalhados sobre o tema.

A estafilocagulase é uma proteína extracelular produzida pela maioria das amostras de *S. aureus* que é usada como marcador fenotípico para a diferenciação de espécies do gênero. Esta proteína que possui ação enzimática reage com a protrombina, formando um complexo denominado estafilotrombina que reage com o fibrinogênio que é convertido em fibrina e coagula o plasma (Koneman et al., 2001). Embora a produção da enzima estafilocagulase seja indicativa de maior virulência do isolado de *Staphylococcus*, não existe um consenso sobre seu papel na patogênese das infecções intramamárias. Fox et al. (1996) relataram que variantes de *S. aureus* coagulase negativas apresentaram características epidemiológicas e clínicas semelhantes aos isolados convencionais de *S. aureus* coagulase positivos associados com a mamite bovina, induzindo altas CCSIs e infecções persistentes.



A estafilocagulase tem peso molecular de 63-77 kDa e contém entre 630 e 730 resíduos de aminoácidos, sendo codificada por um gene cromossômico que possui em torno de 3.000 pares de bases. A molécula possui três regiões distintas: a região N-terminal que é o sítio de ligação à protrombina, composta de 150 a 270 aminoácidos; uma região central, bastante conservada e a região C-terminal, bastante variável, onde são encontradas de 4-8 seqüências repetitivas de 27 aminoácidos (Kanemitsu et al., 2001; Watanabe et al.,

2005). A Figura 2 ilustra esquematicamente a estrutura do gene da estafilocagulase.

A amplificação da porção C-terminal e o corte posterior do produto amplificado por enzimas de restrição têm se mostrado bastante útil para identificação e diferenciação de amostras isoladas de IIM em bovinos, possibilitando a caracterização de populações de *S. aureus* em um determinado rebanho ou região (Hookey et al., 1998; Su et al., 2000; Silva e Silva, 2005).

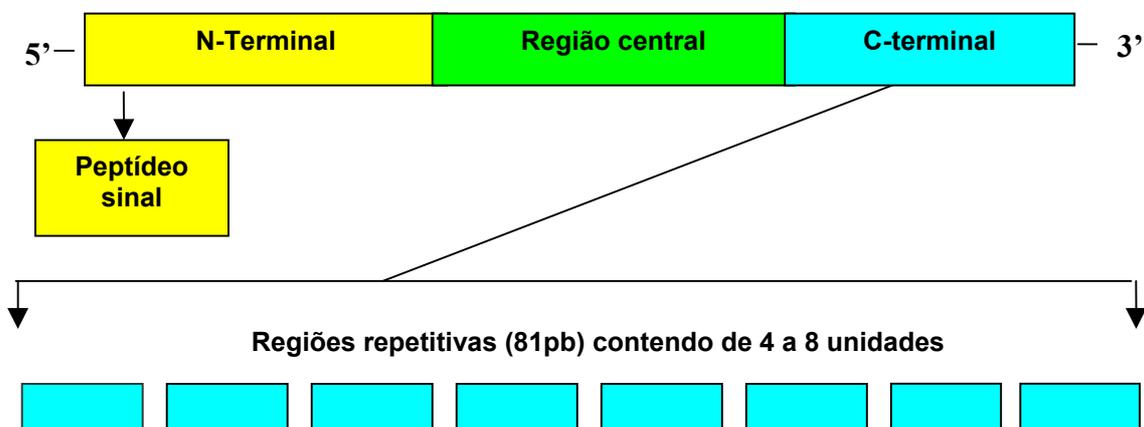


Figura 2. Estrutura esquemática do gene que codifica a enzima coagulase de *Staphylococcus aureus* (Adaptado de Kanemitsu et al., 2001)

### 2.10-Diversidade populacional de *Staphylococcus aureus*

A utilização de técnicas convencionais de bacteriologia na epidemiologia da mamite causada por *S. aureus* permitiu determinar o caráter contagioso do agente e que os quartos infectados e a pele do úbere e tetos dos animais são os principais reservatórios dessa bactéria (Branley e Dodd, 1984; Roberson et al., 1998). Medidas de controle centradas nesses conhecimentos possibilitaram a diminuição da incidência de IIM provocadas por *S. aureus*, porém, este microrganismo permanece como o agente mais prevalente nas IIM de bovinos. Tal fato demonstra a necessidade de outras formas de abordagem epidemiológica, visando à

realização de estudos mais detalhados sobre a diversidade populacional deste microrganismo.

A habilidade em discriminar uma determinada amostra ou biótipo de um microrganismo é fundamental para o estabelecimento de medidas efetivas para a prevenção e o controle da doença causada pelo mesmo. No entanto, a eleição de uma determinada técnica para estudos populacionais ou mesmo de diagnóstico depende de algumas características que devem ser criteriosamente avaliadas. Estas incluem a facilidade de execução, rapidez, repetibilidade, custo e o poder discriminatório (Cuenca, 2004).



Numerosas técnicas têm sido utilizadas para a diferenciação e comparação entre isolados de *S. aureus* em estudos epidemiológicos sobre a mamite bovina. Dentre estas técnicas, o estudo do polimorfismo da porção 3'-terminal do gene que codifica a coagulase têm se mostrado bastante útil para identificação e diferenciação de amostras isoladas de IIM de bovinos, possibilitando a caracterização da diversidade populacional e de filogenia de isolados de *S. aureus*.

Goh et al. (1992) utilizaram pela primeira vez a RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) para o estudo do polimorfismo do gene da coagulase para fins comparativos entre isolados de *S. aureus*, o que lhes permitiu determinar a origem de um clone resistente à metilicina que estava associado com um surto de infecção hospitalar no Canadá. Desde então diversos outros pesquisadores vêm adotando a técnica.

Raimundo et al. (1999) estudaram o polimorfismo do gene da coagulase em 151 amostras de *S. aureus* isoladas de sete rebanhos na Austrália. Verificaram a existência de clones dominantes na população estudada e que alguns deles estavam relacionados com infecções crônicas, persistindo durante longos períodos na glândula dos animais.

Su et al. (2000) aplicaram a técnica de RFLP ao estudo do polimorfismo do gene da coagulase em isolados de *S. aureus* associados a quadros de mamite em bovinos que eram provenientes de diversos países. Observaram a ocorrência de 41 variantes genéticas do agente, com o predomínio de certas variantes em determinados países.

Schlegelová et al. (2003), visando estudar a dinâmica de infecção por *S. aureus* na mamite bovina, aplicaram a técnica de RFLP ao gene da coagulase em isolados desse microrganismo obtidos de ordenhadores e de casos de mamite em bovinos. Foram obtidos 10 tipos polimórficos, não havendo correspondência

entre os tipos dominantes entre as duas espécies analisadas. Os resultados deste experimento endossaram aqueles obtidos preliminarmente por Kapur et al. (1995) e Larsen et al. (2000), que através de técnicas fenotípicas e genotípicas demonstraram que *S. aureus* isolados de seres humanos e de bovinos constituem duas populações diferentes e que infecções cruzadas ocorrem raramente.

No Brasil, foram realizados alguns estudos de diversidade populacional empregando a técnica de RFLP, aplicada ao gene da coagulase. Lange et al. (1999) submeteram 66 isolados de *S. aureus* provenientes de IIM de bovinos do Sul do Brasil a testes genotípicos, bioquímicos e de antibiograma, visando subtipá-los. Dentre os testes moleculares utilizados, PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*) apresentou o melhor índice discriminatório ( $D=0,96$ ), seguido de ribotipagem (0,85), RFLP aplicado ao gene da coagulase (0,82), testes bioquímicos (0,79), perfil plasmidial (0,78) e antibiograma (0,72). A tipagem bioquímica demonstrou ser uma técnica relativamente discriminatória, permitindo tipificar todos os isolados. Na técnica de antibiograma, 48,5% dos isolados foram sensíveis a todas as bases testadas, enquanto na determinação do perfil plasmidial se constatou que 46,9% das amostras não apresentavam plasmídios, o que diminuiu o índice discriminatório destes testes.

Silva e Silva (2005) aplicaram a técnica de RFLP no estudo comparativo entre 64 *S. aureus* isolados de bovinos leiteiros do estado de Minas Gerais. Verificaram a ocorrência de 27 padrões de amplicons na PCR (*polimerase chain reaction*) e de 49 tipos eletroforéticos na RFLP, demonstrando uma grande diversidade populacional entre as amostras estudadas.

Silveira-Filho et al. (2005), em estudo realizado no estado do Pernambuco, submeteram à PCR-RFLP 127 *S. aureus* isolados de quartos mamários acometidos pela mamite, mãos de ordenhador, equipamento de ordenha e pele de tetos dos animais, visando a estudos de

diversidade populacional. Verificaram a existência de poucos tipos clonais, a existência de clones predominantes nos rebanhos estudados e a similaridade entre amostras isoladas do equipamento de ordenha e aquelas obtidas de quartos acometidos pela mamite.

Além da PCR-RFLP aplicada ao gene da coagulase, vários outros métodos de tipagem têm sido utilizados no estudo das populações de *S. aureus* associado à IIM em bovinos. Os métodos mais tradicionais que incluem a biotipagem, fagotipagem, perfil plasmidial, antibiograma e o perfil de toxinas têm sido complementados por técnicas moleculares como a ribotipagem, PCR, PFGE, ribotipagem, RAPD (*randomly amplified polymorphic DNA*), seqüenciamento, MLEE (*multilocus enzyme electrophoresis*), dentre outras (Fitzgerald et al., 1997).

Lipman et al. (1996) aplicaram a técnica de RAPD e fagotipagem no estudo comparativo de 71 isolados de *S. aureus* envolvidos em um surto de mamite, em um rebanho na Holanda. Os autores observaram a ocorrência de clones dominantes que estavam associados a casos clínicos e subclínicos, com 66 dos 71 isolados pertencendo ao mesmo tipo genômico.

Annemüller et al. (1999) utilizaram testes de biotipagem, PFGE e a técnica de PCR-RFLP aplicada ao gene da coagulase para o estudo de amostras de *S. aureus* isoladas de casos de IIM em bovinos, na Alemanha. Verificaram que, embora vários clones estivessem presentes em determinados rebanhos, existiam clones predominantes, amplamente distribuídos, relacionados com a mamite subclínica. Resultados semelhantes foram obtidos por Fitzgerald et al. (1997) ao analisarem amostras dessa bactéria provenientes dos EUA e Irlanda, e por Buzzola et al. (2001) em amostras isoladas de bovinos na Argentina.

Larsen et al. (2000) aplicaram as técnicas de ribotipagem e de fagotipagem para o estudo da diversidade de *S. aureus* isolados de nove rebanhos leiteiros da Dinamarca, e compararam estes com outros isolados

obtidos de outros sítios da pele dos animais e dos ordenhadores. Com amostras dessa mesma bactéria isoladas de seres humanos portadores assintomáticos foram incluídas no estudo. Verificaram que certos subtipos eram predominantes e que havia grande identidade entre isolados obtidos de ferimentos de tetos e aqueles isolados a partir do leite de animais com mamite. Embora alguns subtipos predominantes em seres humanos tenham sido detectados em bovinos e vice-versa, o fenômeno se deu com pequena freqüência, demonstrando que seres humanos têm pouca importância como reservatórios de estafilococos para os bovinos.

Joo et al. (2001), visando analisar comparativamente 181 isolados de *S. aureus* provenientes de 28 rebanhos coreanos, submeteram os microrganismos ao teste de PFGE, verificando a ocorrência de 52 subtipos diferentes. Destes, 34 (65,4%) foram encontrados em um único rebanho, enquanto o restante foi detectado em múltiplos rebanhos. Mais que 85% dos rebanhos tinham mais de um subtipo, com 75% destes tendo três ou menos subtipos. Treze dos 24 rebanhos estudados que apresentavam mais de um subtipo tinham um subtipo predominante que foi isolado de cerca de 2/3 dos animais infectados do rebanho. Os resultados obtidos demonstraram a ocorrência de subtipos predominantes dentro dos rebanhos, mas não entre rebanhos.

Stephan et al. (2001) submeteram 34 amostras toxigênicas de *S. aureus* procedentes de 34 rebanhos suíços a testes fenotípicos e genotípicos visando analisá-las comparativamente. Encontraram 11 tipos eletroforéticos no PFGE, mas estritamente relacionados de acordo com as demais características avaliadas. A enterotoxina do tipo C (SEC) foi detectada em 26 amostras, sendo que 23 destas também expressavam TSST-1. Os resultados sugerem a existência de poucos clones amplamente disseminados responsáveis pela mamite bovina na Suíça.

O seqüenciamento do gene da coagulase ou de sua porção 3' terminal tem sido um

recurso utilizado para o estudo comparativo e de filogenia entre isolados de *S. aureus*. Watanabe et al. (2005) submetem ao seqüenciamento os genes que codificam para os dez tipos de estaficoagulase, verificando que o gene é composto de seis regiões distintas: a seqüência sinal; região D1; região D2; a região central, a região repetida e a seqüência C-terminal. A porção N-terminal que compreende o peptídeo sinal (26 aminoácidos) e os seis primeiros aminoácidos da região D1 que compõem o domínio de ativação da protrombina apresentaram 100% de similaridade. Verificaram que a região central é bastante conservada, com identidade de bases variando entre 80,6% e 94,1%. As unidades repetitivas, compostas por 81pb que codificam resíduos de 27 aminoácidos, apresentaram identidade média de 92% e polimorfismo no número de unidades repetitivas que variaram de cinco a oito.

Shopsin et al. (2000) estudaram as seqüências repetitivas do gene da estafiloagulase de 54 amostras de *S. aureus* metilina resistentes (MRSA) divergentes geográfica e temporalmente, visando avaliar a técnica como um recurso de tipagem. Relataram o encontro de três a seis unidades repetitivas e que a técnica, embora pudesse ser utilizada para estudos epidemiológicos de isolados temporalmente distantes, apresentou baixa capacidade em discriminar os isolados, sugerindo a necessidade de complementar os resultados da técnica com outros métodos de tipagem de maior poder discriminatório.

Kanemitsu et al. (2001) seqüenciaram e analisaram a região 3'-terminal do gene da coagulase de 22 isolados de *S. aureus*, dentre os quais foram incluídos dez isolados representando os sorotipos padrões da estafiloagulase. Na análise filogenética das seqüências de bases, amostras de um mesmo sorotipo foram agrupadas em um mesmo ramo da árvore filogenética, mas as seqüências de bases agruparam amostras de um mesmo sorotipo em ramos diferentes, o que indica que a porção estudada não possui os epítomos determinantes para o sorotipo. Os autores relataram a presença de quatro a oito unidades repetitivas nas

amostras estudadas e que a divergência na freqüência destas regiões pode se dever a deleções ou inserções.

Segundo Schwarzkopf e Karch (1994), a função das unidades repetitivas e as razões para sua variabilidade são desconhecidas, mas, pelo fato de se encontrarem fora do sítio ativo da enzima, as variações podem não trazer nenhuma alteração para virulência do microrganismo. Ainda de acordo com estes autores, regiões polimórficas também têm sido descritas para proteína A de *S. aureus* e proteínas M e G de estreptococos, antígenos relacionados com a adesão celular.

A aplicação de técnicas de biologia molecular, aliada às técnicas convencionais de bacteriologia, tem possibilitado novas abordagens na epidemiologia da mamite bovina. Por meio destes testes, tem sido demonstrado que os clones associados aos casos de mamite bovina, embora não sejam estritamente espécie-específicos, são característicos da espécie e que infecções intercruzadas, embora ocorram, não se revestem de maior importância epidemiológica. Os testes apontam ainda a ocorrência de uma grande diversidade populacional de *S. aureus*, com a existência de clones predominantes que são comuns entre rebanhos. A caracterização destes clones predominantes poderá fornecer subsídios para a adoção de medidas mais efetivas de prevenção e de controle de novas IIM.

#### **2.11-Medidas gerais de controle e de prevenção para a mamite bovina**

Um bom programa de controle para a mamite bovina tem por objetivo limitar a prevalência da doença em níveis economicamente aceitáveis, observando-se as particularidades de cada sistema. A metodologia de controle da doença vem evoluindo nos últimos anos, passando do tratamento preventivo ou curativo do indivíduo para o plano do rebanho, com a adoção de programas mais abrangentes, aplicados ao conjunto de rebanhos de uma região ou de um país (Bradley, 2002).

Os programas clássicos de controle de IIM, introduzidos há várias décadas em rebanhos americanos e europeus, são baseados na desinfecção de tetos antes e após a ordenha, no tratamento precoce de casos clínicos, na terapia de vacas secas, na higiene de ambiental e da ordenha, na manutenção periódica do equipamento de ordenha e no descarte de animais cronicamente infectados (Nickerson e Owens, 1993; Leblank et al., 2006). Segundo Leigh (1999), os avanços obtidos com a adoção destas medidas de controle foram significativos, tendo possibilitado a redução do número de casos de mamite de 150 casos/100 vacas/ano na década de 1960' para 35-40 casos/100 vacas/ano nos anos 1980' e o controle de infecções ocasionadas por *S. agalactiae* e *S. aureus*, no Reino Unido.

Apesar de todo o conhecimento acumulado, o progresso no controle da mamite nos rebanhos brasileiros tem sido lento porque, na maioria das propriedades, o programa de controle se fundamenta quase que exclusivamente no tratamento de animais clinicamente acometidos. Como resultado, os produtores têm tido pouco êxito no controle da doença, com a agravante do uso indiscriminado de antimicrobianos (Brito, 1996).

#### **2.11.1-Monitoramento regular do rebanho**

É imprescindível que seja feito registro sistemático dos índices zootécnicos de produção e dos casos de mamite, o que possibilita mensurar os prejuízos causados pela doença e avaliar a eficiência das medidas de controle implantadas. O registro individual deve ser o mais detalhado possível, contendo: nome do animal; data de nascimento; data do último parto; ordem de lactação; descrição do caso de mamite (aguda, subaguda, crônica ou subclínica) e quarto acometido; histórico de mamite anterior e a descrição do tratamento empregado, data de liberação do caso clínico, identificação dos agentes isolados e o resultado do antibiograma (Lopes e Viana, 1996).

Os índices de mamite subclínica podem ser determinados através da realização periódica do CMT, WMT ou pela CCSI. A periodicidade destes testes dependerá da gravidade da mamite no rebanho, mas, no geral, são feitos monitoramentos mensais. A mamite clínica deve ser detectada precocemente pela realização do teste Tamis para os casos subagudos, e pela observação de sinais inflamatórios na glândula mamária no caso de mamicas agudas. Em casos de surtos ou de má resposta aos tratamentos, realiza-se a coleta de amostras de leite, para proceder ao isolamento e identificação dos agentes envolvidos, com posterior realização do antibiograma (Lopes e Viana, 1996; Veiga, 1998).

#### **2.11.2-Tratamento de casos clínicos**

O tratamento da mamite clínica durante a lactação tem por objetivos eliminar a infecção e reintegrar o animal o mais breve possível à produção. O sucesso do tratamento dependerá de vários aspectos, dentre eles da precocidade com que é instaurado, da escolha adequada das drogas, da posologia adequada, da boa distribuição do mesmo dentro da glândula mamária, do estado fisiológico do animal e do microrganismo envolvido (Owens e Nickerson, 1989; Hillerton, 1996; Gruet et al., 2001; Erksine et al., 2003).

O tratamento de casos subclínicos é restrito a infecções subclínicas crônicas, geralmente ocasionadas por *S. aureus*, e infecções por *S. agalactiae* com alta morbidade no rebanho (mais que 25% dos animais infectados) (Langoni, 2007). Geralmente não se recomenda o tratamento de infecções subclínicas nas demais situações devido ao ônus decorrente do descarte de leite e de aquisição dos antibióticos (Erksine et al., 2003). A escolha do produto para o tratamento de vacas lactantes ou vacas secas deve ser fundamentada no perfil de sensibilidade do microrganismo aos antibióticos, uma vez que microrganismos de uma mesma espécie, mesmo dentro de um mesmo rebanho, podem ter perfis de sensibilidade diferentes (McKellar, 1991).

O tratamento deve ser o mais precoce possível, evitando-se a exacerbação dos sinais inflamatórios e das lesões do epitélio alveolar e de ductos galactóforos. Além da maior probabilidade de cura do animal acometido, o tratamento precoce da mamite é uma importante medida preventiva, diminuindo as chances de que a infecção se torne crônica e a taxa de eliminação do patógeno pelo animal acometido (Langoni et al., 2000).

Segundo McKellar (1991), a via intramamária é bastante prática para o tratamento quando não existe a obstrução dos ductos por pus. É também a via indicada para a terapia de vacas secas. Em geral, a utilização da via intramamária requer menor quantidade do medicamento e, dependendo das características físico-químicas da droga, a difusão da mesma é mais intensa em relação à via intramuscular.

O esquema clássico de tratamento de casos clínicos de animais em lactação consiste em se fazer a aplicação por via intramamária de antibióticos por um período de cerca de três dias, em intervalos de 12-24 horas. Casos clínicos mais graves, com reação inflamatória muito intensa, devem ser tratados por via sistêmica e local, inclusive com a utilização de anti-inflamatórios associados ao antibiótico (Brito e Brito, 1998). Segundo Erksine et al. (2003), antibióticos aplicados por via intramamária podem se difundir bem dentro da cisterna de glândula e em grandes ductos, e quando aplicados pela via intramuscular podem se difundir pelo parênquima secretor. Desse modo, a utilização das duas vias proporcionaria uma ação sinérgica, aumentando os índices de cura.

### 2.11.3-Tratamento de vacas secas

O tratamento de vacas secas tem por objetivos eliminar as infecções remanescentes da lactação anterior e prevenir novas infecções durante o período seco e início da próxima lactação (Erksine et al., 2003; Santos e Fonseca, 2007).

A taxa de novas infecções aumenta sensivelmente logo após a secagem e permanece elevada ao longo das três

primeiras semanas pós-parto. Nesta ocasião, a glândula mamária passa por alterações celulares, bioquímicas, imunológicas e metabólicas que a tornam mais susceptível a IIM (Erksine et al., 2003). Segundo Owens e Nickerson (1989), cerca de 40% das infecções se dão nas primeiras duas semanas após a secagem, e na ausência do tratamento de vacas secas, 10-15% dos quartos irão se tornar infectados nesse período.

Segundo Zeconi et al. (1995), o período seco é o momento ideal para se fazer o tratamento da mamite, pois o antibiótico permanece em alta concentração por longos períodos na glândula mamária dos animais em tratamento, possibilitando altas taxas de cura de infecções remanescentes da última lactação, ao mesmo tempo em que previne novas IIM. Outra vantagem é que o tratamento nessa ocasião não requer o descarte de leite devido à presença de antibióticos.

O tratamento de vacas secas tem possibilitado a redução do nível de novas infecções pelos patógenos contagiosos, especialmente por *S. agalactiae* e *S. aureus*, possibilitando duplicar o índice de cura bacteriológica para infecções por esta bactéria. Sears e McCarthy (2003) relataram que são obtidas taxas de cura para *S. aureus* da ordem de 40-70% quando o tratamento é realizado no período seco, enquanto as taxas de cura durante o período lactacional são da ordem de 20-30%. Bansal et al. (1993) observaram que a combinação de tratamento no período seco com o uso de anti-sepsia após a ordenha reduziu a prevalência de mamite subclínica em 65,72% e a taxa de IIM ocasionadas por *S. aureus* de 14,58% para 3,33% após um período de 11 meses de implantação das medidas.

A terapia seletiva de vacas secas é uma forma de diminuir os custos do tratamento de vacas secas, consistindo no tratamento seletivo dos animais que tiveram problemas de mamite clínica ou aqueles que apresentaram histórico de CCSI elevadas ao longo da lactação anterior. Segundo Browning et al. (1994), a terapia seletiva de

vacas secas é uma medida exequível quando se dispõe de métodos confiáveis e seguros para a identificação dos animais a serem tratados. Segundo estes autores, a CCSI realizada periodicamente é um bom parâmetro para estes casos, utilizando-se como limite a contagem de 250.000 células/mL.

#### 2.11.4-Limpeza e anti-sepsia de tetos

A limpeza e anti-sepsia de tetas previamente à ordenha constituem medidas essenciais para se evitar a entrada de patógenos no interior da glândula mamária, bem como para preservar as características microbiológicas e físico-químicas do leite ordenhado. A lavagem, no caso de tetas sujas de fezes ou barro, é importante para garantir a eficiência do anti-séptico, além de estimular a descida do leite. Quando as tetas ou úberes apresentam-se demasiadamente sujos, deve-se atentar para o manejo adequado de currais, camas, estábulos, piquetes e sombrites onde as vacas se deitam. A aplicação de métodos corretos de limpeza das tetas tem comprovado ser efetiva em reduzir o número de *S. aureus* na pele das tetas e em reduzir o número de novas infecções por este patógeno, no entanto, tem sido observado pouco efeito sobre as taxas de mamite ambiental (Hillerton, 1996).

Uma solução para desinfecção de tetos deve ter boa ação germicida e conservar sua atividade na presença de matéria orgânica; não deve ser irritativa, nem tóxica e auxiliar na cicatrização de lesões presentes na teta; não deve ser absorvida pelo tecido mamário e nem ser eliminada no leite (Boddie et al., 1997).

O principal objetivo da anti-sepsia pós-ordenha é eliminar os patógenos que contaminam o teto no momento da ordenha e entre as ordenhas, prevenindo a infecção do canal do teto e conseqüentemente do tecido secretor. O uso de um anti-séptico diminui a possibilidade de ocorrer IIM em ambas as situações (Costa, et al., 1999). Segundo Hillerton (1996), a desinfecção pós-ordenha reduz a população bacteriana da pele da teta em até mil vezes e eficiência da medida pode ser avaliada pelo nível de

infecção do rebanho pelo *C. bovis*. Costa et al. (1999b) avaliaram o efeito da anti-sepsia pós ordenha na taxa de infecção pelos principais agentes da mamite bovina, verificando que nos rebanhos onde se implementou a desinfecção de tetos no pós ordenha, houve substancial diminuição da infecção por patógenos contagiosos.

Os desinfetantes disponíveis comercialmente empregam uma variedade de ingredientes ativos, sendo os mais comuns o iodo, a clorexidina, os aldeídos, os compostos de cloro e de amônia quaternária (Langoni, 2007). Vários experimentos foram conduzidos com o intuito de avaliar e comparar a eficiência destes produtos. Drechsler et al. (1993) avaliaram a eficiência de cinco formulações diferentes contendo como anti-septico a clorexidina. Formulações contendo 0,5% e 1% de clorexidina se mostraram efetivas na redução de novas IIM ocasionadas por *S. aureus*, no entanto, apresentaram resultados insatisfatórios na prevenção de IIM por *S. agalactiae*. Boddie et al. (1997) demonstraram que soluções germicidas contendo 0,5% de clorexidina e 1,0% de iodophor foram efetivas na prevenção de IIM de bovinos causadas por *S. aureus* e *S. agalactiae*. Soluções contendo 0,5% de clorexidina reduziram as novas IIM por *S. aureus* em 73,2% e por *S. agalactiae* em 53,9%. Soluções a base de 1% de iodophor reduziram as IIM por estes mesmos agentes em 75,6% e 53,5%, respectivamente. Erskine et al. (1998) verificaram que soluções contendo 1% de iodophor foram mais efetivas na prevenção de IIM provocadas por *S. aureus* e *Streptococcus agalactiae* em relação ao álcool benzil.

A contaminação dos frascos aplicadores por matéria orgânica afeta a atividade dos anti-sépticos utilizados, diminuindo a eficiência deste produto, sendo que quanto maior a quantidade de matéria orgânica em contato com o produto menor a sua eficiência bactericida. Outro fator que pode interferir na eficiência da desinfecção pós-ordenha é a concentração do produto desinfetante, sendo que se deve observar a concentração recomendada pelo fabricante (Costa et al., 1999b).

### 2.11.5-Higiene da ordenha

O ordenhador é um dos principais elos dentro de um programa de controle da mamite e melhoria da qualidade do leite, pois dele depende a execução de todas as medidas que irão levar ao controle da doença. É fundamental que esta atividade seja executada por uma pessoa que possua bons hábitos higiênicos e que tenha boa escolaridade para que possa compreender e utilizar as técnicas preconizadas da forma mais acertada (Cerqueira e Sena, 1998). A participação dos ordenhadores no programa de controle da mamite deve ser estimulada através de treinamento, visando orientá-los quanto às regras básicas de funcionamento, lavagem e desinfecção de equipamentos, preparo dos animais para a ordenha e tratamento de casos clínicos de mamite (Lopes e Viana, 1996).

Além dos aspectos que envolvem o ordenhador, a higiene de ordenha compreende também a higiene dos animais, de instalações e de equipamentos utilizados na ordenha. A água é o componente mais importante nestas atividades, mas pode se constituir em fonte adicional de contaminação do leite e dos animais, caso não esteja dentro dos padrões microbiológicos e físico-químicos. As bactérias contaminantes mais comuns da água incluem coliformes, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Cytophaga*, *Micrococcus* e *Pseudomonas*, sendo provenientes do solo ou da própria água rica em matéria-orgânica (Ribeiro e Carvalho, 2001).

As características de dureza e alcalinidade da água podem influenciar na eficiência do processo de lavagem e sanitização do equipamento de ordenha. Em propriedades onde a água tem uma dureza muito elevada, é comum a formação de pedras de leite na tubulação e até nas unidades de ordenha, o que aumenta a população de microrganismos no equipamento, os quais podem vir a contaminar os animais no momento da ordenha e também a alterar a qualidade microbiológica do leite ordenhado. Água com dureza elevada requer maiores quantidades de sanitizantes

e de detergente ácido, aumentando o custo do processo de limpeza (Spencer, 2000; Santos e Fonseca, 2007).

A limpeza e a desinfecção dos equipamentos utilizados na ordenha são imprescindíveis para o controle de novas infecções durante a ordenha e para se preservar a qualidade do leite ordenhado. O leite é um produto rico em nutrientes e a presença de resíduos do mesmo nos equipamentos de ordenha pode se constituir em substrato para a multiplicação de bactérias que podem ser a principal fonte de contaminação do leite ou das tetas. Bactérias oportunistas ou patogênicas presentes nos tetos podem ser depositadas em partes mal higienizadas do equipamento de ordenha, contaminando o leite e infectando os animais durante a ordenha (Spencer, 2000).

Os resíduos que se acumulam nos equipamentos de ordenha podem ser orgânicos ou inorgânicos. Os primeiros são representados pelas gorduras, proteínas e carboidratos, enquanto os últimos são constituídos de sólidos minerais, formados pela deposição principalmente de cálcio, magnésio e íons de ferro. Os resíduos orgânicos são removidos com a ação dos detergentes alcalinos, enquanto os detergentes ácidos são indicados para a remoção dos resíduos inorgânicos (Ribeiro e Carvalho, 2001).

A limpeza dos equipamentos de ordenha envolve processos físicos e químicos. Os processos de remoção química consistem na emulsificação e saponificação das gorduras, degradação das proteínas e dissolução dos minerais. A escovação física se faz necessária para a remoção de biofilmes, por serem resíduos persistentes, incapazes de serem removidos unicamente pelo processo químico (Spencer, 2000).

A limpeza manual é indicada para equipamentos de ordenha balde ao pé, devendo ser realizada com o uso de detergentes, escovação e água. O processo de limpeza inicia-se pelo enxágüe que deve ser realizado imediatamente após o uso do equipamento, removendo a maioria dos sólidos do leite. A água deve ser potável e

na temperatura entre 35°C e 43°C. O uso de água fria no enxágüe solidifica a gordura, dificultando sua remoção, enquanto que o uso de água em temperaturas superiores às recomendadas ocasiona a desnaturação de proteínas que se precipitam e aderem no equipamento. Após o enxágüe, segue-se à escovação, usando-se água potável adicionada de detergente alcalino. Após esta etapa utiliza-se o detergente ácido que vai auxiliar na remoção dos minerais e do detergente alcalino. Após o enxágüe final, os equipamentos devem ser colocados em local que permita uma boa drenagem e sem riscos de contaminação (Spencer, 2000; Ribeiro e Carvalho, 2001).

Sistemas de ordenha mais sofisticados empregam a lavagem automática (*Clean-in-place*). As etapas são semelhantes aos da limpeza manual, exceto quanto às temperaturas envolvidas e os tipos de soluções utilizadas. Após a ordenha, realiza-se o primeiro estágio da limpeza ou pré enxágüe que consiste na passagem de água morna a temperatura de 38-40°C pela tubulação da ordenha sem que seja reaproveitada, permitindo assim, eliminar a maior parte dos componentes do leite que ficaram no equipamento. Realizado o enxágüe, o próximo passo é a lavagem com detergente alcalino clorado que vai remover proteínas e microrganismos presentes no equipamento. A eficiência desta etapa depende de diversos aspectos que incluem a temperatura da solução, tempo de circulação, contato da solução com superfícies, velocidade de fluxo da solução de limpeza, concentração da solução, volume da solução, capacidade de vácuo e drenagem. A ação mais efetiva dos detergentes alcalinos ocorre em temperaturas entre 70-77°C, o que requer que a temperatura da solução no início do processo seja próxima ao limite superior, para evitar que ao final da limpeza, esta temperatura da mesma não esteja abaixo de 43°C. A duração desta etapa deve ser de 15 a 20 minutos. Após a lavagem com detergente alcalino, realiza-se a limpeza do equipamento com o detergente ácido, ácido nítrico ou sulfanílico, à temperatura de 38 a 70°C por cinco a 15 minutos. A frequência de uso do detergente ácido vai depender da

dureza da água utilizada na limpeza. O equipamento não deve ser enxaguado após a desinfecção, o que deve ser realizado antes da próxima ordenha (Spencer, 2000).

A lavagem de unidades de ordenha entre vacas tem sido preconizada como medida de controle de infecções por patógenos contagiosos (McDonald et al., 1993; Langoni, 2007). Contudo, na prática, se o equipamento não for secado após a lavagem das unidades de ordenha entre vacas, a medida pode trazer prejuízos que benéficos, uma vez que a prática aumenta o tempo de ordenha e, no caso de equipamento molhado, pode levar a queda de unidades durante a ordenha, o que ocasiona gradientes de pressão reversos que aumentam os riscos de novas infecções.

#### 2.11.6-Higiene ambiental

É de suma importância que se tenham instalações e ambientes onde os animais permanecem limpos e higienizados, a fim de diminuir a possibilidade de contaminação da glândula mamária. Piquetes destinados às vacas secas, bem como aqueles onde são mantidas as vacas lactantes no intervalo entre ordenhas, não devem conter excesso de lama e ou de material orgânico (Langoni, 2007).

O material de camas é considerado uma fonte importante de microrganismos envolvidos nas IIM, sobretudo no que se refere aos agentes ambientais, principalmente quando estas são compostas de material orgânico e não têm o manejo adequado (Nickerson, 1995). Segundo Hillerton (1996), existem grandes diferenças nas populações de patógenos presentes entre camas de areia, palha e serragem. O uso de camas de palha mal manejadas tem uma estreita associação com infecções por *S. uberis*.

Uma boa higiene ambiental reduz a população de moscas, o que se constitui em importante medida de prevenção para

sendo relacionadas como vetores de importantes agentes da doença, incluindo *S. agalactiae*, *Arcanobacterium pyogenes*, *S.*

*aureus*, dentre outros (Yeruham et al., 1996; Chirico et al., 1997; Owens et al., 1998).

É importante evitar que os animais se deitem no período imediatamente após a ordenha. Nessa ocasião, o esfíncter não está totalmente fechado, favorecendo a penetração de patógenos na glândula mamária. Para tal, eles devem receber algum alimento logo após a ordenha, devendo permanecer de pé pelo menos durante as duas primeiras horas pós-ordenha (Lopes e Viana, 1996; Langoni, 2007).

#### **2.11.7-Utilização da linha de ordenha**

Tem sido demonstrado que em rebanhos infectados por patógenos contagiosos tais como *S. aureus*, após a ordenha de um animal infectado, a unidade de ordenha se constitui em veículo para a infecção de cerca de seis outros animais que vierem a ser ordenhados a seguir (Myllys et al., 1994). Este fato endossa a necessidade de se implantar uma linha de ordenha, visando diminuir o número de novas infecções ocasionadas por patógenos contagiosos.

A linha de ordenha consiste em ordenhar primeiro as vacas primíparas, geralmente são as que apresentam as menores taxas de infecção, ordenhando-se a seguir as vacas múltiparas sadias, seguidas pelas vacas com histórico recente de mamite clínica (Santos e Fonseca, 2007). Na prática, a implantação dessa medida gera muito transtorno tendo em vista a necessidade de se dispor os animais em lotes de acordo com a produção, para fins de lhes fornecer a dieta adequada às suas exigências nutricionais. O que tem sido feito para contornar o problema em grandes rebanhos, é a implantação da linha de ordenha baseada nos dados da CCSI mensal dentro dos lotes de produção, sendo que a cada lote ordenhado o equipamento passa por uma lavagem e desinfecção.

#### **2.11.8-Descarte de animais cronicamente infectados**

Segundo Myllys et al. (1994), as ações destinadas a diminuir a prevalência da mamite têm sido centradas na adoção de

medidas preventivas e no tratamento ou descarte de animais cronicamente infectados.

O descarte de animais cronicamente infectados deve fazer parte do programa de controle da mamite em qualquer rebanho. A adoção desta medida conduz rapidamente a uma redução na taxa de mamite clínica, permitindo também reduzir a CCSLT do rebanho, já que vacas cronicamente infectadas contribuem com 10-12% da CCSLT (Hillerton, 1996). Além disso, segundo Nickerson (1993), 40% dos casos de mamite de um rebanho se manifestam em cerca de 7% das vacas e cerca de 50% do leite descartado em função de tratamento antibiótico é proveniente de vacas cronicamente infectadas. Estes dados demonstram a importância que os animais cronicamente infectados têm como reservatórios de patógenos no rebanho e nas alterações na qualidade do leite, principalmente no que se refere às contagens de células somáticas. Desse modo, a identificação e pronta eliminação deste tipo de animal do rebanho constituem importantes medidas de controle, visando diminuir as novas infecções, bem como para garantir uma boa qualidade do leite produzido.

Uma alternativa de manejo para animais cronicamente infectados é a segregação, contudo, não existe um consenso na literatura sobre a eficiência desta medida na redução da taxa de novas infecções no rebanho. Fox e Hancock (1989) avaliaram o efeito da segregação de vacas com infectadas por *S. aureus* na incidência de IIM provocadas por este mesmo agente no rebanho. Observaram que nos rebanhos onde se implantou a segregação houve diminuição na incidência de IIM ocasionadas por *S. aureus* (3,7%), em relação àqueles onde a segregação não foi realizada (4,3%), embora as diferenças não tenham sido significativas sob o ponto de vista estatístico.

Wilson et al. (1995), visando diminuir as novas infecções e as CCSLTs, promoveram a segregação e a utilização de unidades de ordenha separadas para vacas de 76

rebanhos que se encontravam acometidas por *S. aureus*. Após um período de seis a 24 meses, verificaram que o percentual de vacas infectadas caiu de 29,5% para 16,3% e que as CCSLTs foram reduzidas de 600.000 para 345.000 cél./mL no grupo onde houve a segregação e utilização de unidades de ordenha separadas para as vacas infectadas. Entretanto, Nickerson (1993) observou que a separação entre vacas não infectadas de vacas infectadas por *S. aureus* não resultou na diminuição representativa, sob o ponto de vista estatístico, de novas IIM por esse mesmo agente no grupo negativo, em relação ao grupo infectado; embora tivesse adotado boas práticas de higiene durante a ordenha, incluindo a lavagem de unidades de ordenha entre vacas (*backflushing*) e desinfecção de tetos, além da manutenção da ordenhadeira e do tratamento no período seco.

Apesar do ônus relacionado com as avaliações bacteriológicas periódicas e as alterações de manejo requeridas, os resultados dos experimentos relatados demonstram que a identificação de animais infectados e sua segregação e ou utilização de unidades de ordenha separadas constituem medidas que podem auxiliar na redução de novas infecções ocasionadas por patógenos contagiosos.

#### **2.11.9-Manutenção e uso correto da ordenhadeira**

O equipamento de ordenha mecânica é imprescindível em rebanhos de produção intensiva, contudo a transição da ordenha manual para a mecanizada favoreceu sobremaneira as IIM provocadas por patógenos contagiosos. Segundo Myllys et al. (1994), o funcionamento inadequado do equipamento pode determinar a infecção de até seis vacas que venham a ser ordenhadas após a ordenha de um animal infectado por *S. aureus*.

Vacas ordenhadas mecanicamente tendem a apresentar índices mais elevados de mamite subclínica em relação a vacas ordenhadas manualmente em decorrências

de falhas na higienização e manutenção dos equipamentos de ordenha. As falhas mais importantes em relação ao funcionamento do equipamento de ordenha são a baixa reserva de vácuo, flutuações de vácuo, pressão de vácuo elevada e o funcionamento irregular dos pulsadores (Langlois et al., 1981). Osteras et al. (1995) realizaram estudo de campo na Noruega entre os anos de 1989 e 1991 acerca do funcionamento de pulsadores de equipamentos de ordenha e sanidade de úbere. Observaram que estes componentes quando desregulados determinavam elevada CCSLT e índices mais elevados de mamite clínica.

O canal do teto possui mecanismos contra a penetração de bactérias. Estes incluem o esfíncter, um mecanismo de oclusão relativamente eficiente, e a camada de queratina que constitui uma barreira física e química contra a invasão de bactérias (Hillerton, 1996). Segundo Costa (1998), o mau funcionamento e utilização da ordenhadeira mecânica, principalmente no que diz respeito à pressão excessiva e flutuações de vácuo, afetam a integridade do esfíncter e da camada de queratina, propiciando o aumento da ocorrência de novas infecções. Tal fato foi comprovado por Capuco et al. (1992) que demonstraram experimentalmente que animais que tinham a queratina dos tetos removida mecanicamente se tornavam mais susceptíveis à IIM por *S. agalactiae* após infecção experimental.

A revisão periódica do equipamento de ordenha permite detectar e sanar oportunamente falhas que possam prejudicar seu funcionamento, eliminando assim uma das principais causas de mamite e de alterações na qualidade do leite. Segundo Santos e Fonseca (2007), a checagem do equipamento de ordenha deve incluir a relação de pulsação, taxa de pulsação, pressão no manômetro central e nas unidades de ordenha, condições de higiene geral antes de iniciar a ordenha, condições gerais das borrachas, sobretudo daquelas que entram em contato com o leite, e a capacidade de reserva de vácuo.

## ESTUDO I

### AGENTES ETIOLÓGICOS, CONTAGENS DE CÉLULAS SOMÁTICAS E ÍNDICES DE MAMITE EM REBANHOS LEITEIROS DA REGIÃO SUL DO ESTADO DE MINAS GERAIS, BRASIL

#### RESUMO

Foram estudados aspectos etiológicos e epidemiológicos da mamite em 35 rebanhos localizados na bacia leiteira da região sul do estado de Minas Gerais. Nestes rebanhos, foram realizados testes para o diagnóstico da mamite clínica e subclínica e coletadas amostras de leite para a realização de isolamento de microrganismos e a avaliação da contagem de células somáticas no leite do tanque (CCSLT). Foram determinados os índices de mamite clínica e subclínica, a participação dos diferentes microrganismos identificados na gênese dos casos clínicos e subclínicos e as estimativas de perdas de produção leiteira em função dos escores de CCSLT. Altas contagens de células somáticas, associadas com altos índices de mamite clínica e subclínica, foram observadas na maioria dos rebanhos estudados. Verificou-se a predominância da mamite contagiosa, tendo como principais agentes *Staphylococcus* coagulase positivos, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* e *Staphylococcus* coagulase negativos. *Streptococcus uberis* e bactérias gram-negativas foram os principais patógenos ambientais isolados. A maioria dos microrganismos isolados tendeu a causar eventos de mamite subclínica, embora agentes ambientais tenham apresentado maior participação nos casos clínicos em relação aos agentes contagiosos. Verificou-se que *S. agalactiae* teve participação nos casos clínicos em níveis semelhantes àqueles observados para os agentes ambientais. Níveis elevados de perdas foram estimados, sobretudo nos rebanhos onde os índices de mamite subclínica foram mais expressivos. Os resultados obtidos demonstraram a alta incidência de mamite nos rebanhos estudados, o que traz reflexos diretos na qualidade do leite produzido e na

produtividade dos mesmos, evidenciando a necessidade de maiores esforços por parte de todos os segmentos envolvidos na cadeia produtiva do leite com o intuito de se controlar de forma mais eficiente a doença.

Palavras-chave: mamite bovina, perdas, etiologia, epidemiologia, Brasil

#### ABSTRACT

Thirty-five dairy herds located in the southern region of Minas Gerais state were submitted to tests for diagnosis of clinical and subclinical mastitis. Samples of positive cases were collected for isolation of microorganisms and bulk milk samples for evaluation of the somatic cell counts (BMSCC). The rates of clinical and subclinical mastitis, the participation of isolated microorganisms in clinical and subclinical cases and the estimative of loss of milk production relative to the BMSCC scores were performed. Elevated BMSCC were observed in most studied herds, correlated with the high rates of clinical and subclinical mastitis. There was a predominance of contagious mastitis, occasionated by coagulase positive *Staphylococcus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* and coagulase negative *Staphylococcus*. *Streptococcus uberis* and coliforms were the main environmental isolated agents. One found out that all the species of microorganisms isolated tended to cause subclinical events of mastitis, although environmental agents, represented by Gram-negative bacteria and *Streptococcus uberis*, have had greater participation in clinical cases in relation to contagious agents. There was an expressive participation of *S. agalactiae* in clinical infections, at similar levels to those observed for environmental agents. Environmental microorganisms and *Streptococcus*

*agalactiae* had higher risk to cause clinical cases than other isolated pathogens. High levels of milk production losses were estimated, particularly in herds where the rates of subclinical mastitis were more expressive. The results showed a high incidence of clinical and subclinical mastitis in studied herds, which directly reflects in the quality of produced milk and productivity of herds, highlighting the need for greater efforts by all sectors involved in the production chain of milk in order to more efficiently control the disease.

Key words: bovine mastitis, etiology, epidemiology, Brazil

## I. INTRODUÇÃO

A mamite é a enfermidade infecciosa mais prevalente e economicamente relevante de bovinos leiteiros em todo o mundo (Vintov et al., 2003). Segundo Bradley (2002) as perdas ocasionadas por esta doença na indústria leiteira mundial são estimadas em 35 bilhões de dólares anuais. De Graves e Fetrow (1993) relataram perdas de US\$35 a US\$295 por vaca/ano, com custos totais estimados em dois bilhões de dólares anuais, em rebanhos dos EUA. No Brasil, Costa (1998) estimou que as perdas decorrentes da doença eram da ordem de 10-15% da produção total no rebanho nacional, o que representava cerca de dois a três bilhões de litros por ano, enquanto Costa et al. (1999) estimaram as perdas ocasionadas pela mamite subclínica em US\$ 317.38 por vaca/ano, em rebanhos leiteiros de São Paulo e de Minas Gerais.

Fernandes (1992) relatou o envolvimento de 137 espécies, subespécies e sorovariedades de microrganismos na etiologia da mamite bovina, representados por vírus, algas, fungos, micoplasmas, parasitos e, principalmente, por bactérias. Estes diferentes agentes etiológicos podem ser classificados como contagiosos ou ambientais, de acordo com o local de infecção. O primeiro grupo inclui *Staphylococcus* spp., *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* *Mycoplasma* spp., *Corynebacterium bovis*,

para os quais a transmissão geralmente se dá durante as atividades de ordenha. No grupo dos agentes ambientais, se inserem os coliformes, *Pseudomonas* spp., *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus* spp. e microrganismos ubiqüitários tais como as leveduras e algas aclorofiladas do gênero *Prothoteca* sp., cujas transmissões geralmente se dão no intervalo entre ordenhas e têm no ambiente o local de manutenção (Brito e Brito, 1998; Costa,1998; Bradley, 2002).

Segundo Ranjan et al. (2006), embora diversos agentes possam estar envolvidos na etiologia da mamite bovina, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e coliformes são os patógenos mais comumente envolvidos no processo, responsáveis por aproximadamente 80% de todas as infecções intramamárias.

Quanto à intensidade do processo inflamatório, a mamite pode ser classificada em clínica ou subclínica. Estas diferentes formas de apresentação dependem da interação entre os fatores de patogenicidade do microrganismo envolvido e os mecanismos de defesa do hospedeiro (Costa,1998). Agentes contagiosos como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* geralmente estão associados com a mamite subclínica, enquanto os ambientais, como os coliformes e *Streptococcus uberis*, tendem a ter uma participação maior nos eventos clínicos (Hillerton et al., 1993; Fang e Pyorala, 1996; Santos e Fonseca, 2007).

Sob o ponto de vista econômico, a mamite subclínica é forma de maior expressão econômica devido ao número geralmente elevado de animais que acomete no rebanho, por causar redução expressiva na produção dos quartos acometidos e alterações físico-químicas que depreciam a qualidade do leite (Brito e Brito, 1998; Santos e Fonseca, 2007).

A CCSLT é um indicador da qualidade do leite que se correlaciona com o nível de

mamite subclínica presente no rebanho, sendo utilizada como parâmetro para a avaliação de perdas de produção (Harmon, 1994), constituindo-se em ferramenta imprescindível para a mensuração dos prejuízos ocasionados pela doença e para a avaliação da eficiência das medidas adotadas para o seu controle.

A determinação dos índices de mamite em uma determinada bacia leiteira e dos agentes envolvidos em sua etiologia é imprescindível para a elaboração de estratégias que possam ser aplicadas coletivamente, visando o controle mais efetivo da doença. Desse modo, o objetivo do trabalho foi estudar alguns aspectos epidemiológicos da mamite bovina em rebanhos da bacia leiteira do sul de Minas Gerais, enfocando os índices de mamite clínica e subclínica, os agentes etiológicos envolvidos e a participação dos mesmos na ocorrência dos casos clínicos e subclínicos, os reflexos da doença sobre as contagens de células somáticas no leite do tanque e na produtividade do rebanho.

## II. MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de Março de 2004 a Dezembro de 2006, foram estudados aspectos etiológicos e epidemiológicos da mamite 35 rebanhos leiteiros localizados nos municípios de Boa Esperança, Bom Sucesso, Carrancas, Cruzília, Ijací, Ingaí, Itumirim, Itutinga, Jesuânia, Lavras, Nazareno, Nepomuceno, Perdões, Oliveira, Ribeirão Vermelho, Santa Rita do Sapucaí, Santana da Vargem, Santana do Jacaré, Santo Antônio do Amparo e Três Corações, pertencentes à bacia leiteira da região sul do estado de Minas Gerais. Estabeleceu-se que os rebanhos a serem utilizados deveriam empregar a ordenha mecânica, ter número mínimo de 30 animais em lactação e que o número mínimo de amostras a ser processado para cada rebanho seria de 15.

Nestes rebanhos, 2.492 vacas foram submetidas ao teste da caneca de fundo escuro (Teste Tamis) e ao CMT, visando o diagnóstico da mamite clínica e subclínica, respectivamente. A execução e a

interpretação dos testes, a obtenção dos índices de mamite e os procedimentos para a coleta de amostras destinadas às análises microbiológicas seguiram as orientações de Veiga (1998).

A CCSLT foi efetuada eletronicamente por citometria de fluxo (Somacount 500-Bentley-USA), no Laboratório de Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG, em amostras de leite coletadas do tanque de expansão ou latões e conservadas em bronopol.

Amostras de leite de 1.645 quartos mamários, sendo 238 oriundas de casos clínicos e as demais de casos subclínicos, foram coletadas assepticamente e submetidas a análises microbiológicas. Estas foram pré-incubadas a 37°C por 8-12 horas, seguindo-se à semeadura em Ágar Sangue (ágar sangue base Oxoid®, contendo 10% de sangue desfibrinado de carneiro) e incubadas em temperatura de 37°C por 24-48 horas. O isolamento de fungos e algas foi feito em Ágar Sabouraud Dextrose (Oxoid®), contendo 0,4g/L de cloranfenicol (Choranphenicol succinate-Sigma®), após incubação a 37°C por 24-96 horas.

Microrganismos das famílias Staphylococcaceae e Streptococcaceae foram identificados segundo Holt et al. (1994) e Quinn et al. (1994). *Staphylococcus* spp. foram classificados em coagulase positivos (SCP) ou coagulase negativos (SCN) de acordo com o resultado na prova de coagulase, empregando-se o plasma de coelho. Entre os SCP, foram selecionadas ao acaso e proporcionalmente entre os rebanhos 360 amostras que foram submetidas a testes fenotípicos adicionais, visando à diferenciação das espécies. Estes testes foram baseados na chave de identificação proposta por Holt et al. (1994), constando de produção de hemólise em ágar sangue (ágar sangue base, contendo 10% de sangue desfibrinado de carneiro), fermentação dos açúcares trealose, manitol e maltose e produção de acetoina.

Bactérias gram-negativas (BGN) oxidase negativas foram identificadas utilizando-se

os kits BACTRAY® I e II (Laborclin, Brasil); os BGN oxidase-positivas foram identificados por meio dos kits BACTRAY® III (Laborclin, Brasil) e API 20NE® (Biomérieux, França).

Leveduras e algas foram isoladas e caracterizadas fenotipicamente, segundo Kurtzman e Fell (1998) e Yarrow (1998).

A identificação dos demais agentes isolados foi feita de acordo com Quinn et al. (1994).

As estimativas de queda de produção foram obtidas considerando-se a produção média diária e a CCSLT de cada rebanho, utilizando-se a equação “ $Y=(0,0226 \times \text{CCSLT}/1.000) - 4,7908$ ”, adaptada do trabalho de Harmon (1984). Onde “Y” representa a estimativa de perdas, em percentual, da produção.

A participação dos diferentes agentes isolados nos casos clínicos ou subclínicos foi comparada através da Odds Ratio (OR) e do teste do Qui-quadrado, utilizando o Programa Epi-Info (CDC-WHO, versão 6.04b, 1997).

Foram avaliadas as correlações entre os principais patógenos isolados (SCP, SCN, *C. bovis*, *S. agalactiae*, *S. uberis*, BGN e leveduras) e os índices de mamite clínica e subclínica e a CCSLT. Também foram analisadas as correlações dos patógenos entre si, e entre os índices de mamite clínica e subclínica entre si e com a CCSLT.

Para a análise de correlação entre os parâmetros avaliados, foi utilizado o programa Data Analysis Comparative Statistics Software (SPSS 12.0), considerando-se o nível de significância de 0,05.

### III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 1. Microrganismos isolados

Dentre as 1.645 amostras de leite submetidas a análises microbiológicas, 14 foram descartadas por apresentarem crescimento de três ou mais microrganismos

diferentes, o que é indicativo de contaminação na coleta de acordo com Brito et al. (1999). Outras 122 (7,48%) amostras não apresentaram crescimento de microrganismos. Amostras com crescimento de um único tipo de microrganismo totalizaram 1.314 (80,56%) e as demais 195 (11,95%) apresentaram crescimento misto. Dentre os quartos mamários examinados, 9.560 encontravam-se funcionais e 408 afuncionais.

A Tabela 1 relaciona os agentes etiológicos identificados e a frequência relativa dos mesmos. Foram isolados 1.700 microrganismos, sendo os agentes contagiosos, com 1.314 amostras, os predominantes em todas as 35 propriedades estudadas, perfazendo 77,29% dos isolamentos. Levantamentos realizados em diversas regiões do Brasil apontaram a mamite contagiosa como a mais freqüente em nosso país, tendo como agentes principais *S. aureus* (30-83%), *Streptococcus* spp. (3-60%), *Corynebacterium bovis* (1,3-30%) e *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN) (16-25%) (Silva et al., 1983; Nader Filho et al., 1984; Costa et al., 1995; Langoni et al., 1991; Brito et al., 1999; Barbalho e Mota, 2001; Laffranchi et al., 2001).

*Staphylococcus* coagulase positivos, com 583 isolados, foram os agentes predominantes, representando 34,29% dos isolados, sendo encontrados em 34 (97,14%) das propriedades. *S. agalactiae* foi o segundo microrganismo mais freqüente, com 21,92% dos isolamentos e presente em 65,71% dos rebanhos avaliados. *S. agalactiae* e SCP representaram 56,11% dos isolamentos, o que demonstra a grande relevância destes agentes na etiologia da mamite nos rebanhos estudados, em concordância com estudos realizados em outras regiões brasileiras (Nader Filho et al., 1984; Langoni et al., 1998; Brant e Figueiredo, 1994; Costa et al., 1995; Brito et al., 1999; Mota et al., 2004).

Observou-se a presença de correlações positivas entre as taxas de isolamento de SCP e *S. agalactiae* ( $r=0,359$ ), o que demonstra a existência de determinantes

epidemiológicos comuns que propiciam à coexistência de ambos os agentes nos rebanhos. Existe um consenso na literatura de que estes são agentes contagiosos típicos, cujas transmissões de dão durante predominantemente no momento da ordenha, facilitadas por falhas nas medidas básicas de controle da mamite, conforme se observou na maioria dos rebanhos estudados (dados não mostrados).

Entre as 360 amostras de SCP que foram submetidas a testes fenotípicos adicionais, 352 (97,77%) foram identificadas como *S. aureus*. Quatro isolados foram identificados como *S. hyicus* e três como *S. intermedius*. Uma amostra SCP não pôde ser identificada pelos testes utilizados. De acordo com os resultados, é pequena a participação de outras espécies de SCP que não seja *S. aureus* na etiologia da mamite bovina, nos rebanhos estudados. Resultados semelhantes foram obtidos por Capurro et al. (1999) que verificaram, através de testes fenotípicos, que de 177 amostras de SCP isoladas a partir de infecções intramamárias (IIM) de bovinos em rebanhos da Suíça, 97% se tratavam de *S. aureus*, 2% de *S. intermedius* e 1% de *S. hyicus*.

Segundo Schlegelová et al. (2003), *S. aureus* destaca-se como um dos microrganismos mais freqüentes dentre os envolvidos na etiologia das infecções intramamárias (IIM) de bovinos e aquele que isoladamente determina as maiores perdas na pecuária leiteira em todos os continentes. No Brasil, trabalhos anteriores apontaram a grande relevância de *S. aureus* na etiologia da mamite bovina (Silva et al., 1983; Brant e Figueiredo, 1994; Costa et al., 1995; Brito et al. 1999; Mota et al., 2004).

*S. agalactiae*, o segundo patógeno mais freqüente (21,82%), predominou em oito das propriedades estudadas (22,85%), nas quais as freqüências de isolamento variaram entre 27,08% a 74,35%. Foi também o principal agente envolvido nos casos clínicos em 31,41% dos rebanhos estudados. Relatos sobre freqüência de isolamentos de *S. agalactiae*, em outras bacias leiteiras, apontaram grandes variações entre rebanhos (3,2 a 60%)

(Ferreiro et al., 1981, Langoni et al, 1991; Brito et al., 1999). Em rebanhos leiteiros dos EUA e do Canadá, a prevalência das infecções por *S. agalactiae* situa-se entre 40% e 47% (Keefe, 1997). Segundo Duarte et al. (2004), as taxas de infecção por esta bactéria são variáveis, verificando-se as maiores morbidades em rebanhos nos quais as medidas de controle da mamite têm sido negligenciadas.

As IIM ocasionadas por *S. agalactiae* estão associadas geralmente com elevadas CCSLT e contagem bacteriana total (CBT) e decréscimo na quantidade e na qualidade do leite produzido pelo animal/rebanho infectado (Keefe, 1997; Merl et al., 2003). Costa et al. (2005), ao estudarem comparativamente glândulas infectadas pelos patógenos contagiosos, observaram que aquelas infectadas por *Streptococcus* spp. geralmente apresentavam CBTs e CCSLTs superiores àquelas infectadas por SCP, SCN ou *C. bovis*. Neste trabalho, as CCSLT e os índices de mamite subclínica foram mais elevados nos rebanhos onde predominavam as infecções por *S. agalactiae* ( $P < 0,01$ ).

Verificou-se o isolamento de *C. bovis* em 91,42% das propriedades e 14,11% das amostras de leite analisadas, com taxas de isolamento que variaram de zero a 59,25%, e o envolvimento predominantemente nos caso subclínicos (91,67%). Em oito rebanhos, ele foi o principal agente encontrado, representando entre 22,22% a 59,25% dos microrganismos isolados. Diferentes autores relataram que o *C. bovis* é um patógeno responsável por altas taxas de infecção subclínica em rebanhos leiteiros nacionais (Langoni et al., 1991; Costa et al., 1995; Brito et al., 1999; Mota et al. 2004, Costa et al., 2005), sendo isolado com maior freqüência em rebanhos nos quais ocorrem falhas na anti-sepsia de tetos após ordenha (Watts et al., 2000).

Infecções por SCN foram observadas em 85,71% das propriedades, com uma taxa média de isolamentos de 7,05%. A freqüência de isolamentos foi geralmente baixa para a maioria dos rebanhos, exceção para os de números 9 e 33, nos quais se

verificaram taxas entre 25,71% e 22,91%, respectivamente. Nesses rebanhos, os animais eram mantidos em regime de confinamento total, com rigoroso controle da higiene de ordenha, e apresentavam sérios problemas com relação ao manejo de camas. Verificou-se que as taxas de isolamento de SCN nestes rebanhos foram superiores às de SCP e que a participação de agentes ambientais na etiologia da mamite foi mais expressiva. Estudos recentes mostram a importância dos SCN na etiologia das IIM, sobretudo para primíparas, e em rebanhos nos quais as infecções por *S. aureus* e *S. agalactiae* foram controladas (Silva, 1999; Laffranchi et al., 2001; Sears e McCarthy, 2003).

Agentes ambientais, totalizando 312 microrganismos, representaram 18,35% dos isolamentos. *Streptococcus uberis* com 111 amostras distribuídas entre 85,71% das propriedades foi o agente predominante neste grupo. Enterobactérias representadas, principalmente pelos coliformes, como a *E. coli*, *Enterobacter* spp. e *Klebsiella* spp. compuseram o segundo grupo mais freqüente entre os agentes ambientais, seguido por leveduras e *Pseudomonas* spp. *Escherichia coli* predominou entre as enterobactérias, perfazendo 59,67% dos isolados. Coliformes e *S. uberis* tem sido os principais patógenos ambientais envolvidos nas infecções intramamárias (IIM), com taxas de isolamento variáveis entre 5 e 26% (Silva et al., 1983; Hillerton et al., 1993; Hogan e Smith, 1997; Ribeiro, 2001).

As taxas de infecções por bactérias ambientais são variáveis em nosso meio (Nader Filho et al., 1984; Langoni et al., 1991; Costa et al., 1995; Ribeiro et al., 2006) e dependem, fundamentalmente, da aplicação de medidas de manejo utilizadas, posto que coliformes e *S. uberis* são patógenos envolvidos nas IIM em rebanhos bem manejados, nos quais as CCSLT são baixas e as infecções por patógenos contagiosos foram controladas (Silva et al., 1983; Silva, 1999).

Bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes causam mamites de difícil controle por meio das medidas utilizadas

rotineiramente utilizadas para a prevenção e controle das infecções intramamárias produzidas por estafilococos e estreptococos. Os quadros clínicos, locais ou sistêmicos, são causados pela liberação de endotoxinas, sendo as vacas no período inicial de lactação as mais susceptíveis às infecções por estes agentes (Silva e Costa, 2001). Em rebanhos brasileiros, as prevalências de mamites causadas por coliformes, especialmente aquelas produzidas por *E. coli*, variam entre 2-20% (Nader Filho et al., 1984; Langoni et al., 1985; Ribeiro et al., 2006). Vale salientar que em alguns dos rebanhos trabalhados foram realizados isolamentos de coliformes a partir de amostras de leite obtidas de animais que apresentavam casos clínicos graves de mamite, como relataram Silva e Costa (2001).

Não se observou o predomínio de agentes ambientais em nenhum dos rebanhos avaliados, embora a freqüência de isolamentos dos mesmos tenha sido maior nos rebanhos onde os animais eram confinados ou semi-confinados. *Pseudomonas* spp. foram isoladas em dez rebanhos (28,57%), verificando-se uma freqüência média de isolamentos de 2,29%. Trata-se de um microrganismo considerado saprófita, sendo isolado de ambientes onde existem bovinos, principalmente da água usada para lavagem dos equipamentos de ordenha (Kirk e Bartlett, 1984; Costa et al., 1998). Segundo Packer (1977), *P. aeruginosa* é responsável por menos de 1% das mamites em bovinos leiteiros e estas infecções raramente atingem níveis superiores a 3%.

A maioria das mamites por *Pseudomonas* ocorreu em cinco rebanhos que contribuíram com 87,17% dos isolamentos. Nesses rebanhos, as infecções por este microrganismo foram atribuídas à água utilizada nas atividades de ordenha. Embora esta não tenha sido submetida a análises microbiológicas, era proveniente de nascentes, apresentando-se bastante turva e com presença acentuada de matéria orgânica. Segundo Ribeiro e Carvalho (2001), a água pode se constituir em fonte adicional de contaminação do leite e dos

animais, caso não esteja dentro dos padrões microbiológicos e físico-químicos, tendo como contaminantes mais comuns os coliformes, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Cytophaga*, *Micrococcus* e *Pseudomonas*, provenientes do solo ou da própria água rica em matéria orgânica.

Entre os agentes relacionados às mamites ambientais foram isoladas cinco amostras de *Prototheca zopfii*, com frequência média de 0,29% entre quartos amostrados e de 5,26% entre rebanhos. A baixa frequência de isolamentos, verificada neste trabalho, sugere o envolvimento ocasional deste patógeno nas IIM na região estudada, resultado este concordante com os relatados por Brito et al. (1999) e Mota et al. (2004). Contudo, este agente pode eventualmente ocasionar surtos de mamite em rebanhos leiteiros, verificando-se altas taxas de isolamento, conforme no surto relatado por Costa et al. (1999a).

Leveduras foram isoladas em 57 amostras de leite analisadas, procedentes de 27 rebanhos da região, verificando-se uma frequência média de isolamentos de 3,46%. Todas eram pertencentes ao gênero *Candida*, com exceção de uma amostra que foi identificada como *Trichosporon loubieri*. *Candida albicans* (28,07%) predominou entre as leveduras isoladas, seguida por *C. parapsilosis* (19,29%), *C. catenulata* (14,03%), *C. glabrata* (14,03%), *C. tropicalis* (8,77%), *C. krusei* (7,01%), *C. rugosa* (3,50%) e *Candida spp.* (3,50%).

A presença de leveduras na glândula mamária é discutida por diferentes autores, com taxas de isolamento variáveis entre 0,1% e 17,3% (Wilson et al., 1997; Santos e Marin, 2005). A maioria dos trabalhos relata a predominância de *Candida* entre as leveduras associadas com a mamite bovina, verificando-se geralmente grande diversidade entre as espécies identificadas (Santos e Marin, 2005; Krukowski et al., 2006), fatos observados entre os rebanhos do presente estudo.

Observaram-se correlações positivas entre as taxas de isolamento de SCN e BGN ( $r=0,366$ ) e de SCN e leveduras ( $r=0,385$ ). Estas correlações podem ser plenamente justificadas, embora possam parecer paradoxais pelo fato de SCN serem agentes tipicamente contagiosos, enquanto que BGN e leveduras são patógenos considerados ambientais (Santos e Fonseca, 2007). Diferentes autores (Harmon e Langlois, 1989; Silva, 1999; Sears e McCarthy, 2003) têm apontado o crescimento da importância de SCN e agentes ambientais nos rebanhos nos quais as IIM ocasionadas por *S. aureus* e *S. agalactiae* tem sido controlada. Um outro aspecto importante é que o grupo SCN é bastante heterogêneo, congregando diversas espécies, algumas com características de agentes contagiosos e outros com conotação tipicamente de agente ambiental (Harmon e Langlois, 1989).

Amostras sem crescimento de microrganismos representaram 7,41% (122). Os índices obtidos foram inferiores àqueles relatados por Brito et al. (1999) e Barbalho e Mota (2001) que obtiveram valores respectivamente de 14,50% e 15,50%. Quatro dentre os rebanhos apresentaram elevadas proporções de amostras sem crescimento, com índices variando entre 21,15% e 39,13%. A ausência de crescimento bacteriano pode estar relacionada com o fato de algumas mamites serem de origem não infecciosa ou o microrganismo ter sido eliminado pelo sistema imune do animal (Santos e Fonseca, 2007); outra hipótese é o envolvimento de agentes fastidiosos que não cresceram nas condições de cultivo utilizadas (Wellenberg et al., 2002).

Tabela 1. Relação de microrganismos envolvidos na etiologia dos casos clínicos e subclínicos de mamite em 35 rebanhos bovinos da bacia leiteira da região sul do estado de Minas Gerais, no período de março de 2004 a dezembro de 2006

Isolados	Isolados obtidos de casos clínicos (%)	Isolados obtidos de casos subclínicos (%)	Isolamento (%)	Positivos (%)
SCP <sup>1</sup>	58 (9,94)	525 (90,06)	583 (34,29)	34 (97,14)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	72 (19,40)	299 (80,60)	371 (21,82)	23 (65,71)
<i>Corynebacterium bovis</i>	20 (8,33)	220 (91,67)	240 (14,11)	32 (91,42)
SCN <sup>2</sup>	6 (5,00)	114 (95,00)	120 (7,05)	30 (85,71)
<i>Streptococcus uberis</i>	20 (18,01)	91 (81,99)	111 (6,52)	30 (85,71)
Enterobactérias	17 (27,41)	45 (72,59)	62 (3,64)	20 (57,14)
Leveduras	9 (15,78)	48 (84,22)	57 (3,35)	18 (51,42)
<i>Pseudomonas</i> spp.	7 (17,94)	32 (82,06)	39 (2,29)	10 (28,57)
<i>Bacillus</i> spp.	7 (15,90)	37 (84,10)	44 (2,58)	23 (65,71)
<i>Enterococcus</i> spp.	9 (23,68)	29 (76,32)	38 (2,23)	19 (54,28)
<i>Streptococcus</i> spp.	8 (30,76)	18 (69,34)	26 (1,52)	11 (31,42)
<i>Prototheca zopfii</i>	1 (20,00)	4 (80,00)	5 (0,29)	2 (5,71)
Outros agentes	2 (50,00)	2 (50,00)	4 (0,23)	4 (11,42)
Total	236 (13,88)	1464 (86,12)	1.700 (100)	-

1-*Staphylococcus* coagulase positivos 2-*Staphylococcus* coagulase negativos

## 2-Índices de mamite clínica e subclínica

Os índices de mamite constituem parâmetros importantes para se monitorar a sanidade da glândula mamária dos animais e a eficiência das medidas de controle adotadas para a doença na propriedade.

Os índices de mamite clínica e subclínica observados em cada um dos rebanhos avaliados encontram-se na Tabela 2. O índice médio de mamite clínica (IMC) foi de 9,87%, verificando-se variações entre rebanhos de zero até 28,57%. Apenas 8,57% dos rebanhos apresentavam IMC  $\leq$  2%, 40,00% com IMC entre 5% e 10% e 31,42% com IMC  $\geq$  15% (Figura 1). Quanto à mamite subclínica (IMSC) (Figura 2), os índices variaram entre 17,14% e 85,45%, com média de 52,20%. Nenhum rebanho apresentou IMSC inferior a 15%, índice que seria aceitável de acordo com Santos e Fonseca (2007). Somente dois rebanhos

(5,71%) apresentaram IMSC inferiores a 20%, enquanto 20 (57,14%) apresentaram taxas superiores a 50%, sendo que destes, cinco (14,28%) apresentaram IMSC  $\geq$  a 70%.

Os dados disponíveis na literatura apontam que a prevalência da mamite varia muito entre rebanhos brasileiros, sendo citados índices de mamite subclínica entre 20,69% e 72,46% e entre 0,60% e 17,50% para a mamite clínica (Brant e Figueiredo, 1994; Laranja e Machado, 1994; Costa et al., 1995; Pardo et al., 1999; Brito et al., 1999; Bueno et al., 2002; Mota et al., 2004).

Costa et al. (2001) em estudo envolvendo 19.388 animais de 257 rebanhos de Minas Gerais e de São Paulo, no período de 1993 a 1997, verificaram prevalências médias anuais de 14,53% para casos clínicos e de 72,46% para casos subclínicos. Por outro lado, Cassoli e Machado (2007), ao

analisarem os dados sobre as contagens de células somáticas individuais (CCSI) de cerca de 30.000 vacas de 250 rebanhos de diversas bacias leiteiras do Brasil, assistidos pela Clínica do Leite/SP, verificaram prevalência de 45% para a mamite subclínica.

Apesar dos altos índices de mamite clínica verificados no presente estudo, a proporção de casos clínicos em relação a casos subclínicos (1:18,5) foi superior à de 1:6, verificada por Costa et al. (2001) em rebanhos leiteiros de São Paulo e de Minas Gerais, e de 1:8 relatada por Bueno et al. (2002), em rebanhos da região de Pirassununga/SP. Estes resultados indicam ocorrer uma proporcionalidade entre estes parâmetros, contudo, diferentemente do esperado, não se observou a existência de correlação entre os índices de mamite clínica e subclínica ( $P>0,05$ ). Tal fato pode ter sido ocasionado pela grande variação que se observou entre os índices de mamite clínica e subclínica nos rebanhos quando analisados individualmente, o que, por sua vez, pode estar relacionado com a grande variabilidade de microrganismos existentes nestes rebanhos.

Observaram-se correlações positivas entre o IMSC e as taxas de isolamento de SCP ( $r=0,569$ ) e entre o IMSC e as taxas de isolamento de *S. agalactiae* ( $r=0,484$ ), o que indica que quando aumenta a frequência de isolamentos destes agentes nos rebanhos, aumentam também os índices de mamite subclínica e as contagens de células somáticas no tanque. Os resultados obtidos se justificam pela elevada frequência de isolamentos destes agentes nos rebanhos estudados e a participação dos mesmos

principalmente nos casos subclínicos. Para os demais agentes não se verificou correlação com o IMSC ( $P>0,05$ ).

Não se observou correlação entre os índices de mamite clínica com as taxas de isolamento de nenhum dos patógenos estudados. Embora os patógenos ambientais sejam normalmente associados com infecções clínicas (Costa et al., 1998; Santos e Fonseca, 2007), observou no presente estudo o envolvimento de agentes ambientais predominantemente nos casos subclínicos, o que justifica os resultados encontrados.

Verificaram-se correlações positivas entre IMSC e CCSLT ( $r=0,401$ ) e entre IMC e CCSLT ( $r=0,476$ ), demonstrando que quando se verificam aumentos nos índices de mamite clínica ou subclínica, verifica-se aumento também na CCSLT.

A mamite bovina é doença multifatorial que resulta da interação entre os agentes etiológicos, o meio ambiente e o hospedeiro susceptível. Em nosso meio, as características dos sistemas de produção leiteira são amplamente favoráveis à instalação e manutenção da doença (Amaral, 1999). Desta maneira, os índices de mamite nos rebanhos bovinos da bacia leiteira da região sul de MG não diferem muito daqueles registrados em outras regiões brasileiras. Contudo, encontram-se muito distantes dos níveis de 1-2% para casos clínicos e de 15% para casos subclínicos que seriam aceitáveis para rebanhos que têm um controle satisfatório da mamite, segundo Santos e Fonseca (2007).

Tabela 2. Índices de mamite clínica (IMC), mamite subclínica (IMSC) e contagens de células somáticas no leite do tanque (CCSLT) observadas em 35 rebanhos bovinos da bacia leiteira da região sul do estado de Minas Gerais, no período de março de 2004 a dezembro de 2006

Rebanho	IMSC(%)	IMC(%)	CCSLT(cél./mLx1.000)
27	17,14	1,90	336
8	17,42	4,54	149
18	22,40	6,25	415
32	27,13	6,53	2.277
20	30,26	6,86	201
31	34,16	10,00	969
22	35,41	22,22	927
35	35,66	7,35	750
28	36,98	8,21	420
33	40,00	10,00	533
2	41,24	11,11	468
26	43,56	4,54	336
15	47,80	15,78	548
9	50,00	0,00	325
19	50,00	18,51	1.532
11	51,92	9,79	656
25	53,16	2,53	790
17	53,88	4,44	1.010
23	54,6	28,57	3.181
5	57,95	4,54	678
10	58,59	9,37	1.008
3	58,75	25,00	1.471
6	60,32	6,25	304
4	62,26	6,60	651
34	63,57	5,00	1.200
1	65,13	15,78	1.178
7	66,66	3,57	484
24	67,30	6,15	1.284
21	69,61	9,41	1.956
30	69,75	12,90	1.314
13	70,20	18,36	1.000
29	71,83	1,40	465
12	76,58	6,34	1.182
14	80,55	19,44	1.809
16	85,45	16,36	1.702

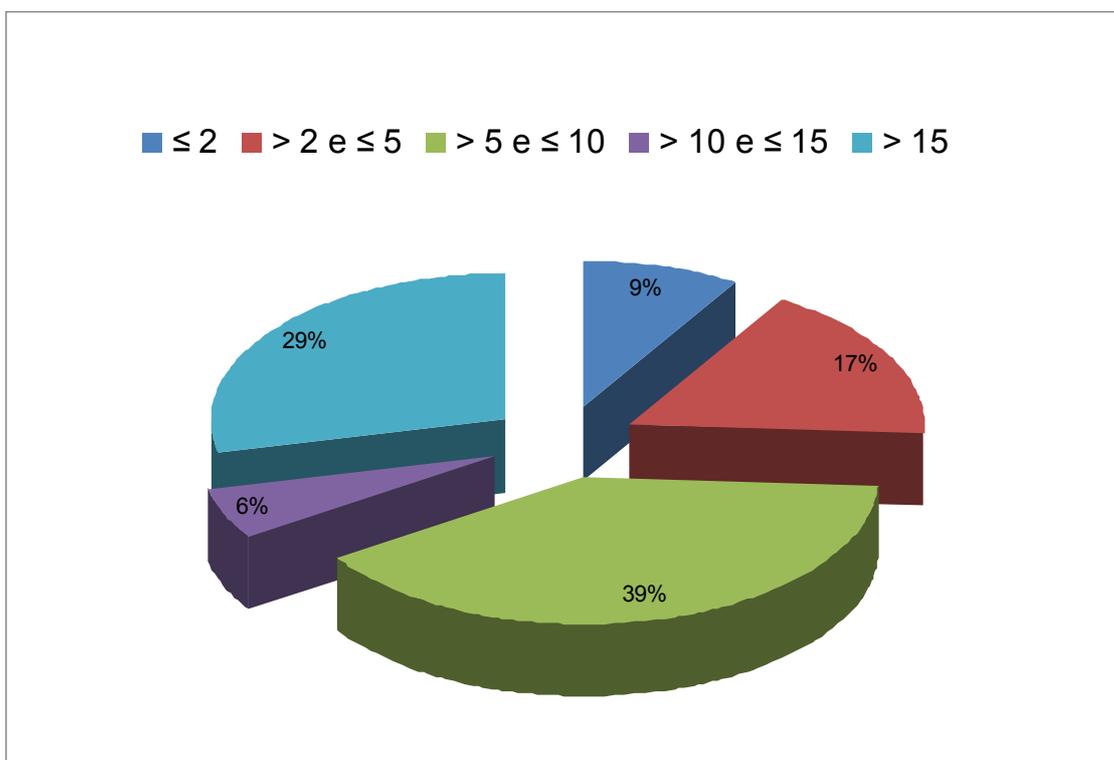


Figura 1: Índices de mamite clínica em 35 rebanhos bovinos da bacia leiteira da região sul do estado de Minas Gerais, no período de março de 2004 a dezembro de 2006

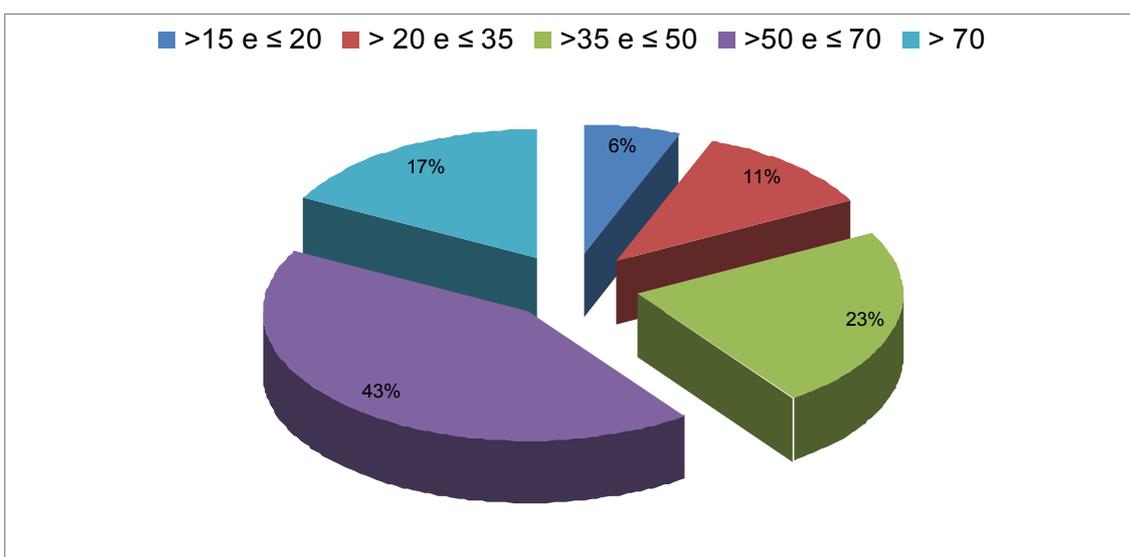


Figura 2: Índices de mamite subclínica em 35 rebanhos bovinos da bacia leiteira da região sul do estado de Minas Gerais, no período de março de 2004 a dezembro de 2006



### 3-Contagens de células somáticas no leite do tanque (CCSLT)

As células somáticas presentes no leite que incluem polimorfonucleares, linfócitos, macrófagos e células epiteliais fazem parte do sistema de defesa natural da glândula mamária. Considera-se que quartos sadios apresentem contagens de células somáticas (CCS) da ordem de 200.000 a 250.000/mL de leite. Embora ocorram variações normais em função da idade, tempo de lactação, estresse térmico e produção individual, a mamite constitui a principal causa de elevação na CCS individual ou no leite do tanque (Schukken et al., 2003; Santos e Fonseca, 2007).

Altas CCSLTs são indicativas de índices elevados de mamite subclínica no rebanho (Schukken et al., 2003), o que traz reflexos diretos na qualidade do leite e na produtividade do rebanho (Harmon, 1994; Santos e Fonseca, 2007).

Os resultados das análises de células somáticas encontram-se compilados na Tabela 2 e na Figura 3. Observa-se (Figura 3) que dentre as amostras analisadas, somente 17,14% apresentavam CCSLT inferiores a 400.000 cél./mL de leite. Em 17 rebanhos (48,57%), estas contagens apresentaram escores superiores a 750.000 cél./mL, tendo 13 deles (37,14%), apresentado CCSLT superiores a  $10^6$  cél./mL de leite. A legislação em vigor, Instrução Normativa N° 51 de Setembro de 2002 (Brasil, 2002), estabelece  $10^6$  cél./mL como limite máximo de CCSLT para o leite produzido atualmente no Brasil, caindo este limite para 750.000 em Julho de 2.008 e para 400.000 em 2.012. Os resultados obtidos demonstraram que uma parcela expressiva dos rebanhos analisados apresentava inadequação quanto a este quesito, o que implicaria na penalização dos produtores se a legislação estivesse sendo observada com rigor.

As CCSLTs obtidas contrastam com os dados divulgados por Cassoli e Machado (2007), segundo os quais os resultados das

análises realizadas pelos laboratórios que integram o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL) apontam que grande parte dos rebanhos leiteiros de diversas bacias leiteiras brasileiras apresenta-se em conformidade com os quesitos de CCSLT exigidos pela legislação vigente. Segundo estes autores, os dados de cerca de 273.000 amostras de leite oriundas de 172 indústrias lácteas ligadas ao SIF que foram analisadas pela Clínica do Leite/SP apontaram contagens médias de 378.000 cél./mL, com aproximadamente 70% das amostras com contagens entre 300.000 e 600.000 e apenas 10% das amostras com contagens superiores a  $10^6$  cél./mL.

As CCSLTs foram correlacionadas positivamente com as taxas de isolamento de *S. agalactiae* ( $r=0,549$ ) e de *S. uberis* ( $r=0,352$ ). Porém, contrariamente ao relatado pela literatura, não se observou correlação entre CCSLT e as taxas de isolamento de *S. aureus*. No presente estudo, rebanhos que apresentavam os maiores índices de mamite subclínica, sobretudo com o envolvimento de *S. agalactiae* foram também aqueles que apresentaram os maiores escores de CCSLT. Cinco propriedades que tinham este agente como o principal foram as que apresentaram os escores mais elevados de CCSLT (1.702 a  $3.181 \times 10^3$  cél./mL), o que demonstra a importância deste microrganismo na CCSLT em relação aos demais patógenos contagiosos, conforme relatado por Zafalon et al. (1999) e por Costa et al. (2005).

Esperava-se uma correlação negativa entre CCSLT e as taxas de isolamento de agentes ambientais, mas tal não se verificou, excetuando-se para as leveduras ( $r=-0,348$ ). A ausência de correlação pode ser explicada pela predominância de agentes contagiosos em todos os rebanhos estudados, mesmo naqueles onde se verificaram as maiores taxas de isolamento de agentes ambientais.



Quando se diz que patógenos ambientais estão normalmente associados com baixas CCSLTs, isto se deve ao fato de estes agentes apresentarem envolvimento predominantemente em casos clínicos, situação em que o animal não é ordenhado e, conseqüentemente, não impacta a CCSLT. Outro aspecto é que IIM por estes agentes são consideradas características de rebanhos onde os patógenos contagiosos foram controlados e, conseqüentemente, são baixos os índices de mamite subclínica e a CCSLT.

Não se esperava a existência de correlação entre a CCSLT e leveduras devido à baixa taxa de isolamentos destes agentes (3,46%) e pelo fato de os isolados terem sido bem distribuídos entre 17 das 35 propriedades estudadas, exceção para um dos rebanhos (reb. 20). Neste, verificou-se a participação quase que exclusiva de *C. bovis* e de leveduras na etiologia da mamite, tendo sido obtidos 27 isolados deste agente que

representaram 25,57% (27/57) do total de isolamentos. A maior concentração de leveduras neste rebanho e a baixa CCSLT nele verificada (201.000 cél./mL) podem ter influenciado no resultado da correlação.

A linearidade entre CCSLT e os índices de mamite subclínica, conforme relatado por Harmon (1994), não foi observada. Tal fato pode ser explicado pelo impacto diferenciado que os diferentes agentes envolvidos na mamite subclínica têm na CCSLT e pelas diferentes freqüências com que os mesmos podem estar envolvidos na etiologia dos casos subclínicos em nível de rebanho. A discrepância observada entre os índices de mamite subclínica e as CCSLTs, em alguns rebanhos, pode ser justificada pelo fato de que, em alguns desses rebanhos, animais que apresentavam grumos no teste eram ordenhados normalmente, o que certamente ocasionou o aumento desproporcional na CCSLT.

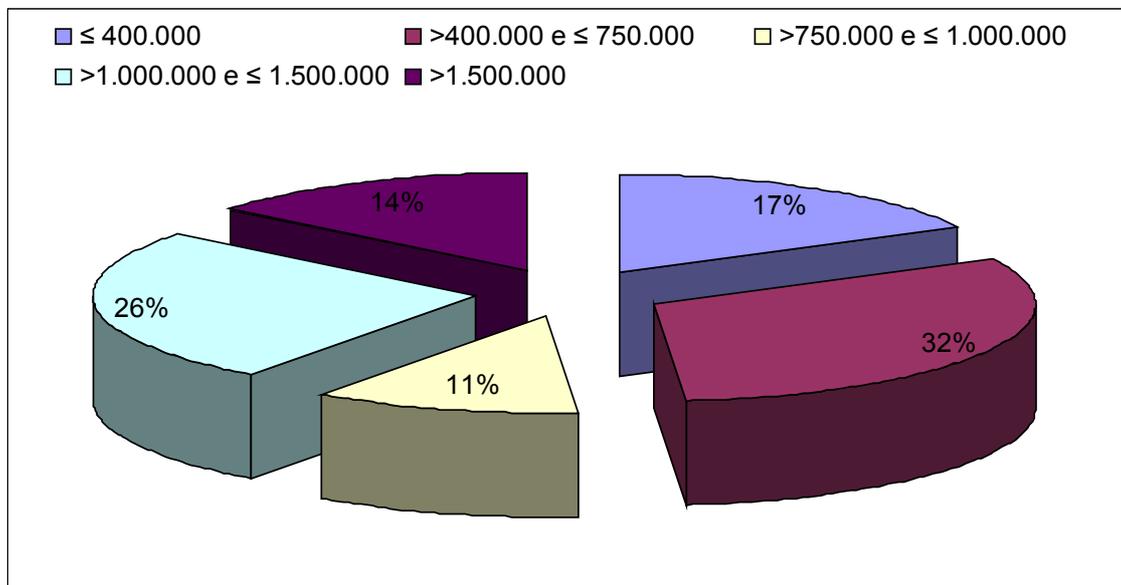


Figura 3. Contagens de células somáticas no leite do tanque em 35 rebanhos bovinos da bacia leiteira da região sul do estado de Minas Gerais, no período de março de 2004 a dezembro de 2006



#### 4-Associação entre etiologia e as formas de apresentação da mamite

A distribuição dos microrganismos isolados e a participação dos mesmos na gênese dos casos clínicos e subclínicos encontra-se na Tabela 1. De maneira geral, verificou-se que a maioria dos microrganismos isolados estava relacionada com infecções subclínicas, exceção para dois isolados de *Arcanobacterium pyogenes*, incluídos no grupo “outros agentes”, que estavam associados com eventos de mamite clínica aguda.

O grupo SCP, de maior frequência nos rebanhos estudados, apresentou baixa probabilidade de causar mamite clínica em relação aos demais patógenos [OR=0,58 (0,42; 0,81) e  $P<0,001$ ]. Não foram observadas diferenças significativas entre os índices de mamite clínica e subclínica quando se compararam SCP com SCN ( $P=0,086$ ), SCP em relação ao *C. bovis* ( $P=0,472$ ); SCN quando comparados com *C. bovis* ( $P=0,249$ ) ou para os agentes ambientais quando comparados entre si ( $P>0,05$ ). No entanto, as diferenças foram representativas quando se comparou *S. agalactiae* com SCP [OR=2,18 (1,48; 3,22) e  $P<0,001$ ] e *S. agalactiae* em relação aos demais patógenos contagiosos [OR=2,70 (1,90; 3,85) e  $P<0,001$ ]. Por outro lado, não se verificaram diferenças significativas quando se compararam os índices de mamite clínica e subclínica determinados por *S. agalactiae* em relação a *S. uberis* ( $P=0,743$ ); *S. agalactiae* em relação à BGN ( $P=0,335$ ); e *S. agalactiae* em relação ao grupo formado por algas e leveduras ( $P=0,542$ ).

Patógenos ambientais, em relação aos contagiosos, excetuando-se o *S. agalactiae*, apresentaram maior participação nos eventos clínicos [OR=1,66 (1,25; 2,20) e  $P<0,001$ ], verificando-se que o grupo dos BGN, quando comparados aos demais microrganismos, apresentou a maior probabilidade de causar eventos de mamite clínica [OR=1,79 (1,24; 2,60) e  $P=0,003$ ], o que indica a maior virulência destes agentes

em relação aos demais microrganismos isolados.

Embora a probabilidade para mamite clínica tenha sido mais elevada no grupo dos BGN, observou-se o envolvimento deste grupo principalmente na forma subclínica da mamite (76,23%), contrariando os resultados obtidos por Costa et al. (1998), que relataram participação semelhante de BGN nas formas clínicas e subclínicas da doença. As mamicas provocadas por esses microrganismos são geralmente interpretadas como transitórias, entretanto, tem sido demonstrado que *E. coli* pode determinar infecções subclínicas persistentes da glândula mamária (Dogan et al., 2006), sobretudo em rebanhos que apresentam um bom controle de mamite contagiosa (Ribeiro et al., 2006).

No presente estudo, BGN e *S. uberis* foram responsáveis por 13,79% dos casos clínicos, enquanto SCP e *S. agalactiae*, patógenos tipicamente contagiosos associados com infecções subclínicas, responderam por 56,28% dos casos subclínicos e por 64,22% dos casos clínicos, o que ressalta a importância destes agentes nas infecções clínicas e subclínicas, na bacia leiteira estudada.

Entre os agentes etiológicos da mamite bovina, maior atenção tem sido dada a *S. aureus*, devido à predominância do mesmo nas infecções subclínicas em rebanhos nacionais (Silva et al., 1983; Costa et al., 1995; Brito et al. 1999; Mota et al., 2004), fato ratificado pelos resultados obtidos neste experimento. Contudo, os resultados obtidos apontaram a necessidade de uma maior atenção para as infecções ocasionadas por *S. agalactiae*, devido à grande expressão que o agente apresentou na gênese de casos clínicos e subclínicos nos rebanhos do presente estudo.

### **5-Estimativas de impacto da mamite na produção leiteira em função das contagens de células somáticas no leite do tanque**

Animais acometidos pela mamite subclínica podem apresentar redução na produção de leite que varia conforme o número de quartos acometidos, o agente envolvido e a intensidade da reação inflamatória desencadeada (Zafalon et al., 1999; Santos e Fonseca, 2007). No estado de Minas Gerais, Oliveira (1989) observou perdas de 13,8%, 24,4% e 46,8% para reações de +, ++ e +++ no CMT, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por Brant e Figueiredo (1994), com perdas de produção para estas mesmas reações respectivamente de 14,7%, 34,8% e 45,0%.

Os custos ocasionados pela mamite se devem principalmente à queda na produção leiteira do rebanho, gastos com aquisição de medicamentos, descarte de leite de animais em tratamento e à reposição precoce de animais cronicamente acometidos. Além disto, o aumento da CCSLT e a diminuição dos teores de gordura e de caseína causam queda do rendimento na indústria láctea e a depreciação nutricional e sensorial dos produtos lácteos e seus derivados (Wellenberg et al., 2002; Seegers et al., 2003).

Em nível de rebanho, a CCSLT tem sido utilizada como parâmetro para se estabelecer o percentual de quartos acometidos pela mamite subclínica e as perdas de produção. Segundo Harmon (1994), CCSLTs de 500.000 estariam associadas com até 16% de quartos infectados no rebanho e perdas de produção de até 6%, enquanto para CCSLTs de 1.000.000 e 1.500.000 estes valores seriam respectivamente de 32% e 18%, e 48% e 29%, indicando haver uma proporcionalidade entre os escores de CCSLT e os níveis de mamite subclínica e de perdas de produção. No presente estudo, a CCSLT foi utilizada como parâmetro único para a obtenção das estimativas de perdas de produção. Contudo, rebanhos que apresentam uma

mesma CCSLT podem apresentar perdas reais de produção diferentes em decorrência de diferenças relativas à raça, genealogia, uniformidade dos lotes de produção, produtividade média dos animais e patógenos envolvidos na etiologia da mamite.

A Tabela 3 contém as estimativas de perdas de produção leiteira em função das CCSLTs verificadas para cada rebanho. Elevadas CCSLTs foram observadas na maioria dos rebanhos, indicando níveis elevados de perdas de produção leiteira. As estimativas de perdas de produção em litros de leite/ano variaram bastante em função das CCSLTs e do volume de leite produzido pelos diferentes rebanhos, tendo sido observadas variações entre zero (rebanho 8) e 873.825 litros/ano (rebanho 32).

A Figura 4 relaciona as estimativas de perdas percentuais de produção de leite, por faixas de perdas. Observa-se que apenas 37,14% dos rebanhos apresentaram estimativas de queda de produção  $\leq$  a 10%, com 42,85% apresentando perdas entre 10% e 30% e 20% com perdas de produção superiores a 30%. Considerando-se o conjunto dos rebanhos estudados, a CCSLT média observada foi de 929.000 cél./mL, com uma estimativa média de queda de produção de 19,39% (Tab.3).

A produção média dos rebanhos foi calculada em cerca de 43.500 litros/dia, tendo sido estimada uma perda de produção de cerca de 3.300.000 litros anuais (Tab.3), em função da mamite subclínica, o que significa que os produtores perdiam aproximadamente 76 dias de produção somente em função da mamite subclínica em seus rebanhos. Estas estimativas de perdas ocasionadas pela mamite subclínica (19,39%) foram superiores àquela feita por Costa (1998) que estimou que a mamite causasse prejuízos da ordem de 10-15% da produção leiteira nacional.

Um ponto a ser salientado é que estas estimativas de perdas realizadas no presente estudo não contemplam os demais prejuízos ocasionados pela mamite

subclínica, como por exemplo, a perda de bonificação decorrente da elevação da CCSLT. Segundo Edmondson (2002) alguns laticínios têm praticado a bonificação de até 6% no preço pago pelo leite com CCSLT abaixo de 200.000 cél./mL e penalização de até 6% pelo leite com contagens acima de 750.000 cél./mL.

Embora a mamite subclínica seja a que determina os maiores prejuízos ao produtor, o ônus associado à forma clínica da doença não pode ser desconsiderado, sobretudo quando se verifica que aproximadamente 34% dos rebanhos apresentaram IMC superiores a 15% (Tabela 2). Nestas circunstâncias, o impacto dos casos clínicos é muito expressivo devido ao grande volume de leite descartado durante o período de tratamento dos animais e de carência dos antibióticos utilizados, além do ônus representado pela aquisição dos medicamentos e pela eventual perda de quartos ou reposição precoce de animais com lesões irreversíveis ou nos quais o processo infeccioso se tornou crônico.

Não se observaram correlações entre a produção leiteira diária dos rebanhos com IMSC, IMC ou CCSLT, o que indica que a mamite acometeu pequenos, médios e grandes produtores de forma indiferenciada.

Os níveis elevados de perdas de produção diminuem a rentabilidade dos rebanhos, inviabilizando inversões em medidas preventivas básicas. Consequentemente, as medidas de controle adotadas são quase que exclusivamente curativas, com poucos reflexos na diminuição dos índices de mamite e nas CCSLTs destes rebanhos. Tal fato propicia à manutenção endêmica da mamite nestes estabelecimentos, conforme ilustrado na Figura 5.

#### IV. CONCLUSÕES

Elevados índices de mamite clínica e de mamite subclínica, associados com elevadas contagens de células somáticas no leite do tanque, foram observados na maioria dos rebanhos estudados.

Verificou-se a predominância da mamite contagiosa, tendo SCP, *S. agalactiae*, *C. bovis* e SCN como os principais agentes etiológicos. *S. uberis* e BGN foram os principais patógenos ambientais isolados.

Verificou-se a maioria dos microrganismos isolados foi associada com a forma subclínica da mamite.

*S. aureus* e *S. agalactiae* foram os microrganismos mais frequentes nas formas clínicas e subclínicas da mamite.

Agentes ambientais e *S. agalactiae* apresentaram maior propensão a causar quadros clínicos em relação aos demais patógenos isolados.

Níveis elevados de perdas de produção foram estimados, sobretudo nos rebanhos onde os índices de mamite subclínica foram mais expressivos.

Os resultados obtidos demonstraram a alta incidência de mamite clínica e subclínica nos rebanhos estudados, o que traz reflexos diretos na produtividade do rebanho e na qualidade do leite produzido, evidenciando a necessidade de maiores esforços por parte laticínios, cooperativas, órgãos de fiscalização e instituições de pesquisa e extensão no sentido de fornecer subsídios para que os produtores possam controlar de forma mais eficiente a mamite, minorando os prejuízos ocasionados pela mesma em toda a cadeia produtiva do leite.

Tabela 3. Estimativas de perdas percentuais e em litros de leite anuais, em função das contagens de células somáticas no leite do tanque (CCSLT) de 35 rebanhos leiteiros do sul de Minas Gerais

Nº rebanho	CCSLT X 1.000	Produção média diária (L)	Queda de produção (%)	Produção diária corrigida (L)	Perdas anuais (L)
8	149	1.400	0,00	1.400	0
20	201	2.900	0,44	2.913	4.607
6	304	180	3,11	186	2.273
9	325	800	3,66	829	10.685
26	336	2.500	3,95	2.599	36.000
27	336	2.000	3,95	2.079	28.800
18	415	600	6,00	636	13.138
28	420	3.300	6,13	3.502	73.826
29	465	800	7,30	858	21.314
2	468	600	7,38	644	16.156
7	484	1.200	7,79	1.294	34.134
19	532	500	9,04	545	16.500
15	548	900	9,46	985	31.067
4	651	2.300	12,14	2.579	101.875
11	656	2.100	12,27	2.358	94.013
5	678	180	12,84	203	8.434
35	769	1.600	15,20	1.843	63.233
25	790	1.100	15,75	1.273	63.233
22	927	400	19,31	477	28.194
31	969	2.100	20,40	2.528	156.391
13	1.000	400	21,21	485	30.965
10	1.008	430	21,42	522	33.614
17	1.010	400	21,47	486	31.345
1	1.178	450	25,84	566	42.438
12	1.182	700	25,94	882	66.280
34	1.200	4.500	26,41	5.688	433.771
24	1.284	700	28,59	900	73.056
30	1.314	600	29,37	776	64.327
3	1.471	716	33,46	956	87.432
33	533	3.500	9,06	3.817	115.742
16	1.702	740	39,46	1.032	106.585
14	1.809	1.200	42,24	1.707	185.025
21	1.956	1.100	46,07	1.607	184.952
32	2.277	4.400	54,41	6.794	873.825
23	3.181	600	77,92	1.067	170.634
Total	-	43.496	678,99	57.018	3.303.862
Média	929	1.243	19,39	-	-

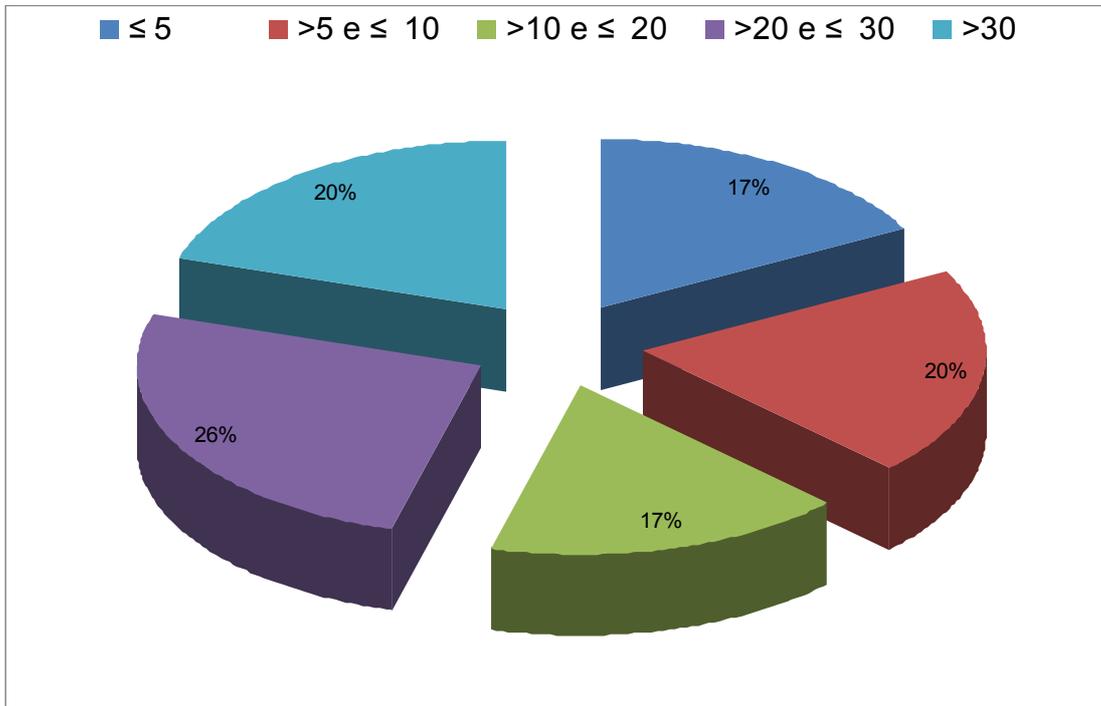


Figura 4. Distribuição de 35 rebanhos leiteiros da região sul de Minas Gerais de acordo com as estimativas de perdas percentuais de produção de leite



Figura 5. Ciclo de manutenção da mamite bovina



## ESTUDO II

### MAMITE POR LEVEDURAS EM BOVINOS LEITEIROS DO SUL DO ESTADO DE MINAS GERAIS, BRASIL

#### RESUMO

Amostras de leite coletadas assepticamente de 1.645 quartos mamários de animais com mamite clínica ou subclínica, procedentes de 35 rebanhos leiteiros do sul de Minas Gerais, foram submetidas à análise microbiológica visando determinar o envolvimento de leveduras na etiologia dos casos. Foram isoladas 57 amostras de leveduras, representando 3,35% dos agentes isolados. Os isolados eram do gênero *Candida*, com exceção de uma amostra que foi identificada como *Trichosporon loubieri*. *C. albicans* foi a espécie predominante, perfazendo 28,07% dos isolamentos, seguida por *C. parapsilosis* (19,29%), *C. catenulata* (14,03%), *C. glabrata* (14,03%) e *C. tropicalis* (8,77%). Infecções mistas, por leveduras e bactérias, ocorreram em 29,82% dos casos. Observou-se que 84,21% das leveduras isoladas foram obtidas de animais acometidos pela mamite subclínica. Os resultados demonstraram que leveduras apresentaram baixa expressão na etiologia dos casos de mamite nos rebanhos estudados, mas que eventualmente podem se tornar agentes preponderantes da doença.

Palavras-chave: mamite bovina, leveduras, *Candida* sp.

#### ABSTRACT

Milk samples aseptically collected from 1,645 mammary glands of cows affected by clinical or subclinical mastitis, from 35 dairy herds in the south region of Minas Gerais state, were submitted to microbiological analysis to determine the frequency of yeasts as etiological agents of mastitis. Fifty seven strains of yeasts were isolated, representing 3.35% of isolated microorganisms. All strains were of genus

*Candida* with exception to one strain identified as *Trichosporon loubieri*. *Candida albicans* was the dominant species (28.07% of the strains), followed by *Candida parapsilosis* (19.29%), *Candida catenulata* (14.03%), *Candida glabrata* (14.03%) and *Candida tropicalis* (8.77%). Mixed infections involving yeasts and bacteria occurred in 29.82% of the cases. One observed that 84.21% of the yeast strains were isolated from cows with subclinical mastitis. The low frequency of yeasts in the milk samples analyzed suggests that such microorganisms were not relevant mastitis pathogens in the studied herds. However, eventually, yeasts may become dominant agents of the disease in some herds.

Key words: bovine mastitis, yeast, *Candida* sp.

#### I. INTRODUÇÃO

A mamite bovina, sob o ponto de vista econômico, é a doença mais relevante de bovinos leiteiros em todos os continentes, afetando drasticamente a produção e a qualidade do leite e derivados (Pyörälä, 2002). Diversos microrganismos estão envolvidos etiologia na doença, tornando sua epidemiologia complexa. Entre os agentes considerados ambientais, as leveduras têm sido relacionadas como patógenos emergentes em função das mudanças verificadas nos sistemas de produção de leite e nos programas de controle da mamite bovina, na última década. Diversas espécies de leveduras dos gêneros *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* e *Candida* têm sido isoladas de animais acometidos pela mamite, sendo que *Candida* spp. têm sido as mais frequentes (Krukowski et al., 2000; Santos e Marin, 2005).

Os dados disponíveis na literatura sobre a frequência de infecções intramamárias (IIM) provocadas por leveduras apresentam grandes variações, com índices entre 0,1% a 17,3%. São também muito variáveis as taxas de infecções mistas envolvendo esses agentes, em alguns casos com valores superiores a 50% (Farnsworth e Sorensen, 1972; Costa et al.; 1993; Aalbaek et al., 1994; Moretti et al., 1998; Wilson et al.; 1997; Santos e Marin, 2005).

Leveduras são microrganismos isolados facilmente a partir de equipamentos de ordenha, epitélio de tetos dos animais e do ambiente da sala de ordenha (Keller et al., 2000; Santos e Marin, 2005). Altas taxas de isolamento desses microrganismos e elevados percentuais de amostras com crescimento misto são sugestivos de falhas no momento de coleta de amostras destinadas a análises microbiológicas. Outro fato que pode justificar a presença do microrganismo no interior da glândula mamária são as falhas por ocasião da medicação de animais clinicamente acometidos, o que, ocasionalmente, tem sido relacionado como fator determinante de surtos de grandes proporções (Moretti et al., 1998; Crawshaw et al., 2005).

O presente trabalho teve por objetivos estudar o envolvimento de leveduras na etiologia da mamite em rebanhos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais, identificando os gêneros e as espécies predominantes, a participação destes agentes nas formas clínica e subclínica da doença e a ocorrência de infecções mistas.

## II. MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados para o estudo 35 rebanhos leiteiros localizados na região sul de Minas Gerais, pertencentes aos municípios de Boa Esperança, Bom Sucesso, Carrancas, Cruzília, Ijací, Ingai, Itumirim, Itutinga, Jesuânia, Lavras, Nazareno, Nepomuceno, Perdões, Oliveira, Ribeirão Vermelho, Santa Rita do Sapucaí, Santana da Vargem, Santana do Jacaré, Santo Antônio do Amparo e Três Corações.

Nesses rebanhos, além da coleta de amostras de leite para a análise microbiológica, foram avaliadas as medidas gerais de prevenção e controle da mamite, incluindo higiene ambiental, higiene da ordenha, a forma de tratamento dos casos clínicos e medicamentos utilizados. Os dados obtidos foram registrados em fichas individuais para cada rebanho e posteriormente correlacionados com os resultados microbiológicos. Estabeleceu-se que os rebanhos utilizados no estudo deveriam empregar a ordenha mecânica, com pelo menos 30 animais em fase de lactação. Amostras de leite para a execução de análises microbiológicas foram coletadas de, no mínimo, 15 animais de cada uma das propriedades.

Nos estabelecimentos selecionados para o estudo, 2.492 vacas lactantes foram submetidas ao teste Tamis (prova da caneca de fundo escuro) e ao California Mastitis Test (CMT) visando o diagnóstico da mamite clínica e subclínica, segundo Veiga (1998). Foram coletadas assepticamente 1.645 amostras de leite de animais acometidos pela mamite, sendo 238 oriundas de casos clínicos e as demais de casos subclínicos.

As amostras foram coletadas imediatamente antes da ordenha. Os tetos amostrados foram previamente lavados com água corrente e submetidos à assepsia, empregando-se solução de iodo a 0,5%, por 30 segundos. Estes foram enxugados com papel toalha, os três primeiros jatos descartados e coletados de cerca de 10 mL de leite em tubos de ensaio esterilizados. Os espécimes foram acondicionados em caixa de isopor com gelo e prontamente remetidos ao laboratório.

As amostras de leite foram incubadas a 37°C por 8-12 horas, seguindo-se à semeadura das mesmas em Sabouraud Dextrose Agar (Oxoid, USA) contendo 0,4g/L de cloranfenicol (Sigma, USA). Paralelamente, as amostras foram semeadas em ágar sangue (Blood Agar Base-Oxoid, USA) contendo 10% de sangue de carneiro para o isolamento de bactérias. Ambos os meios foram incubados a 37°C

por 24-96 horas, verificando-se a presença de crescimento microbiano, diariamente.

As leveduras foram caracterizadas fenotipicamente segundo Yarrow (1998) e a identificação foi realizada de acordo com chaves descritas por Kurtzman e Fell (1998).

Microrganismos das famílias Staphylococcaceae e Streptococcaceae foram identificados de acordo com Holt et al. (1994) e Quinn et al. (1994). Bactérias gram-negativas oxidase negativas foram identificadas com o uso dos kits BACTRAY® I e II (Laborclin, Brasil) e as oxidase-positivas utilizando-se o kit API 20NE (Biomerieux, França). Os demais agentes bacterianos foram identificados de acordo com Quinn et al. (1994).

Amostras que apresentaram crescimento de três ou mais microrganismos diferentes foram descartadas, pois tal fato é indicativo de contaminação segundo Brito et al. (1999).

As freqüências de isolamento a partir de casos clínicos ou subclínicos e de infecção mista envolvendo leveduras foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado, empregando-se o Programa Epi-Info (CDC–WHO, versão 6.04b, 1997).

### III. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Entre as 1.645 amostras analisadas, 14 foram descartadas devido a indícios de contaminação (crescimento de mais que dois agentes diferentes) e outras 122 por não apresentarem crescimento de microrganismos.

Verificaram-se grandes variações quanto às medidas adotadas para o controle da mamite nos rebanhos analisados, principalmente no que se referiu ao tratamento de casos clínicos e quanto à higiene ambiental e da ordenha.

Observou-se que leveduras apresentaram pouca expressão na etiologia da mamite, tendo sido obtidos 57 isolados, distribuídos entre 17 (48,57%) rebanhos. As taxas de isolamento variaram de zero a 25,47%, com uma média de 3,46% (Tabela 1).

Na Tabela 2 estão relacionadas as espécies isoladas e as respectivas freqüências de isolamento. Observa-se que a maioria das leveduras isoladas (56), 98,24% das amostras, era do gênero *Candida*. *C. albicans* foi a espécie predominante, seguida por *C. parapsilosis*, *C. catenulata* e *C. glabrata*, e *C. tropicalis*. As demais espécies pertencentes ao gênero *Candida* representaram 15,78% dos isolamentos. Os testes utilizados não permitiram a identificação da espécie de duas amostras de *Candida* spp. Uma única amostra foi identificada como *Trichosporon loubieri*, perfazendo 1,75% dos isolamentos, o que evidenciou a pouca relevância de microrganismos deste gênero na etiologia da mamite nos rebanhos estudados. Contudo, *Trichosporon* spp. tem sido associado a IIM de bovinos, em alguns casos predominando em relação às demais leveduras (Moretti et al., 1998) e, em outros, determinando surtos de mamite clínica (Gonzalez et al., 2001). Além do envolvimento na etiologia da mamite, *Trichosporon* spp. tem sido relacionado como um patógeno emergente, determinando quadros patológicos graves em pacientes imunossuprimidos (Marty et al., 2003).

Tabela 1. Frequências de infecções intramamárias por leveduras em 35 rebanhos leiteiros do sul de Minas Gerais, no período de março de 2004 a dezembro de 2006

Identificação do rebanho	Amostras analisadas	Amostras positivas	Amostras positivas (%)
1	65	2	3,07
2	45	1	2,22
3	45	0	0
4	43	1	2,32
5	27	0	0
6	19	1	5,26
7	55	0	0
8	23	2	8,69
9	35	4	11,42
10	34	1	2,94
11	82	4	4,87
12	65	0	0
13	56	0	0
14	56	0	0
15	51	2	3,92
16	61	2	3,27
17	37	1	2,7
18	24	1	4,16
19	26	0	0
20	106	27	25,47
21	58	0	0
22	39	1	2,56
23	51	1	1,96
24	49	0	0
25	51	0	0
26	61	0	0
27	45	3	0
28	61	1	1,23
29	61	0	0
30	51	0	0
31	39	0	0
32	48	0	0
33	24	0	0
34	35	2	5,71
35	17	0	0
Total	1.645	57	3,46
Média	-	3,46	-

Tabela 2. Leveduras isoladas a partir de 1.645 amostras de leite procedentes de 35 rebanhos leiteiros do sul de Minas Gerais, no período de Março de 2004 a Dezembro de 2006

Espécie	Frequência absoluta	Frequência %
<i>Candida albicans</i>	16	28,07
<i>Candida parapsilosis</i>	11	19,29
<i>Candida catenulata</i>	8	14,03
<i>Candida glabrata</i>	8	14,03
<i>Candida tropicalis</i>	5	8,77
<i>Candida rugosa</i>	2	3,5
<i>Candida krusei</i>	4	7,01
<i>Candida</i> spp.	2	3,5
<i>Trichosporon loubieri</i>	1	1,75
Total	57	100

A frequência média de isolamento de leveduras obtida no presente estudo (3,35%) foi próxima daquelas relatadas por Farnsworth e Sorensen (1972) e Krukowski et al., (2006), com valores de 3,2 e 4,3%, respectivamente. Contudo, a literatura registra grande variação nos índices de IIM ocasionados por leveduras, sendo citados valores que oscilam entre 0,1% e 17,3% (Wilson et al., 1997; Santos e Marin, 2005). Quanto à predominância de *Candida* entre as leveduras isoladas e à grande diversidade de espécies identificadas, os resultados foram concordantes com os obtidos por Santos e Marin (2005) e Krukowski et al., (2006), demonstrando não haver o envolvimento seletivo de nenhuma espécie do gênero nas IIM de bovinos. Contudo, foram discrepantes daqueles obtidos por Costa et al. (1993) que verificaram elevado índice de envolvimento de fungos (25,4%) em IIM de bovinos procedentes de rebanhos do estado de São Paulo, sendo *Cryptococcus* o gênero predominante. Também foram discrepantes em relação àqueles obtidos Santos e Marin (2005), que em outro trabalho realizado neste mesmo estado, verificaram uma taxa elevada de isolamentos de leveduras

(10,00%), embora *Candida* spp. tenha sido o gênero predominante, com 68,11% das amostras isoladas.

As diferenças observadas quanto às taxas de isolamento de leveduras e quanto às espécies envolvidas, em relação à literatura, podem estar relacionadas com a amostragem realizada, com o número de rebanhos trabalhados, com as diferentes condições da mamite vigentes e as estratégias empregadas para o controle da mesma, e com a forma de coleta das amostras para análise.

Verificou-se a ocorrência de associações de leveduras com outros patógenos em 29,82% dos casos, sendo as associações com *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus* coagulase positivos (SCP), *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) e *Streptococcus agalactiae* as mais frequentes. Para os demais agentes isolados a frequência de infecções mistas (10,65%) foi muito inferior à observada para leveduras, sendo as diferenças observadas estatisticamente representativas ( $p < 0,01$ ). Elevados percentuais de infecções mistas envolvendo leveduras e bactérias foram

também relatados por Costa et al. (1993), Moretti et al. (1998) e Santos e Marin (2005), com valores de 72,2%, 52,7% e 68,0%, respectivamente.

Os resultados obtidos demonstraram que existe uma tendência de infecções mistas quando do envolvimento de leveduras nas IIM de bovinos. Segundo Keller et al. (2000) e Santos e Marin (2005), leveduras são agentes comumente encontrados em locais úmidos e ricos em matéria orgânica, sendo inclusive isolados do exterior de tetos de animais sadios e de equipamentos de ordenha. Deste modo, altas taxas de isolamento destes agentes em cultura mista poderiam ser indicativas de contaminação das amostras no momento da colheita. Contudo, no presente trabalho, os índices de infecção mista envolvendo leveduras são bastante confiáveis, uma vez que foram criteriosamente observados os princípios de assepsia e de anti-sepsia por ocasião da coleta de amostras. Tal fato pode ser constatado pelo pequeno número de amostras descartadas por apresentarem indícios de contaminação (0,85%).

Constatou-se neste estudo que animais submetidos à terapia intramamária excessiva e repetitiva para mamite eram aqueles que normalmente apresentam complicações clínicas caracterizadas pelo envolvimento de leveduras, fato este já relatado por Costa et al. (1998) e Moretti et al. (1998). Na maioria das propriedades estudadas, o tratamento de casos clínicos de mamite era feito de forma empírica, empregando-se vias e posologias inadequadas, sem o conhecimento dos agentes envolvidos e de seus perfis de sensibilidade, além de se delegar tal tarefa a indivíduos pouco qualificados que desconheciam os princípios básicos de assepsia e de anti-sepsia, necessários por ocasião da utilização de medicação intramamária. Tais fatos podem estar associados com a introdução acidental de microrganismos na glândula mamária, justificando o elevado índice de infecções mistas observado.

Falhas na anti-sepsia e no tratamento intramamário repetitivo foram fatores

desencadeantes de um surto de mamite em um dos rebanhos estudados (rebanho 20), no qual *Candida* spp. foi isolada de 25,47% das amostras de leite analisadas. Diferentemente de diversos surtos de mamite de etiologia micótica relatados na literatura (Elad et al., 1995; Crawshaw et al., 2005), neste não se observou o predomínio de nenhuma espécie em particular, tendo sido isoladas *C. albicans* (33,33%), *C. catenulata* (22,22%), *C. glabrata* (18,51%), *C. parapsilosis* (11,11%), *C. krusei* (7,40%), *C. tropicalis* (3,70%) e *Candida* spp. (3,70%). Nesse rebanho, a maioria dos animais a partir dos quais as culturas positivas foram obtidas compunha um lote que tinha histórico de mamite clínica e tratamento intramamário repetitivo recente.

Quanto à participação de leveduras nos casos clínicos e subclínicos de mamite, verificou-se o envolvimento destes agentes predominantemente na forma subclínica da doença, com 84,22% dos isolados obtidos de animais subclínicamente acometidos, valor muito próximo ao obtido para os demais patógenos isolados (85,46%) ( $P=0,794$ ). Não se verificou a participação de nenhuma espécie em particular nos casos subclínicos. Os resultados foram semelhantes aos descritos por Farnsworth e Sorensen (1972) que relataram que leveduras do gênero *Candida* podem ser isoladas repetidas vezes de quartos com baixa contagem de células somáticas, existindo a tendência de as infecções serem subclínicas.

Nove (15,78%) entre os 57 isolados de leveduras foram obtidos de animais clinicamente acometidos, entretanto, não se observou o predomínio de nenhuma espécie nestes casos, exceção à espécie *C. tropicalis* para a qual três dos cinco isolados foram associados a casos clínicos. Contudo, o número de isolados desta espécie foi muito reduzido, inviabilizando análises estatísticas.

Um aspecto relevante nas mamites ocasionadas por leveduras é que existem poucos fármacos disponíveis no mercado para o tratamento destes tipos de infecção, questão agravada pelo fenômeno multi-

resistência (Coutinho et al., 2007). Tal fato determina que a maioria destas infecções tenda à cronicidade, verificando-se a eliminação contínua do agente por longos períodos (Elad et al., 1995), o que, muitas vezes, implica na esterilização dos quartos infectados ou no descarte dos animais acometidos.

#### **IV. CONCLUSÕES**

Leveduras apresentaram, em geral, pouca expressão na etiologia de IIM nos rebanhos

estudados, com envolvimento predominantemente nos casos subclínicos.

*Candida* foi o gênero predominante, verificando-se grande variação quanto às espécies envolvidas e quanto às taxas de infecções observadas entre os diferentes rebanhos.

Infecções mistas são mais comuns em casos de mamite por leveduras.



## ESTUDO III

### DIVERSIDADE POPULACIONAL DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE CASOS DE MAMITE EM BOVINOS LEITEIROS DA REGIÃO SUL DE MINAS GERAIS

#### RESUMO

Visando estudar a diversidade populacional, 352 amostras de *Staphylococcus aureus* obtidas a partir de casos clínicos e subclínicos de mamite de 35 rebanhos leiteiros do sul de Minas Gerais foram submetidas a testes fenotípicos e genotípicos que incluíram o antibiograma, a RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) e o seqüenciamento da porção 3'-terminal do gene da coagulase. A PCR (*polimerase chain reaction*) gerou 10 padrões diferentes de amplicons que após a restrição enzimática com *AluI* originaram 18 tipos eletroforéticos distintos. O seqüenciamento de amostras representativas dos tipos eletroforéticos encontrados na RFLP demonstrou a similaridade filogenética entre os isolados e a ocorrência duas a sete unidades repetitivas de 81 pares de bases na porção 3'-terminal do gene da coagulase. Os testes de antibiograma resultaram em 54 padrões de resistência. Os maiores índices de resistência foram para a penicilina, ampicilina, polimixina B, tetraciclina e lincomicina. Os resultados dos testes fenotípicos e genotípicos demonstraram que, apesar da grande diversidade populacional de *Staphylococcus aureus* envolvidos na etiologia da mamite bovina, existem clones predominantes que respondem pela maioria das infecções e que estes foram comuns aos rebanhos da região estudada. Não se verificou a associação entre os tipos clonais predominantes observados na PCR-RFLP com a forma de apresentação da doença e nem com nenhum dos diferentes padrões de resistência antibiótica.

**Palavras-Chave:** mamite bovina, *Staphylococcus aureus*, diversidade, gene da coagulase, tipagem

#### ABSTRACT

The aim of this work was to study the population diversity of 352 strains of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and subclinical bovine mastitis cases of 35 dairy herds of southern region of Minas Gerais. The studied strains were submitted to phenotypic and genotypic tests that included the antibiogram and PCR-RFLP and sequencing of 3' terminal region of coagulase gene. The PCR generated 10 different types of amplicons that produced 18 distinct electrophoretic types in RFLP using *AluI* restriction enzyme. The sequencing of 3'-terminal region of coagulase gene of representative samples of the electrophoretic types found in the RFLP demonstrated the phylogenetic similarity between the isolated and the occurrence of two to seven repeated units of 81 pairs of bases in the 3'-terminal portion of coagulase gene. The antibiogram tests resulted in 54 different standards of resistance, observing the greatest resistance indices for penicillin, ampicillin, polymixin B, tetracycline and lincomycin. The phenotypic and genotypic tests demonstrated that, although there is a great populational diversity of *Staphylococcus aureus* involved in the etiology of the bovine mastitis, there are predominant clones associated with most of the infections and that these were common to the dairy herds of the studied region. Associations among the observed predominant clonal types in the PCR-RFLP with the presentation form of the illness or with different standards of antibiotic resistance were not observed.

**Key words:** Bovine mastitis, *Staphylococcus aureus*, diversity, gene of coagulase, typing

## I. INTRODUÇÃO

A mamite bovina, sob o ponto de vista econômico, é a doença infecciosa mais relevante de bovinos leiteiros em todos os continentes, afetando drasticamente a produção e a qualidade do leite e derivados (Pyörälä, 2002). Dentre os diferentes microrganismos envolvidos na sua etiologia, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) destaca-se como um dos mais prevalentes e aquele que isoladamente determina as maiores perdas na pecuária leiteira em todos os continentes (Annemüller et al., 1999; Schlegelová et al., 2003).

A utilização de técnicas convencionais de bacteriologia como a biotipagem, fagotipagem, perfil plasmidial, antibiograma e a determinação do perfil de toxinas na epidemiologia da mamite permitiram determinar o caráter contagioso de *S. aureus* e que os quartos infectados e pele do úbere e tetos dos animais são os principais reservatórios dessa bactéria (Branley e Dodd, 1984; Roberson et al., 1998). Medidas de controle centradas nesses conhecimentos possibilitaram reduzir a incidência de infecções provocadas por *S. aureus* em vários rebanhos, porém, este microrganismo ainda hoje permanece como o mais presente nas infecções intramamárias (IIM) de bovinos. Tal fato pode ser justificado pela diversidade de subtipos de *S. aureus* envolvidos na etiologia da mamite bovina como tem sido demonstrado por diferentes métodos de genotipagem que incluem a ribotipagem (Aarestrup et al., 1995), RAPD (*randomly amplified polymorphic DNA*) (Fitzgerald et al., 1997), PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*) (Joo et al., 2001), MLEE (*multilocus enzyme electrophoresis*) (Kapur et al., 1995) e a RFLP (Lange et al., 1999; Lipman et al., 1996; Su et al., 2000; Schlegelová et al., 2003).

Dentre as técnicas de tipagem, a PCR-RFLP e o seqüenciamento aplicadas ao estudo do polimorfismo do gene da coagulase têm fornecido resultados satisfatórios para estudos filogenéticos entre amostras de *S. aureus*. O gene que codifica a enzima estafilo-coagulase existe em

formas alélicas múltiplas, em parte devido à existência de variações na extremidade 3'-terminal do gene. Esta porção do gene apresenta seqüências aleatórias repetitivas de 81pb que podem variar em número e sítios de clivagem por enzimas de restrição entre diferentes isolados de *S. aureus* (Goh et al., 1992; Watanabe et al., 2005).

Pesquisas sobre a diversidade populacional de *S. aureus* envolvidos na etiologia da mamite bovina no Brasil são escassas, tampouco se sabe sobre a ocorrência de clones dotados de maior poder patogênico. Um melhor conhecimento sobre a distribuição populacional de *S. aureus*, bem como a identificação de clones mais prevalentes e patogênicos poderá ser útil para o estabelecimento de medidas mais efetivas de prevenção e controle de novas IIM, possibilitando minorar os prejuízos determinados por esse agente. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi estudar, por meio de testes fenotípicos e genotípicos, a diversidade populacional de *S. aureus*, identificando os tipos clonais mais freqüentes na etiologia da mamite em bovinos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais e a associação destes com as formas clínica e subclínica da doença.

## II. MATERIAL E MÉTODOS

### 1-Rebanhos trabalhados

Foram selecionadas para o estudo 35 propriedades leiteiras localizadas na região sul de Minas Gerais, pertencentes aos municípios de Boa Esperança, Bom Sucesso, Carrancas, Cruzília, Ijací, Ingaí, Itumirim, Itutinga, Jesuânia, Lavras, Nazareno, Nepomuceno, Perdões, Oliveira, Ribeirão Vermelho, Santa Rita do Sapucaí, Santana da Vargem, Santana do Jacaré, Santo Antônio do Amparo e Três Corações.

Estabeleceu-se que os rebanhos a serem utilizados no estudo deveriam empregar a ordenha mecânica, ter no mínimo 30 animais em lactação e que o número mínimo de amostras de leite de animais acometidos pela mamite a ser processado para cada propriedade seria de 15.

Nestes rebanhos, no período entre Janeiro de 2004 e Dezembro de 2006, 2.492 vacas lactantes foram submetidas ao teste Tamis (prova da caneca de fundo escuro) e ao California Mastitis Test (CMT), visando o diagnóstico da mamite clínica e subclínica, segundo Veiga (1998). Foram coletadas assepticamente e cultivadas 1.645 amostras de leite de quartos individuais de animais acometidos pela mamite, sendo 238 amostras oriundas de casos clínicos e as demais de casos subclínicos.

## 2-Isolamento e identificação fenotípica de *S. aureus*

As amostras de leite foram pré-incubadas a 37°C por 8-12 horas, seguindo-se à semeadura das mesmas em placas de ágar sangue (Blood Agar Base-Oxoid®, contendo 10% de sangue de carneiro) e incubação a 37°C por 18-24 horas, após o que foram verificadas quanto à presença de crescimento bacteriano.

Amostras que apresentaram crescimento de três ou mais microrganismos diferentes nos meios utilizados para o cultivo foram consideradas contaminadas e descartadas.

Para a triagem de microrganismos da família Staphylococcaceae, foram realizados os seguintes testes presuntivos, de acordo com Quinn et al. (1994): observação macroscópica das colônias, verificando-se a presença de hemólise, tamanho e pigmentação; observação da morfologia microscópica através de esfregaços corados pelo método de Gram e testes de catalase e de oxidase.

Amostras identificadas presuntivamente como *Staphylococcus* spp. foram submetidas ao teste de coagulase, empregando-se o plasma de coelho, de acordo com Quinn et al. (1994). Em seguida, os isolados que apresentaram resultado positivo neste teste foram submetidos a testes bioquímicos adicionais, visando à identificação fenotípica. Estes foram baseados na chave de identificação proposta por Holt et al. (1994), constando de produção de hemólise em ágar sangue,

fermentação de trealose, manitol e maltose e produção de acetoina.

Isolados provenientes de casos clínicos ou subclínicos que foram identificados fenotipicamente como *S. aureus* foram submetidos a testes moleculares que incluíram a PCR, PCR-RFLP e sequenciamento.

## 3-Testes moleculares

Isolados fenotipicamente identificados como *S. aureus* foram submetidos à PCR para a amplificação do gene *femA*, visando à identificação genotípica, seguindo-se a metodologia descrita por Silva e Silva (2005). Os iniciadores utilizados foram *fem1*: 5'-AAA AAA GCA CAT AAC AAG CG-3' e *fem2*: 5'-GAT AAA GAA GAA ACC AGC AG-3', obtidos de seqüências específicas de *S. aureus*, relatadas por Berger-Bachi et al. (1989). A extração e a purificação do DNA foram executadas pelo método descrito por Chen et al. (2001).

Amostras positivas para *femA* foram submetidas à PCR para a amplificação do gene da coagulase e os produtos de PCR submetidos à restrição enzimática, empregando-se a enzima *AluI* (Invitrogen®-Brasil), seguindo-se à análise dos fragmentos de restrição (RFLP).

A amplificação do gene da coagulase foi realizada utilizando-se os iniciadores Coag2-5'- ACC ACA AGG TAC TGA ATC AAC G-3' e Coag3- 5'-TGC TTT CGA TTG TTC GAT GC-3', descritos por Aarestrup et al (1995). As reações de amplificação foram preparadas utilizando-se 4µL de tampão 10X (500mM de KCl; 100mM Tris-HCl pH 8,4; 1% de Triton X-100 e 15mM MgCl<sub>2</sub> composição), 200µmoles de dNTP's, 10 picomoles de cada iniciador, 1 unidade de Taq Polimerase (Phoneutria®-Brasil), 200-400 ng de DNA bacteriano e água ultra-pura esterilizada q.s.p 40 µL. O programa de amplificação adotado consistiu de desnaturação a 94°C por 2 minutos, 40 ciclos (95°C por 30 segundos; 55°C por 2 minutos e 72°C por 4 minutos) e extensão final (72°C por 4 minutos).

A restrição enzimática foi realizada empregando-se 60 µL do produto de amplificação do gene da coagulase que foram precipitados em 120 µL de etanol absoluto, overnight a -20°C, seguindo-se a centrifugação a 14.000 rpm por 30 minutos, descarte do sobrenadante e evaporação dos resíduos de etanol em estufa a 37°C por aproximadamente duas horas. O pellet foi então suspenso em um volume de 10 µL de solução tampão REact 1 (Invitrogen®) contendo a enzima *AluI* (Invitrogen®) na concentração de cinco unidades por reação. A digestão se processou em banho-Maria a 37°C por três horas, seguindo-se à inativação da enzima por aquecimento a 95°C, por 15 minutos.

Para a execução da eletroforese, adicionou-se 1 µL de tampão de amostra 10X (glicerol 3g; azul de bromofenol 25mg; EDTA 500mM pH 8,0 20µL; H<sub>2</sub>O q.s.p 10 mL) a 9 µL dos produtos de PCR ou de digestão enzimática. Empregaram-se géis de agarose a 2%, 100 volts por 90 minutos para os produtos de digestão e géis de agarose a 1,2%, 100 volts por 50 minutos para revelação dos produtos de amplificação. DNA Ladder Invitrogen® de 50, 100pb e 1Kb foram utilizados como marcadores.

Os géis dos produtos de PCR e de RFLP foram corados em solução tampão TAE 1X contendo brometo de etídio na concentração de 15 mg/mL e revelados em transiluminador e as imagens capturadas e processadas por equipamento de fotodocumentação Kodac 1D LE3.6.

A amostra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo para os testes bioquímicos e genotípicos. Como controle negativo dos testes genotípicos foi utilizada a amostra de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

#### **4-Sequenciamento e análise filogenética dos tipos clonais de *S. aureus***

Os produtos de amplificação de cada um dos diferentes tipos eletroforéticos obtidos na PCR-RFLP foram seqüenciados pela MacroGen Inc., Seul/Coréia, utilizando-se os

mesmos iniciadores empregados para a amplificação do gene da coagulase. Empregando-se o Programa MEGA 4 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 4.0*), as seqüências foram alinhadas e obtidas as seqüências consensos que foram submetidas ao BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) do National Center for Biothecnology Information (NCBI). As seqüências consenso foram alinhadas conjuntamente e, após as correções manuais, foram convertidas em seqüências de aminoácidos que foram submetidas ao Programa Open Reading Frames Finder (ORF Finder do NCBI). As seqüências de aminoácidos obtidas no ORF Finder foram submetidas ao BLAST para confirmar a correspondência com a porção 3'-terminal do gene da coagulase, sendo então alinhadas e utilizadas para a construção de árvores filogenéticas. Todas as análises moleculares e filogenéticas foram realizadas utilizando-se o Software MEGA 4 (Tamura et al., 2007).

#### **5-Teste de susceptibilidade a antimicrobianos**

Amostras identificadas genotipicamente como *S. aureus* foram submetidas a testes de susceptibilidade a antimicrobianos, utilizando-se o método de difusão em placa de acordo com as normas do National Committee for Clinical Laboratory Standarts (Performance, 2003). Foram testados os seguintes antimicrobianos (Sensifar - Cefar®-Brasil): ampicilina (AMP), cefalotina (CEF), cefotaxima (CTX), cefoperazona (CPZ), ceftiofur (CFT), cloranfenicol (CLO), enrofloxacina (ENR), florfenicol (FLO), gentamicina (GEN), lincomicina (LIN), neomicina (NEO), nitrofurantoina (NIT), novobiocina (NVB), polimixina B (POL), penicilina G (PEN), oxacilina (OX), sulfazotrim (SZT), tetraciclina (TET) e cefquimona (CFQ) (Intervet-Brasil), associações de penicilina, nafcilina e dihidroestreptomicina (NAF) - (Intervet-Brasil) e neomicina, bacitracina e tetraciclina (NBT) - (Intervet-Brasil). A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com os padrões do NCCLS e os parâmetros fornecidos pela Intervet-Brasil. Amostras que se apresentaram moderadamente

sensíveis aos antibióticos testados foram interpretadas como resistentes.

As amostras de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foram utilizadas para controle dos testes de antibiograma.

### 6-Análise dos dados

Os testes moleculares utilizados foram analisados quanto à capacidade discriminatória, tipabilidade e reprodutibilidade. A tipabilidade refere-se à capacidade de o teste gerar resultado positivo inequívoco, enquanto a reprodutibilidade refere-se à repetibilidade e à estabilidade em testes consecutivos. O valor obtido para ID determina a probabilidade de duas amostras selecionadas ao caso na população estudada serem relacionadas em grupos distintos.

Os Índices Discriminatórios (ID) dos testes de antibiograma e para a PCR-RFLP foram obtidos utilizando-se a equação descrita por Hunter e Gaston (1988):

$$ID = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s (n_j - 1)$$

ID = índice discriminatório

N = n° de isolados da população teste

s = n° total de tipos diferentes

n<sub>j</sub> = n° de isolados representando cada tipo

As distribuições de freqüências obtidas para os diferentes clones em relação às formas clínica e subclínica da mamite foram comparadas por meio do teste do Qui-quadrado, empregando-se o Programa Epi-Info (CDC–WHO, versão 6.04b, 1997).

### III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as 1.645 amostras de leite analisadas, 122 amostras não apresentaram crescimento de microrganismos e 14 foram descartadas devido a indícios de contaminação.

*Staphylococcus* coagulase-positivos (SCP), com 583 amostras, foram os agentes predominantes, representando 34,29% dos agentes isolados, sendo 58 amostras (9,94%) obtidas de casos clínicos e as demais 525 (90,06%) de casos subclínicos. Este microrganismo foi encontrado em 34 (97,14%) das propriedades, demonstrando a sua ampla disseminação entre os rebanhos estudados.

Dentre as amostras identificadas fenotipicamente como *S. aureus*, 360 que incluíram todas aquelas obtidas de casos clínicos (58) e outras 302 provenientes de casos subclínicos, selecionadas ao acaso entre os diferentes rebanhos, foram submetidas à identificação genotípica (PCR para *femA*). Destas amostras, 352 (97,77%) foram genotipicamente confirmadas como *S. aureus* e submetidas à PCR para amplificação do gene da coagulase, verificando-se resultado positivo para todas. A Figura 1 ilustra o resultado de uma eletroforese para o gene *femA*, observando-se o amplicom característico de 132 pares de bases (pb).

A PCR para amplificação do gene da coagulase gerou 10 padrões diferentes de amplicons cujos tamanhos variaram aproximadamente entre 450 e 1.150 pb, indicando a ocorrência de variações no número de unidades repetitivas de 81 pb, na região gênica amplificada. A eletroforese de alguns dos amplicons obtidos pode ser observada na Figura 2.

Todos os produtos de amplificação do gene da coagulase foram digeridos pela enzima *AluI*, gerando 18 padrões de restrição diferentes (Tabela 1). Alguns dos tipos eletroforéticos observados na RFLP encontram-se na Figura 3.

A reprodutibilidade e a tipabilidade verificadas para a PCR e para a RFLP foram de 100%, embora tenha ocorrido variação na intensidade de bandas em diferentes ensaios de amplificação e de digestão para um mesmo isolado.

Verificou-se o predomínio do tipo clonal I, que representou 75,85% dos isolados e foi encontrado em 82,25% dos rebanhos, seguido pelos tipos clonais VII, IV, III e XIII. Juntos estes cinco tipos clonais representaram 92,32% dos *S. aureus* isolados. Dentre os 34 rebanhos positivos para *S. aureus*, 12 (34,28%) apresentaram um único tipo eletroforético na PCR-RFLP, sendo predominante o tipo I que foi constatado em 10 (83,33%) destes rebanhos. Verificou-se a ocorrência de dois tipos clonais em 14 rebanhos, enquanto nos demais foram observados entre três e quatro tipos eletroforéticos. A presença de poucos tipos clonais dentro dos rebanhos sugere o padrão de dispersão vaca-a-vaca, por outro lado, a diversidade populacional intensa dentro de um mesmo rebanho pode estar relacionada com o trânsito intenso de animais, o que poderia facilitar a introdução de tipos clonais diferentes daqueles existentes previamente na propriedade.

Estudos sobre a diversidade populacional de *S. aureus* empregando a PCR-RFLP foram previamente realizados no Brasil, mas apresentaram limitações quanto ao número de amostras e de rebanhos analisados. Lange et al. (1999) estudaram 66 isolados de *S. aureus* obtidos de mamite subclínica em rebanhos do sul do Brasil. Verificaram, na PCR, fragmentos variando entre 580 e 1.060 pb e 14 padrões diferentes na RFLP, mas o trabalho não especificou os tipos clonais identificados. Silva e Silva (2005)

submeteram à PCR-RFLP 64 amostras do mesmo microrganismo obtidas de diferentes rebanhos de Minas Gerais. Relataram o encontro de 27 tipos de amplicons e 49 padrões eletroforéticos na RFLP, alguns deles encontrados no presente trabalho. Estudos de RFLP realizados por Silveira-Filho et al. (2005), em amostras de *S. aureus* provenientes de dois rebanhos do estado de Pernambuco, também apontaram a existência do tipo clonal I, predominantemente encontrado no presente trabalho, o que demonstra a ocorrência deste tipo clonal em outras regiões do Brasil.

A análise das distribuições de frequências dos tipos clonais mais frequentes obtidos na RFLP (Tab. 2) não mostrou o predomínio de nenhum deles na forma clínica ou subclínica da mamite ( $P=0,83$ ). Tal fato sugere que os diferentes tipos clonais identificados na PCR-RFLP podem estar igualmente envolvidos na forma clínica ou subclínica da mamite ou que este teste não teria a capacidade de fazer a discriminação dos isolados quanto à esta característica.

Quanto ao seqüenciamento, as seqüências consenso obtidas para cada uma das amostras analisadas que foram submetidas ao BLAST exibiram grande homologia com seqüências codificadoras da porção C-terminal do gene da estafilocagulase de *S. aureus* depositadas no NCBI (Fig. 4).

O alinhamento das seqüências de nucleotídeos apontou a existência de regiões conservadas e de regiões bastante variáveis entre as amostras analisadas (Fig. 5 e 6), conforme relatado por Watanabe et al. (2005), e os sítios de restrição para *AluI* (Fig. 7).

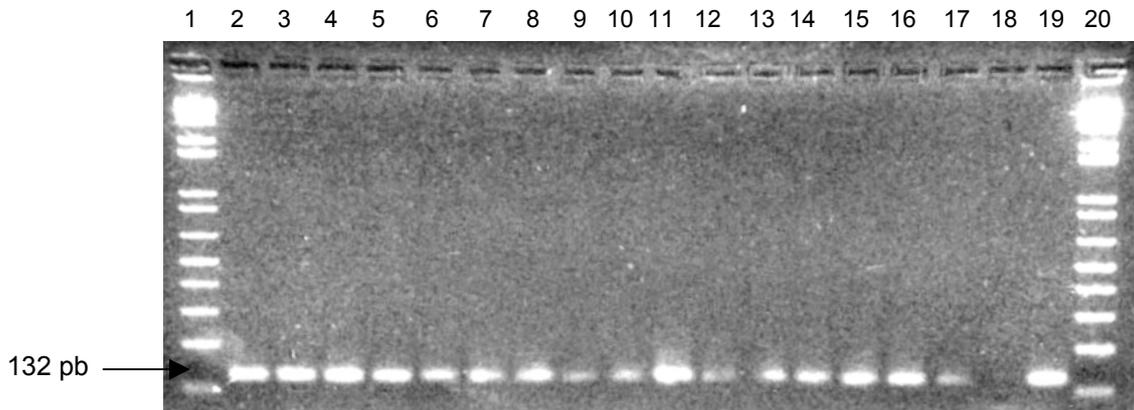


Figura1. Eletroforese em gel de agarose a 1,2% dos produtos de amplificação do gene *femA*. Canaletas 1 e 20 DNA Ladder 1Kb Plus (Invitrogen-Brasil); canaletas; 2-17 amostras *femA*-positivas; canaleta 18 controle negativo *S. epidermidis* ATCC 12228; canaleta 19 controle positivo *S. aureus* ATCC 25923

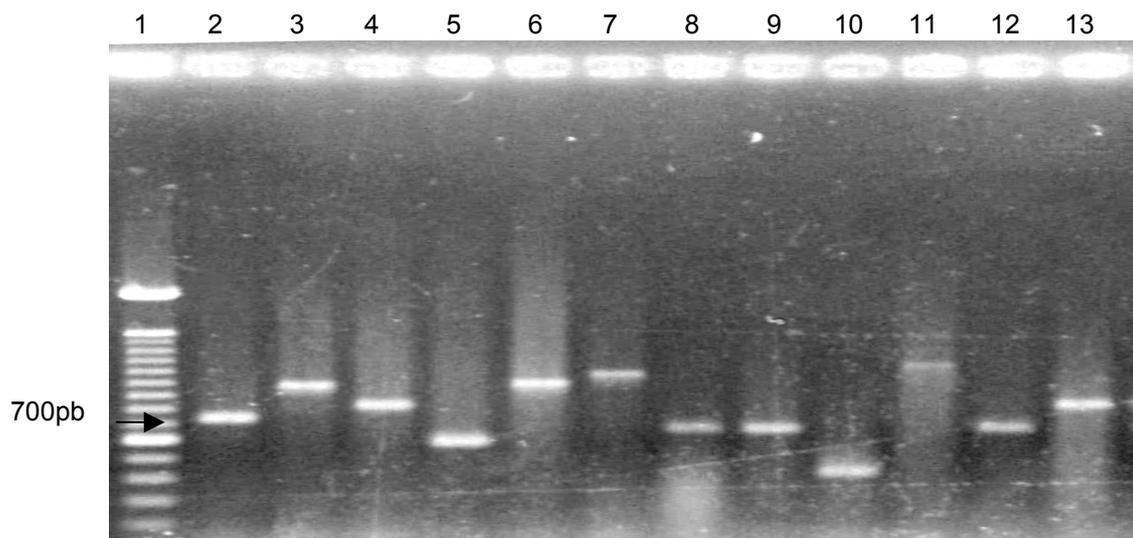


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose a 1,2% dos produtos de amplificação do gene da coagulase. Canaleta 1: DNA Ladder 100 pb (Invitrogen-Brasil); canaletas 2-13 diferentes padrões de amplicons observados

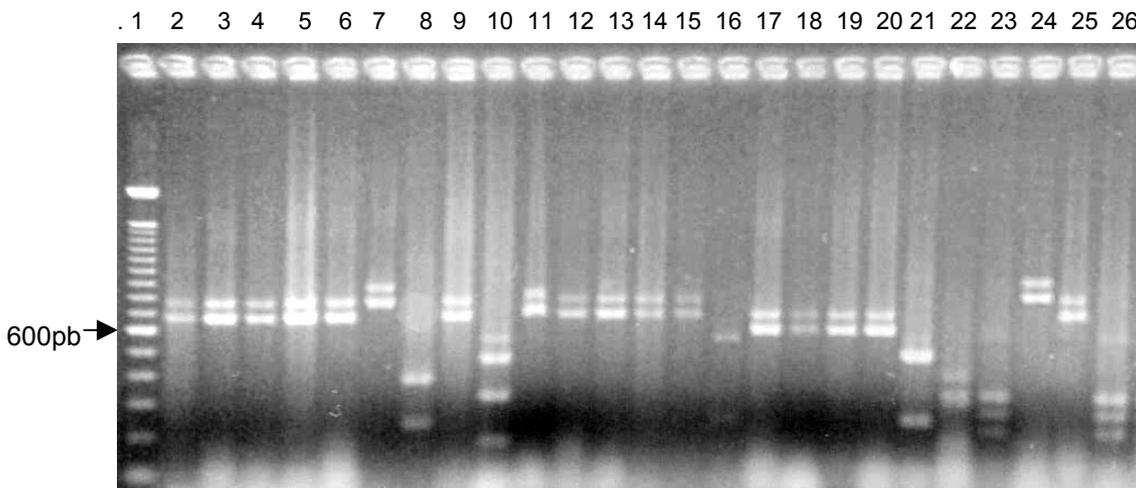


Figura 3. Eletroforese dos produtos de digestão do amplicon do gene da coagulase, empregando-se a enzima *AfuI*. Canaleta 1: DNA Ladder 100pb (Invitrogen-Brasil) – canaletas 2-6; 11-15 e 25 tipo I; canaletas 17-20 tipo VII; canaletas 7 e 24 tipo XIII; canaleta 8: tipo X; canaleta 10: tipo II; canaleta 16: tipo VI; canaleta 21: tipo IV; canaleta 22: tipo XII; canaletas 23 e 26 tipo III

Verificou-se a ocorrência de duas a sete unidades repetitivas (UR) após o alinhamento das seqüências de nucleotídeos ou de aminoácidos para as diferentes amostras analisadas. As Figuras 8 e 9 ilustram o alinhamento de nucleotídeos e de aminoácidos demonstrando a inserção de URs em diferentes isolados de *S. aureus*. A Figura 10 ilustra as seqüências de aminoácidos obtidas, destacando as unidades repetitivas.

O número de URs é variável entre amostras de *S. aureus*, segundo diversos autores consultados. Kanemitsu et al. (2001) relataram a presença de quatro a oito URs em produtos de seqüenciamento da região 3'terminal do gene da coagulase de 22 isolados de *S. aureus*, dentre os quais 10 isolados representando os sorotipos

padrões da estafiloagulase. Já Watanabe et al. (2005) verificaram entre cinco e oito URs, compostas por 27 resíduos de aminoácidos, com identidade média de 92% entre os nucleotídeos, entre amostras representativas dos dez tipos de estafiloagulase. Em outro trabalho, Shopin et al. (2000) relataram o encontro de três a seis unidades repetitivas entre 54 isolados de *S. aureus* metilicina-resistentes de origem humana.

A função das URs e as razões para seu polimorfismo são desconhecidas, mas, pelo fato de se encontrarem fora do sítio ativo da enzima, as variações podem não trazer nenhuma alteração para virulência do microrganismo (Schwarzkopf e Karch, 1994).

Tabela 1. Tipos eletroforéticos observados no estudo de restrição enzimática dos produtos de amplificação do gene da coagulase, empregando-se a enzima *A<sub>1</sub>uI*, em 352 amostras de *Staphylococcus aureus* procedentes de 35 rebanhos leiteiros do sul de Minas Gerais, no período de Março de 2004 a Dezembro de 2006

Tipos Eletroforéticos	Amplicon (pb)	Produtos de Restrição (pb)	Total (%)	Rebanhos Positivos (%)
I	730	41, 52, e 637	267 (75,85)	32 (84,21)
II	1000	550; 450; 350 e 200	4 (1,13)	3 (7,89)
III	850	300, 280 e 220	12 (3,40)	6 (15,78)
IV	700	480 e 220	13 (3,69)	10 (26,31)
V	1150	450, 300 e 150	1 (0,28)	1 (2,63)
VI	800	550 e 250	5 (1,42)	2 (5,26)
VII	650	24, 68, 560	24 (6,81)	5 (13,15)
VIII	780	300, 280 e 200	3 (0,85)	2 (5,26)
IX	800	450; 400; 250 e 200	2 (0,56)	2 (5,26)
X	600	400 e 200	1 (0,28)	1 (2,63)
XI	900	450; 350; 220 e 80	3 (0,85)	2 (5,26)
XII	1100	400; 300; 200 e 100	1 (0,28)	1 (2,63)
XIII	820	91 e 729	9 (2,55)	2 (5,26)
XIV	1000	550; 450; 300 e 180	1 (0,28)	1 (2,63)
XV	1000	550; 450; 300; 200; 100	2 (0,56)	1 (2,63)
XVI	450	350 e 100	1 (0,28)	1 (2,63)
XVII	1000	450; 300; 180 e 80	2 (0,56)	1 (2,63)
XVIII	1150	550; 450; 350; 200 e 100	1 (0,28)	1 (2,63)
<b>Total</b>	-	-	352 (100)	-

Tabela 2. Associação entre os tipos clonais mais comuns de *Staphylococcus aureus* obtidos na RFLP com casos clínicos e subclínicos de mamite

Tipos clonais	Casos clínicos	Casos subclínicos	Total
I	42	225	267
VII	5	19	24
IV	1	12	13
III	1	11	12
XIII	1	8	9
<b>Outros</b>	3	24	27
<b>Total</b>	53	299	352

As seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos corrigidas foram utilizadas para a construção de árvores filogenéticas, empregando-se o método de “neighbor-joining”, com “bootstrap” de 1000 replicatas. A seqüência AB158522.1, depositada no NCBI, que apresentou alta homologia com algumas das seqüências submetidas ao BLAST, foi utilizada como referência nos testes filogenéticos.

Embora tenham ocorrido variações na disposição de algumas amostras nos clusters, as árvores filogenéticas obtidas para as seqüências de nucleotídeos e aminoácidos foram bastante semelhantes (Fig. 11 e 12), em ambos os casos, demonstrando haver uma grande similaridade filogenética entre as amostras analisadas. Os isolados de números 51, 100, 128 e 168 foram aqueles que apresentaram as maiores distâncias em relação às demais amostras analisadas.

Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos resultaram em 54 padrões de resistência diferentes (Fig. 13 e 14). Isolados resistentes à penicilina G, polimixina B e à ampicilina e sensibilidade às demais drogas testadas constituíram o padrão de resistência predominante, perfazendo 34,09% dos isolados, com ampla disseminação (73,68%) entre os rebanhos analisados. Por outro lado, 16 amostras, representando 4,54% dos isolamentos, distribuídas entre oito rebanhos, foram sensíveis a todos os antibióticos testados.

Os maiores índices de resistência foram observados para a polimixina B, penicilina e ampicilina, seguidas por lincomicina e tetraciclina. Os perfis de susceptibilidade obtidos encontram-se de acordo com os observados por Cardoso et al. (2000) que também verificaram índices elevados de resistência para penicilina G, ampicilina, polimixina B, tetraciclina e lincomicina para amostras de *S. aureus* isoladas de rebanhos leiteiros de Minas Gerais, no período de 1994-1997. Elevados índices de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em isolados de *S. aureus* têm sido citados na literatura

(Riedner et al., 1987; Langoni et al., 1991; Donatele et al., 2002). Contudo, perfis de susceptibilidade diferentes foram relatados por Lange et al. (1999), que embora tenham verificado altos índices de resistência à penicilina e à ampicilina, constataram que 48% dos isolados de *S. aureus* provenientes de rebanhos leiteiros do sul do Brasil eram sensíveis a todos os antibióticos testados. Perfis diferentes também foram relatados por Silveira-Filho et al. (2005) que verificaram índices de resistência superiores a 50% para gentamicina, lincomicina, tetraciclina e oxacilina em rebanhos leiteiros do Estado de Pernambuco.

Não se observou a associação de nenhum dos tipos eletroforéticos obtidos na PCR-RFLP com os padrões de resistência aos antimicrobianos, verificando-se que dentre os 14 rebanhos nos quais ocorreu um único padrão eletroforético na PCR-RFLP, nove (64,28%) apresentaram quatro ou mais perfis diferentes de sensibilidade diferentes (dados não apresentados). Tal observação pode ser explicada pelo fato de as características estudadas serem independentes, sendo os resultados da PCR-RFLP foram obtidos a partir do estudo do polimorfismo do gene da coagulase, gene cromossômico, enquanto o perfil de resistência antibiótica, além de ser um teste fenotípico, é uma característica determinada normalmente por elementos genéticos móveis (Hurtado et al, 2002).

Foram obtidos valores de 0,41 e 0,857 para os índices discriminatórios da PCR-RFLP e para o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, respectivamente. O ID obtido para a PCR-RFLP foi considerado baixo de acordo com Hunter e Gaston (1988), segundo os quais um bom ID deve ter valor superior a 0,90. Contudo, o baixo ID obtido pode ser explicado pela estratégia de delineamento adotada, na qual foram trabalhados rebanhos distintos, mas de uma mesma mesorregião, na qual se observou marcante predomínio do tipo clonal I. Trabalhos semelhantes realizados por Aarestrup et al. (1995), na Dinamarca, e Raimundo et al. (1999), na Austrália, geraram elevados ID realizados com

amostras de *S. aureus* de diferentes origens. No Brasil, Silva (2004) verificou um ID de 0,99 para a PCR-RFLP do gene da coagulase, entretanto, no trabalho da referida autora, foram constados 49 tipos eletroforéticos entre 64 amostras de *S. aureus* oriundas de rebanhos bovinos do Estado de Minas Gerais, sem a existência de tipos clonais predominantes, o que contraria a literatura. O alto ID obtido para os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos (0,857), é resultado da grande diversidade de padrões de resistência observados, uma vez que se constatou a existência de ampla variação nos padrões de resistência para os isolados dentro e entre rebanhos.

Os resultados obtidos demonstraram existência de uma ampla diversidade populacional entre as amostras de *S. aureus* envolvidas na etiologia da mamite nos rebanhos da região estudada, mas com a existência de clones predominantes dentro e entre rebanhos. Os conhecimentos obtidos no presente estudo podem proporcionar as bases para que programas

preventivos, fundamentados na imunoprofilaxia e no direcionamento das medidas de prevenção e de controle os para clones envolvidos nas formas economicamente mais relevantes da doença, possam ser desenvolvidos.

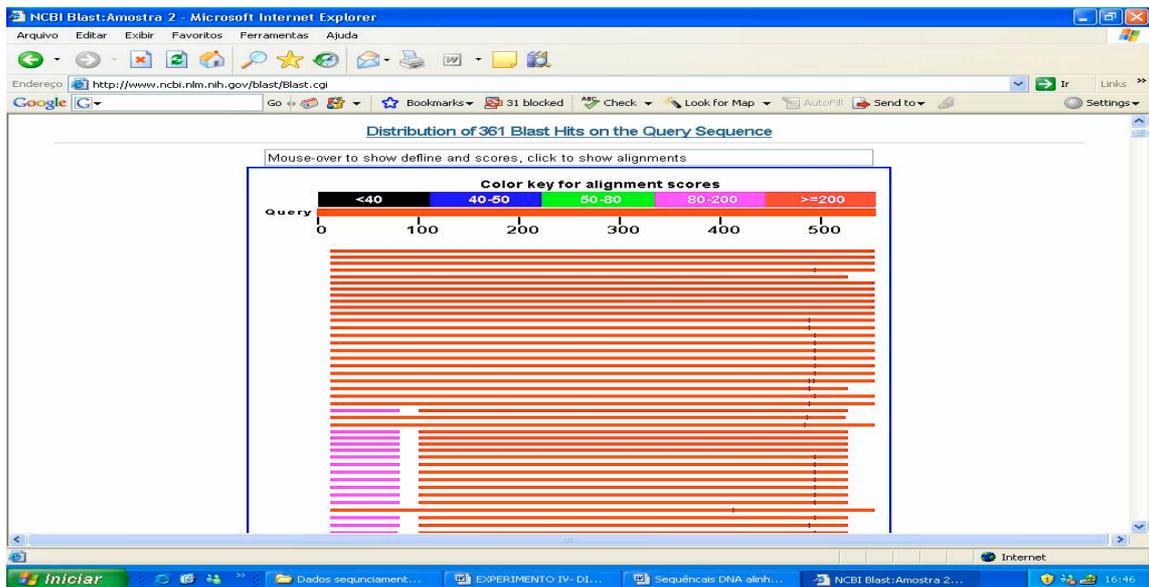
#### **IV. CONCLUSÕES**

Apesar da grande diversidade populacional de *S. aureus* envolvidos na etiologia da mamite bovina, existem clones predominantes que respondem pela maioria das infecções e que são comuns aos rebanhos da região estudada.

Não se verificou a associação entre os tipos clonais de *S. aureus* predominantes observados na PCR-RFLP com a forma de apresentação da doença e nem com nenhum dos diferentes padrões de resistência aos antimicrobianos.

Existe grande similaridade filogenética entre os diferentes tipos clonais de *S. aureus* encontrados na PCR-RFLP.





Sequences producing significant alignments:  
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
<a href="#">BA000033.2</a>	Staphylococcus aureus subsp. aureus MW2 DNA, complete genome	791	1974	97%	0.0	93%	
<a href="#">BX571857.1</a>	Staphylococcus aureus strain MSSA476, complete genome	785	1951	97%	0.0	93%	
<a href="#">AB158555.1</a>	Staphylococcus aureus genes for hypothetical proteins, staphylocoaql	769	2146	97%	0.0	92%	
<a href="#">AB158552.1</a>	Staphylococcus aureus genes for hypothetical proteins, staphylocoaql	737	2204	97%	0.0	94%	
<a href="#">U20794.1</a>	Staphylococcus aureus fibrinogen binding protein (fbpA) gene, comple	732	2121	92%	0.0	92%	
<a href="#">AP009351.1</a>	Staphylococcus aureus subsp. aureus str. Newman DNA, complete ge	725	2067	97%	0.0	91%	
<a href="#">CP000046.1</a>	Staphylococcus aureus subsp. aureus COL, complete genome	725	2067	97%	0.0	91%	
<a href="#">CP000253.1</a>	Staphylococcus aureus subsp. aureus NCTC 8325, complete genome.	725	2067	97%	0.0	91%	
<a href="#">AC025591.8</a>	Staphylococcus aureus clone sabac-134, complete sequence	725	2067	97%	0.0	91%	
<a href="#">AJ938182.1</a>	Staphylococcus aureus RF122 complete genome	725	1772	97%	0.0	93%	
<a href="#">X17679.1</a>	Staphylococcus aureus coa gene for coagulase	713	2028	97%	0.0	91%	
<a href="#">AB158551.1</a>	Staphylococcus aureus genes for hypothetical proteins, staphylocoaql	682	2831	97%	0.0	92%	
<a href="#">AB158553.1</a>	Staphylococcus aureus genes for hypothetical proteins, staphylocoaql	671	3481	97%	0.0	92%	
<a href="#">AP009324.1</a>	Staphylococcus aureus subsp. aureus Mu3 DNA, complete genome	660	2420	97%	0.0	92%	
<a href="#">CP000736.1</a>	Staphylococcus aureus subsp. aureus JH1, complete genome	660	2409	97%	0.0	91%	
<a href="#">CP000703.1</a>	Staphylococcus aureus subsp. aureus JH9, complete genome	660	2409	97%	0.0	91%	
<a href="#">BA000017.4</a>	Staphylococcus aureus subsp. aureus Mu50 DNA, complete genome	660	2420	97%	0.0	92%	
<a href="#">BA000018.3</a>	Staphylococcus aureus subsp. aureus N315 DNA, complete genome	660	2420	97%	0.0	92%	
<a href="#">X16457.1</a>	Staphylococcus aureus gene for staphylocoagulase	660	2414	97%	0.0	92%	
<a href="#">D00184.1</a>	Staphylococcus aureus gene for staphylocoagulase, complete cds	654	2440	97%	0.0	91%	
<a href="#">AJ306908.1</a>	Staphylococcus aureus coa gene for coagulase	654	1702	92%	0.0	93%	
<a href="#">AB158554.1</a>	Staphylococcus aureus genes for hypothetical proteins, staphylocoaql	632	1933	97%	4e-178	90%	
<a href="#">AB158550.1</a>	Staphylococcus aureus genes for hypothetical proteins, staphylocoaql	627	2415	97%	2e-176	91%	
<a href="#">AB042581.1</a>	Staphylococcus aureus coa gene for coagulase, partial cds, strain:SMI	616	2006	76%	4e-173	92%	
<a href="#">AY225090.1</a>	Staphylococcus aureus strain Taqer 104 staphylocoagulase gene, parl	606	2552	92%	2e-170	92%	
<a href="#">AB158549.1</a>	Staphylococcus aureus genes for hypothetical proteins, staphylocoaql	603	2569	97%	3e-169	92%	
<a href="#">AB046217.1</a>	Staphylococcus aureus gene for coagulase, partial cds, strain:SMUM7	593	1798	76%	2e-166	92%	

Figura 4. BLAST do produto de seqüenciamento do isolado de *Staphylococcus aureus* de número 2 (Tipo eletroforético I da PCR-RFLP), confirmando a qualidade do seqüenciamento







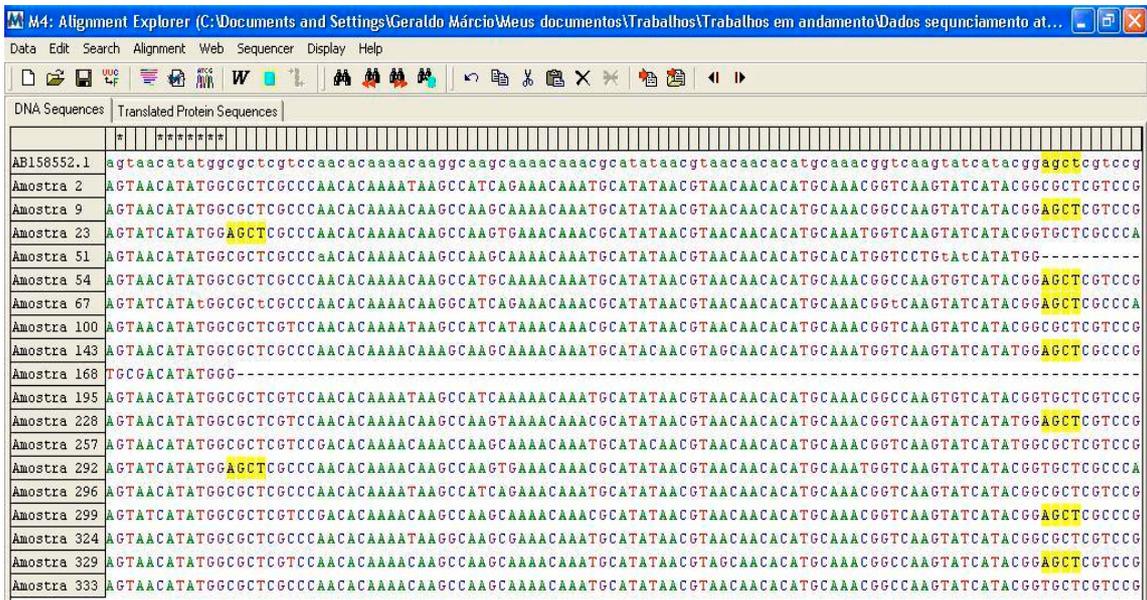


Figura 7. Alinhamento de aminoácidos da porção 3'-terminal do gene da coagulase, demonstrando os sítios de restrição para *AfuI*

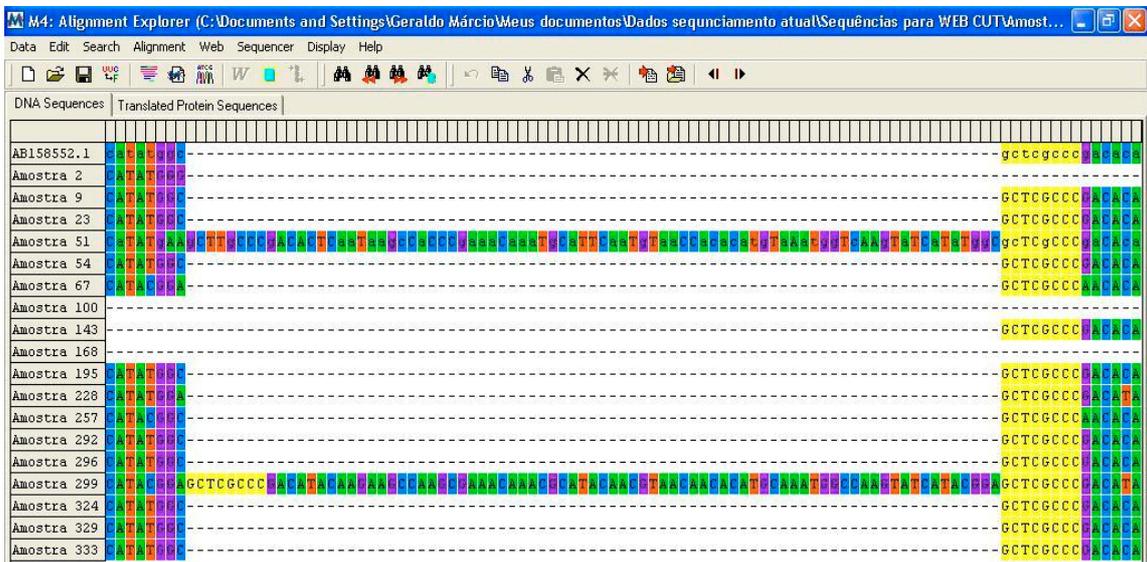


Figura 8. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos obtidas do sequenciamento da porção 3'-terminal do gene da coagulase, demonstrando a inserção de duas unidades repetitivas de 81 pares de bases nas amostras 51 e 299



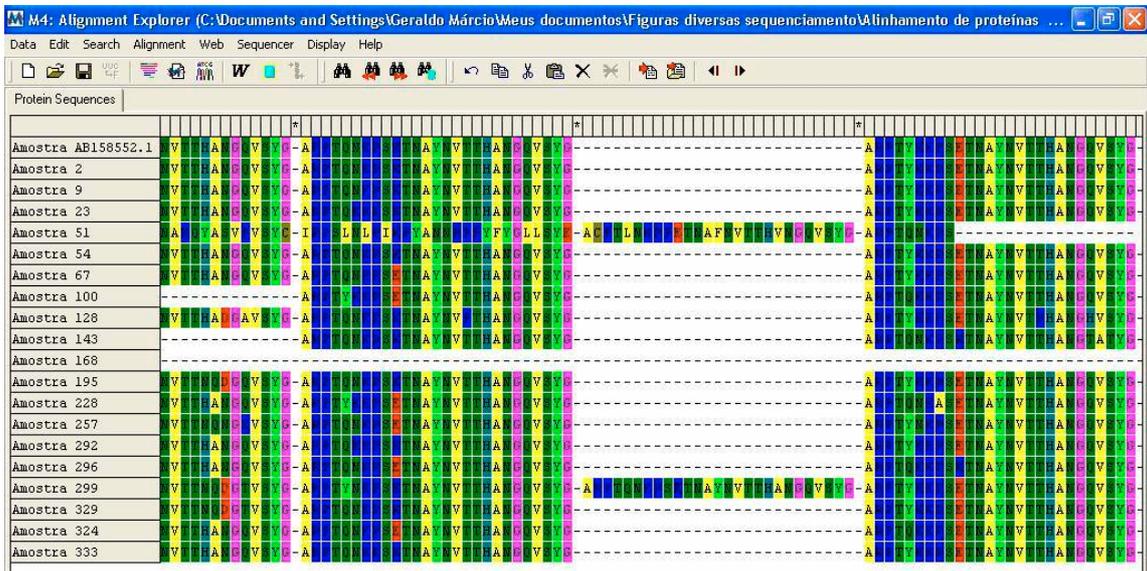


Figura 9. Alinhamento de aminoácidos da porção 3'-terminal do gene da coagulase, exibindo algumas das unidades repetitivas presentes nas amostras analisadas



Figura 10. Arquivo de texto, exibindo o alinhamento de aminoácidos da porção 3'-terminal do gene da coagulase, ilustrando as unidades repetitivas encontradas nas amostras analisadas

**>Amostra AB158552.1**

```
PQASETKFNKTPKYVKYRDAGTGIREYNDGTFGYE
ARPRFNKPSETNAYNVTTNQDGTVTYG
ARPTQNKASKTNAYNVTTTHANGQVSYG
ARPTYKKPSKTNAYNVTTTHANGQVSYG
ARPTQNKPSKTNAYNVTTTHANGQVSYG
ARPTYKKPSETNAYNVTTTHANGQVSYG
ARPTQKKPSETNAYNVTTHADGTATYG
PRVTK
```

**>Amostra 2**

```
PQGSDKEFNKTPKYVKYRDAGTGIREYNDGTFGYE
ARPRFNKPSETNAYNVTTNQDGTVTYG
ARPTQNKPSETNAYNVTTTHANGQVSYG
ARPTYKKPSETNAYNVTTTHANGQVSYG
ARPTQNKPSETNAYNVTTTHANGQVSYG
ARPTQKKPSETNAYNVTTHADGTATYG
PRVTK
```

**>Amostra 9**

```
PQATETKFNKTPKYVKYRDAGTGIREYNDGTFGYE
ARPRFNKPRETNAYNVTTNQDGTVTYG
ARPTQNKPSKTNAYNVTTTHANGQVSYG
ARPTYKKPSKTNAYNVTTTHANGQVSYG
ARPTQNKPSKTNAYNVTTTHANGQVSYG
ARPTYKKPSETNAYNVTTTHANGQVSYG
ARPTQKKPSETNAYNVTTHADGTATYG
PRVTK
```

**>Amostra 23**

```
PQATETKFNKTPKYVKYRDAGTGIREYNDGTFGYE
ARPRFNKPSETNAYNVTTNQDGTVSYG
ARPTQNKPSETNAYNVTTTHANGQVSYG
ARPTQNKPSKTNAYNVTTTHANGQVSYG
ARPTQKKPSKTNAYNVTTTHANGQVSYG
ARPTYKKPSETNAYNVTTTHANGQVSYG
ARPTQKKPSETNAYNVTTHADGTATYG
PRVTK
```

**>Amostra 51**

```
PQASEEKFNKTPKYVKYRDAGTGIREYNDGTFGYE
ARPRFNKPSETNAYNVTTNQDGTVTYG
ARPTQNKPSKTNAYNVTTTHAHGPVSYG
ASLTKYNSSKTNAFNAKQYASVPVSYC
IRPSLNLPIKPYANNPPYFYGLLSYE
ACPTLNKPPETNAFNVTTTHVNGQVSYG
ARPTQNKPS
```

Figura 10: cont.

**>Amostra 54**

PQASETKFNKTPKYVKYRDAGTGIREYNDGTFGYE  
ARPRFNKPSETNAYNVTTNQDGTVTYG  
ARPTQNKPKCTNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTYKKPSKTNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTQNKPSKTNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTYKKPSETNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTQKKPSETNAYNVTTTHADGTATYG  
PRVTK

Seis seqüências  
repetitivas

**>Amostra 67**

PQATETKFNKTPKYVKYRDAGTGIREYNDGTFGYE  
ARPRFNKPSETNAYNVTTNQDGTVSYG  
ARPTQNKASETNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTQKKPSETNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTQNKPSETNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTYKKPSETNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTQNKPSETYAYNVTTTHADGPASYG  
PRVTK

Seis seqüências  
repetitivas

**>Amostra 100**

AQGPEENFNKQPNYVKYIDAGTGSREYYYGTFGYE  
ARPRFNKPSETNAYDVTTNQDGTVTYG  
ARPTQNKPSKTNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTYKKPSETNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTQKKPSETNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARVT

Quatro seqüências  
repetitivas

**>Amostra 128**

PQTSETQFKTCLKGVYSPADRGIDESNVVTSAYE  
ARPGFGEATETNAYNVTTTSDGTVTYG  
ARPTQNKASKTNAYNVTTLANGHVSYG  
ARPTYKKPSETNAYNVTTTHADGAVSYG  
ARPTQNKPSKTNAYNVTPHANGQVSYG  
ARPTYKKPSETNAYNVTPHANGHVSYG  
ARPTLTKPSDTNAYNVSS

Cinco seqüências  
repetitivas

**>Amostra 143**

PQASETNFNKTPKYVKYRDAGTGIREYNDGTFGYE  
ARPRFNKPSETNAYNVTTNQDGTVTYG  
ARPTQNKASKTNAYNVATHANGQVSYG  
ARPTQNKPSKTNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTQNKPSKTNAYNVTTTHANGTATYG  
PRVT

Quatro seqüências  
repetitivas

**>Amostra 168**

PQATETKFNKTPKYVKYRDAGTGIREYNDGTFGYE  
ARPRFNKPSKTNAYNVTTTHADGTATYG  
PRVTQNKFITLPNDITVNTKHYVSYDS  
NHAFDDAC

Duas seqüências  
repetitivas

Figura 10: cont.

**>Amostra 195**

PQTPETQFNKTPKYVKYRDAGTGIREYNDGTFGYE  
ARPRFNKPSETNAYNVTTNQGDTVYTG  
ARPTQNKPSKTNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTYKKPSKTNAYNVTTNQGQVSYG  
ARPTQNKPSKTNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTYKKPSETNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTQKKPSKTNAYNVTTTHANGPVSYG  
ARATK

Seis seqüências  
repetitivas

**>Amostra 228**

PQASETGFNKTTKYVKYRDAGTGIREYNDGTFGYE  
ARPRFNKPSETNAYNVTTNQGDTVYTG  
ARPTQNKPSKTNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTHKKPSKTNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTYKKPSETNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTQNKASETNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTYNKPSETNAYNVTTTHADGTATYG  
PRVTK

Seis seqüências  
repetitivas

**>Amostra 257**

PQATETGFNKTPKYVKYRDAGTGIREYNDGTFGYE  
ARPRFNKPSETNAYNVTTNQGDTVYTG  
ARPTQNKPSKTNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTYKKPSETNAYNVTTNQNKGVSYG  
ARPTQNKPSETNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTYNKPSETNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTQKKPSKTNAYNVTTTHADGTATYG  
PRVTK

Seis seqüências  
repetitivas

**>Amostra 292**

PQAPETGFNKTPNYVKYRDDGTGIREYNDGTFGYE  
ARPRFNKPSETNAYNVTTNQGDTVSYG  
ARPTQNKPSETNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTQNKPSKTNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTQKKPSKTNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTYKKPSETNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTQKKPSETNAYNVTTTHADGTATYG  
PRVTK

Seis seqüências  
repetitivas

**>Amostra 296**

PQASETGFNKTPKYVKYRDAGTGIREYNDGTFGYE  
ARPRFNKPSETNAYNVTTNQGDTVYTG  
ARPTQNKPSETNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTYKKPSETNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTQNKPSETNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTQKKPSKTNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTQKKPSETNAYNVTTTHADGTATYG  
PRVTK

Seis seqüências  
repetitivas

Figura 10: cont.

**>Amostra 299**

PQASETKNKTPKYVKYRDAGTGIREYNDGTFGYE  
ARPRFNKPSETNAYNVTTTHADGTVSYG  
ARPTQNKPSKTNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTQNKPSETNAYNVTTNQGDTVSYG  
ARPTYNKPSTNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTQNKPSKTNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTYKKPSETNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTYKKPSETNAYNVTTTHADGTATYG  
PRVTK

Seis seqüências  
repetitivas

**>Amostra 329**

PQATETKNKTPKYVKYRDAGTGIREYNDGTFGYE  
ARPRFNKPSETNAYNVTTNQGDTVTYG  
ARPTQNKPSKTNAYNVATHANGQVSYG  
ARPTYKKPSKTNAYNVTTNQGDTVSYG  
ARPTQNKPSKTNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTYKKPSETNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTQKKPSETNAYNVTTTHADGTATYG  
PRVTK

Seis seqüências  
repetitivas

**>Amostra 324**

PLTSERKNKTPKYVKYRDAGTGIREYNDGTFGYE  
ARPRFNKPSETNAYNVTTNQGDTVTYG  
ARPTQNKASETNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTYKKPSKTNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTQNKPSETNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTQKKPSETNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTQKKPSETNAYNVTTTHADGTATYG  
PRVTK

Seis seqüências  
repetitivas

**>Amostra 333**

PQASEVKNKTPKYVKYRDAGTGIREYNDGTFGYE  
ARPRFNKPSETNAYNVTTNQGDTVTYG  
ARPTQNKPSKTNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTYKKPSKTNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTQNKPSKTNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTYKKPSETNAYNVTTTHANGQVSYG  
ARPTQKKPSETNAYNVTTTHADGTASYG  
PRATK

Seis seqüências  
repetitivas

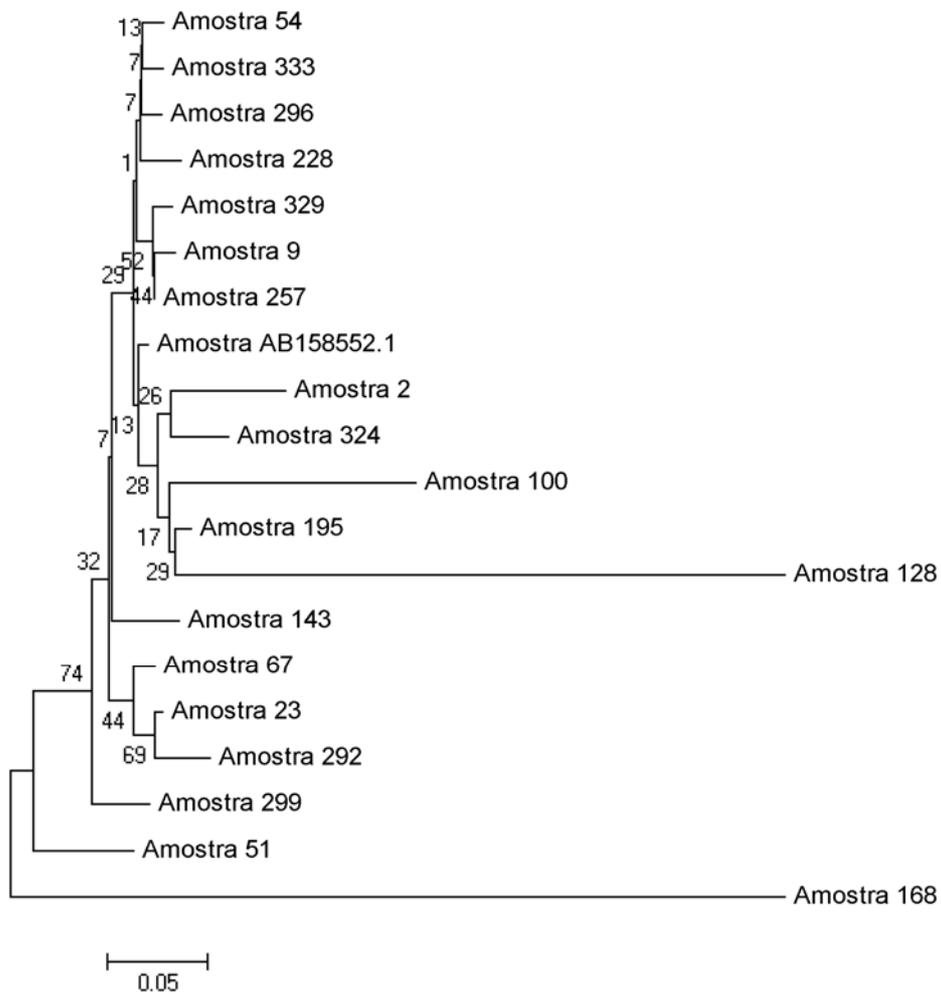


Figura 11. Relação filogenética baseada na seqüência de aminoácidos da porção 3'-terminal do gene da coagulase de 19 amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mamite em bovinos da região sul do Estado de Minas Gerais, utilizando-se o método de *neighbor-joining* com *bootstrap* de 1.000 replicatas

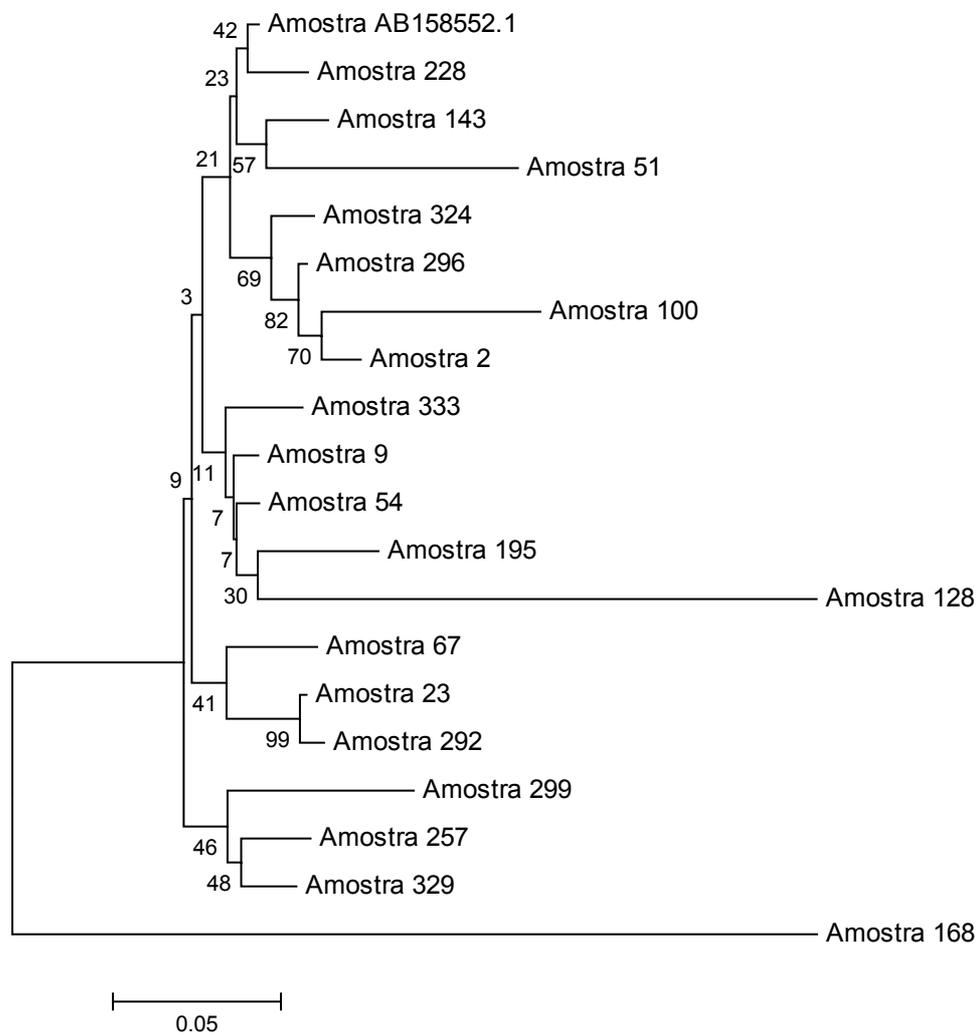


Figura 12. Relação filogenética baseada na seqüência de nucleotídeos da porção 3'-terminal do gene da coagulase de 19 amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mamite em bovinos da região sul do Estado de Minas Gerais, utilizando-se o método de *neighbor-joining* com *bootstrap* de 1.000 replicatas

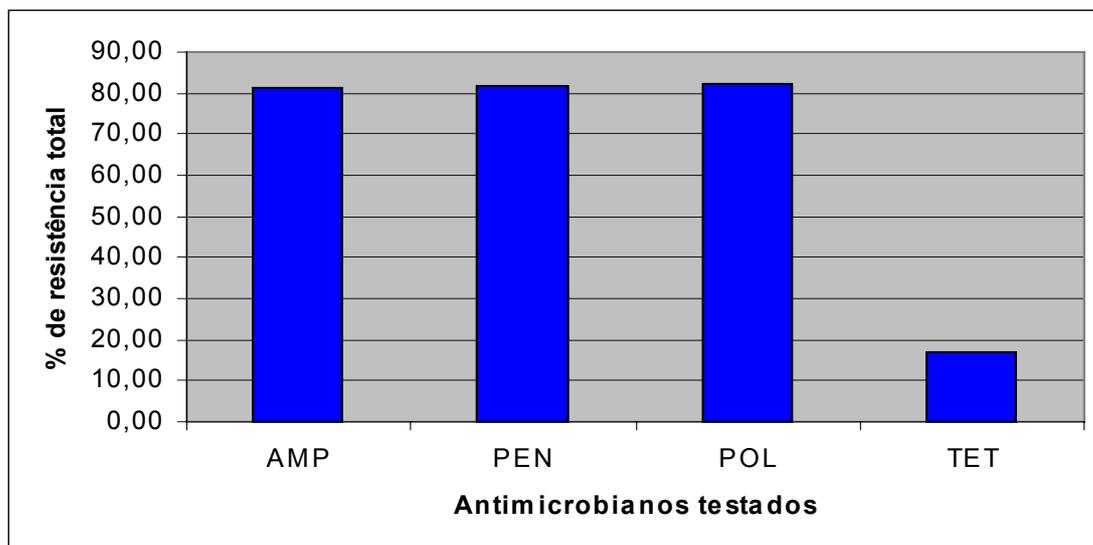


Figura 13. Perfil de resistência à ampicilina (AMP), penicilina G (PEN), polimixina B (POL) e à tetraciclina (TET) de 352 amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de bovinos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais, no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2006

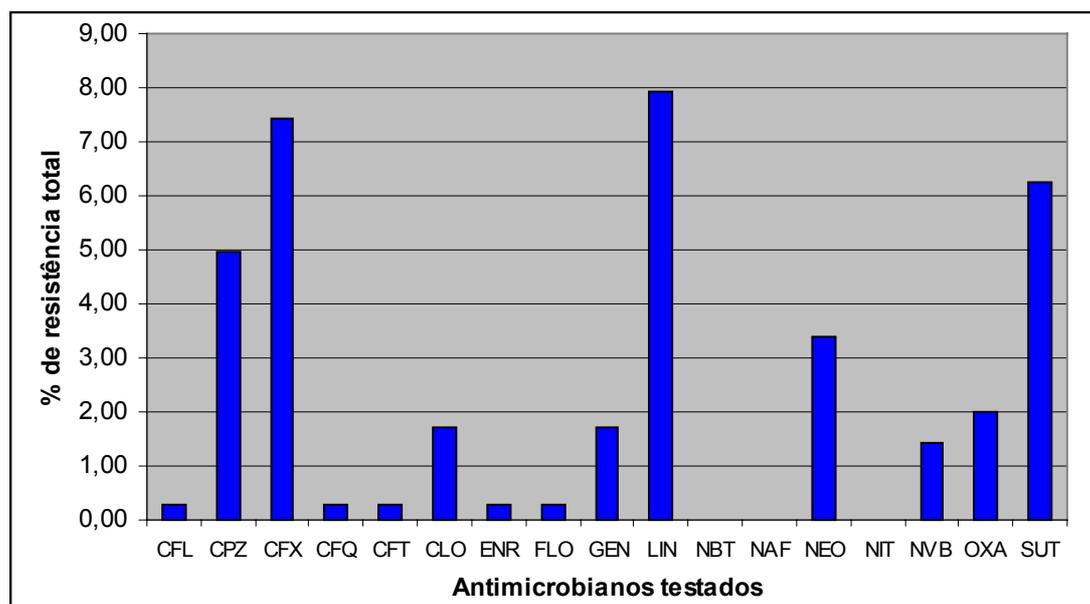


Figura 14. Perfil de resistência à cefalotina (CEF), cefotaxima (CTX), cefoperazona (CPZ), ceftiofur (CFT), cloranfenicol (CLO), enrofloxacina (ENR), florfenicol (FLO), gentamicina (GEN), lincomicina (LIN), neomicina (NEO), nitrofurantoína (NIT), novobiocina (NVB), oxacilina (OX), sulfazotrim (SZT), cefquimona (CFQ), associação de penicilina, nafcilina e dihidroestreptomicina (NAF) e associação de neomicina, bacitracina e tetraciclina (NBT) de 352 amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de bovinos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais, no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2006



## ESTUDO IV

### AVALIAÇÃO DE ALGUMAS MEDIDAS BÁSICAS DE CONTROLE PARA A MAMITE EM BOVINOS DA BACIA LEITEIRA DO SUL DE MINAS GERAIS

#### RESUMO

Analisaram-se as medidas básicas de controle para a mamite bovina em 35 rebanhos da bacia leiteira do sul de Minas Gerais, utilizando-se o método do Diagnóstico Rural Rápido. Foram avaliados o monitoramento da mamite clínica e subclínica, a assistência veterinária, a higiene da ordenha, a anti-sepsia de tetas, a utilização da linha de ordenha, o tratamento de casos clínicos e de vacas secas, a manutenção da ordenhadeira e o descarte de animais cronicamente acometidos pela mamite. Observaram-se falhas com relação às medidas analisadas na maioria das propriedades estudadas, o que justificou os elevados índices de mamite clínica e subclínica e de contagens de células somáticas observados.

Palavras-chave: mamite bovina, medidas de controle, Brasil

#### ABSTRACT

The basic control mastitis measures were studied in 35 dairy herds of southern Minas Gerais-Brazil. The quick rural diagnosis method was used employing interviews and questionnaires. One evaluated the veterinary assistance, the monitoring of clinical and subclinical mastitis, the hygiene of milking, the use of teat anti-sepsis and milking line, the treatment of clinical cases and dry cows therapy, the maintenance of milking machine and the disposal of animals chronically affected by mastitis. Faults were observed in evaluated measures in most of studied herds, which justified high rates of clinical and subclinical mastitis and elevated somatic cell counts.

Key words: bovine mastitis, control measures, Brazil

#### I. INTRODUÇÃO

A mamite bovina é a mais prevalente e uma das mais onerosas doenças infecciosas que afetam a indústria leiteira mundial, causando prejuízos estimados em 35 bilhões de dólares anuais (Bradley, 2002; Vintov et al., 2003).

Os programas clássicos de controle de infecções intramamárias (IIM), visam manter escores de células somáticas abaixo de 200.000, menos de 2% de episódios clínicos ao mês e 85% de vacas livres de mamite subclínica (Muller, 1999). Programas implantados por várias décadas em rebanhos americanos e europeus se baseiam na desinfecção de tetos antes e após a ordenha, no tratamento precoce de casos clínicos, na terapia de vacas secas, na higiene de ambiental e da ordenha, na manutenção periódica do equipamento de ordenha e no descarte de animais cronicamente infectados (LeBlank et al., 2006). Como resultado destas medidas, verificou-se a redução do número de casos clínicos de mamite e a redução significativa das contagens de células somáticas e das taxas de infecção por patógenos contagiosos em rebanhos de diferentes países (Bradley, 2002).

Apesar de todos os avanços científicos, a eficiência do controle da mamite nos rebanhos brasileiros tem sido baixa, porque, na maioria dos rebanhos, as medidas de controle se restringem quase que exclusivamente ao tratamento de casos clínicos.

Tendo em vista a relevância econômica da mamite bovina e as elevadas prevalências normalmente observadas para a doença nos rebanhos da região sul do Estado de Minas Gerais, foi proposta a realização deste trabalho com o objetivo de se avaliar

a adoção de algumas medidas genéricas para o controle da doença.

## II. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados para o estudo 35 rebanhos leiteiros localizados em 19 municípios da bacia leiteira da região sul do Estado de Minas Gerais, que apresentavam índices predominantemente elevados de mamite clínica e subclínica e de contagens de células somáticas. O diagnóstico de mamite subclínica foi realizado pelo Califórnia Mastitis Test (CMT) e da mamite clínica pela Prova da Caneca de Fundo Escuro (Teste do Tamis), segundo Veiga (1998). A contagem de células somáticas do leite do tanque foi realizada por citometria de fluxo (Somacount 500- Bentley-USA), no Laboratório de Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG.

Utilizou-se a metodologia de Diagnóstico Rural Rápido (McCracken et al., 1988) para o levantamento de dados das 35 propriedades. A coleta de informações constou de entrevistas semi-estruturadas, com base em roteiro definido, no qual o entrevistador tinha a liberdade de incluir novas questões, para possíveis desdobramentos das respostas dos proprietários e ordenhadores. Esse roteiro contemplou questões relacionadas com a descrição do acompanhamento da dinâmica de ordenha e averiguação *in loco* dos quesitos avaliados. Utilizou-se o critério de intencionalidade para a obtenção de dados de natureza qualitativa (Gil, 1991).

Foram avaliadas as seguintes medidas: a assistência veterinária regular e a inserção deste profissional no programa de controle da mamite e melhoria da qualidade do leite; o monitoramento regular da mamite e estratégias utilizadas; a higiene da ordenha, incluindo condições de limpeza dos equipamentos e a qualidade da água; a execução diária do teste Tamis e a conduta nos casos positivos; a utilização de anti-sepsia de tetos e da linha de ordenha; o tratamento de vacas secas e de casos clínicos, avaliando-se critérios para escolha dos produtos, tempo de tratamento e vias

utilizadas; as condições gerais de funcionamento da ordenhadeira e a periodicidade de manutenção da mesma e o descarte de animais cronicamente acometidos pela mamite.

## III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização dos rebanhos utilizados, os índices de mamite clínica e subclínica e as respectivas CCST encontram-se na Tabela 1.

### 1-Assistência Veterinária

Somente cinco (14,28%) dos proprietários declararam não possuir qualquer assistência veterinária (Figura 1). Outras cinco propriedades (14,28%) possuíam assistência veterinária regular, na qual o controle e a prevenção da mamite faziam parte do leque de atuação do profissional. Nestas, foram observados os menores índices de mamite subclínica. Quanto aos demais rebanhos (71,42%), embora os proprietários tenham declarado contar com orientação veterinária, esta se restringia ao atendimento de casos clínicos emergenciais e assistência nas áreas de reprodução e de nutrição, verificando-se pouca ou nenhuma atuação do veterinário no programa de controle da mamite.

A assistência regular de um profissional qualificado é condição básica para a estruturação de um programa eficiente de controle para mamite bovina, tendo em vista a complexidade e os prejuízos econômicos ocasionados pela doença. Os índices de mamite e as estimativas de perdas de produção justificavam plenamente a inserção de um profissional capacitado a lidar com a mamite nas propriedades estudadas, o que certamente resultaria em maior rentabilidade do empreendimento e na melhoria da qualidade do leite produzido. Falta, porém, conhecimento por parte dos produtores para a dimensão dos prejuízos ocasionados pela doença e para os novos quesitos de qualidade exigidos pela legislação vigente.

## 2-Monitoramento regular do rebanho

A forma subclínica da mamite é, economicamente, a mais relevante por comprometer a produção do rebanho e causar alterações na qualidade do leite (Santos e Fonseca, 2007). Portanto, é imprescindível que seja feito seu monitoramento permanentemente, o que possibilita mensurar os prejuízos causados e avaliar a eficiência das medidas de controle implantadas (Lopes e Viana, 1996). Sua incidência pode ser avaliada por meio da realização periódica do CMT ou pela contagem de células somáticas individuais (CCSI) ou pela contagem de células somáticas no leite do tanque (CCSLT). Além das aplicações já citadas, os registros dos resultados de CMT e de CCSI vão dar subsídios para outras medidas importantes de controle da mamite, como por exemplo, para a implantação da linha de ordenha e o descarte de animais cronicamente acometidos.

Verificou-se que o monitoramento dos índices de mamite subclínica era prática adotada em reduzido número de propriedades (Figura 2), sendo que 21 (60,00%), não realizavam nenhum tipo de monitoramento, seis (17,14%) faziam o acompanhamento por meio da CCSLT, enquanto oito (22,85%) faziam o monitoramento mensal por meio da CCSI ou CMT.

Para o monitoramento da mamite clínica, emprega-se o teste Tamis. Este teste permite o diagnóstico e tratamento precoce da mamite clínica, minimizando os riscos de exacerbação dos sinais inflamatórios e de lesões do epitélio alveolar e de ductos galactóforos. Além da maior probabilidade de cura do animal acometido, o tratamento precoce da mamite é uma importante medida preventiva, diminuindo as chances de cronicidade da infecção e a taxa de eliminação de microrganismos pelo animal acometido.

Dentre as propriedades analisadas, o teste Tamis era realizado em 68,57% das propriedades, entretanto, em vários rebanhos, a importância do teste era

negligenciada, sendo que, em alguns deles, o teste não era executado em todas as ordenhas e, em outros, animais positivos passavam despercebidos ou quando percebidos eram ordenhados normalmente, não havendo nenhuma preocupação com a separação do leite dos quartos acometidos e/ou com a instituição do tratamento precoce. Nos casos positivos no teste Tamis, é importante que os animais sejam separados e ordenhados ao final da ordenha, evitando-se a contaminação do equipamento. Também é de suma importância que o leite deste animal, ou pelo menos do quarto acometido, não seja misturado com o leite do tanque, evitando-se a elevação da CCSLT.

## 3-Higiene da ordenha

O ordenhador é certamente um dos principais elos dentro de um programa de controle da mamite e de melhoria da qualidade do leite, pois dele depende a execução de todas as medidas que irão levar ao controle da doença. Por isso, é fundamental que esta atividade seja exercida por uma pessoa que possua bons hábitos higiênicos e boa escolaridade, e que sua participação no programa de controle seja estimulada através de treinamentos e cursos de reciclagem (Lopes e Viana, 1996). Embora não quantificada, a baixa escolaridade e qualificação dos ordenhadores foi um problema marcante na maioria das propriedades estudadas, o que dificultava a implantação das medidas de controle da mamite e de melhoria da qualidade do leite.

A água é um dos principais elementos no processo de limpeza, na rotina de um estabelecimento leiteiro. Contudo, para sua utilização, é necessário que tenha boa qualidade microbiológica e físico-química, o que deve ser atestado por análises periódicas. No presente estudo, verificou-se que a avaliação da qualidade da água utilizada nas atividades de ordenha era realizada por uma pequena parcela de proprietários (5,71%). Em 82,85% das propriedades, a água era procedente de minas ou poços rasos e era utilizada sem nenhum tratamento ou avaliação prévia de

qualidade. Nos seis rebanhos nos quais a água era oriunda de poços artesianos, somente dois dos proprietários relataram fazer a avaliação semestral da qualidade físico-química e microbiológica. Segundo Smith e Hogan (1992) e Costa et al. (1998a), a avaliação da qualidade microbiológica da água utilizada nas atividades de ordenha é essencial para a prevenção de mamites ocasionadas por agentes ambientais, principalmente coliformes e *Pseudomonas* spp.

A dureza e alcalinidade da água podem influenciar na eficiência do processo de lavagem e sanitização do equipamento de ordenha. Em propriedades onde a água tem uma dureza muito elevada, é comum a formação de pedras de leite na tubulação e unidades de ordenha, possibilitando a manutenção de patógenos ambientais e contagiosos no equipamento, os quais podem vir a infectar os animais no momento da ordenha e também a alterar a qualidade microbiológica do leite ordenhado. Água com dureza elevada requer maiores quantidades de sanitizantes e de detergente ácido, majorando o custo do processo de limpeza (Santos e Fonseca, 2007).

Grande parte das propriedades (57,15%) apresentou problemas quanto aos protocolos de limpeza e de sanitização do equipamento de ordenha. A utilização de água fria em todas as etapas de lavagem, diluições empíricas de soluções de detergentes impróprios para o equipamento foram os erros mais comuns. Também foi constatada a presença de pedras de leite em alguns equipamentos, indicando irregularidades com relação à utilização do detergente ácido, e a presença de crostas de gordura em unidades de ordenha, linhas de leite e copos coletores. A correta higienização do equipamento de ordenha é imprescindível para o controle da mamite contagiosa e para preservar a qualidade microbiológica do leite ordenhado.

#### **4-Limpeza e anti-sepsia de tetos**

O principal objetivo da anti-sepsia pós-ordenha é eliminar os patógenos que infectam o teto no momento da ordenha e

entre as ordenhas, prevenindo a infecção do canal e conseqüentemente do tecido secretor (Pyörälä, 2002). Segundo Hillerton (1996), a desinfecção pós-ordenha reduz a população bacteriana da pele da teta em até mil vezes e a eficiência da medida pode ser avaliada pelo nível de infecção do rebanho pelo *Corynebacterium bovis*. Boddie et al. (1997) verificaram que soluções contendo 0,5% de clorexidina reduziram as novas IIM por *Staphylococcus aureus* em 73,2% e por *Streptococcus agalactiae* em 53,9%, enquanto soluções contendo 1% de iodophor reduziram as populações destes microrganismos respectivamente em 75,6% e 53,5%.

Devido ao baixo custo da medida e à sua efetividade na redução de novas infecções, principalmente por patógenos contagiosos (Costa et al., 1999), a anti-sepsia de tetos antes e após a ordenha deveria ser adotada em 100% das propriedades, contudo, observou-se que a medida era adotada em apenas 57,14% dos rebanhos, sendo que nos demais rebanhos a medida não era utilizada ou se utilizava somente o pós-dipping (Figura 3). Além disso, observou-se, em algumas propriedades, o uso incorreto da anti-sepsia prévia à ordenha, fazendo-se a anti-sepsia de tetos excessivamente sujos de barro e/ou fezes e a não observância do tempo mínimo de 30 segundos para que a solução atuasse. A lavagem, no caso de tetas sujas de fezes ou barro, é importante para garantir a eficiência do anti-séptico, além de estimular a descida do leite. Verificou-se também em alguns rebanhos a utilização de soluções caseiras de hipoclorito de sódio e a diluição excessiva das soluções anti-septicas, o que pode interferir na eficiência desta medida de controle.

#### **5-Implementação da linha de ordenha**

A linha de ordenha consiste em ordenhar, primeiro, vacas primíparas que geralmente são as que apresentam as menores taxas de infecção, ordenhando-se a seguir as vacas multíparas sadias, seguidas pelas vacas com histórico de CCSI elevadas e, por fim, as vacas acometidas de mamite clínica (Santos e Fonseca, 2007). Tem sido

demonstrado que em rebanhos positivos para *Staphylococcus aureus*, após a ordenha de um animal infectado, a unidade de ordenha se constitui em veículo para a infecção de cerca de seis outros animais que vierem a ser ordenhados a seguir (Myllys et al., 1994), o que demonstra a importância desta prática para o controle de novas infecções ocasionadas por agentes contagiosos. No entanto, para a implantação desta medida, é preciso que se disponha de um recurso de monitoramento individual dos animais, como o CMT ou a CCSI.

Observou-se que a linha de ordenha era utilizada em apenas 28,57% das propriedades e que, em alguns rebanhos, os lotes formados por novilhas e por vacas recém paridas eram os últimos a serem ordenhados. Mesmo não se dispondo de recursos adequados para a identificação de animais cronicamente acometidos, recomenda-se constituir um lote de vacas primíparas, que geralmente apresentam os menores índices de mamite subclínica, que deve, portanto, ser ordenhado primeiro. Quanto às vacas recém paridas, que se encontravam na fase colostrar, o ideal seria que fossem ordenhadas por último, mas após criteriosa limpeza e desinfecção das unidades de ordenha.

Na prática, a implantação da linha de ordenha é dificultada pela necessidade de se dispor os animais em lotes de acordo com a produção, visando lhes fornecer dietas adequadas às suas exigências nutricionais, o que justificava a não utilização da medida por parte de alguns produtores, especialmente nos rebanhos maiores. Uma alternativa para contornar este problema seria a implantação da linha de ordenha baseada nos dados da CCSI mensal dentro dos lotes de produção, realizando-se a lavagem e desinfecção das unidades de ordenha entre os diferentes lotes.

## **6-Tratamento de casos clínicos**

Em todas as propriedades se fazia o tratamento de casos clínicos, porém verificaram-se inadequações quanto a esta

medida de controle em 100% dos rebanhos. As não conformidades observadas que constituem as causas mais comuns de insucesso no tratamento das mamites foram:

-Tratamento empírico: em nenhum dos rebanhos estudados era usual a determinação da etiologia e perfil de sensibilidade antibiótica dos agentes previamente à medicação dos animais. A escolha dos antibióticos deve ser fundamentada no perfil de sensibilidade antibiótica do microrganismo, pois microrganismos de uma mesma espécie podem ter perfis diferentes de sensibilidade antibiótica. Além disto, quando se seleciona um medicamento para o tratamento de IIM devem ser considerados o tempo de carência, a posologia adequada e a distribuição do mesmo dentro da glândula mamária (Gruet et al., 2001).

-Posologia inadequada: na maioria das propriedades, o tempo de tratamento de casos clínicos era inferior ao recomendado, o que pode ocasionar o agravamento do quadro clínico, a cronificação do processo infeccioso e o aparecimento de resistência aos antibióticos. O tratamento de casos clínicos consiste em se fazer a aplicação de antibióticos por via intramamária por um período mínimo de três dias, em intervalos de 12-24 horas. Casos clínicos mais graves, com reação inflamatória muito intensa, devem ser tratados por via sistêmica e local, inclusive com a utilização de antiinflamatórios associados aos antibióticos, observando-se um período maior de tratamento (Brito e Brito, 1998).

-Vias inadequadas: verificou-se, em diversos rebanhos, que o tratamento era feito somente pela via local, independente da gravidade do quadro clínico. A utilização somente da via local é recomendada para os casos mais brandos, normalmente casos subagudos. Nos casos onde a reação inflamatória é mais intensa, recomenda-se a utilização do tratamento pela via intramamária e por via sistêmica (Owens e Nickerson, 1989; McKellar, 1991).

## **7-Tratamento de vacas secas**

A taxa de novas infecções intramamárias aumenta sensivelmente logo após a secagem e permanece elevada ao longo das três primeiras semanas de involução uterina. Neste período, a vaca encontra-se mais susceptível à infecção devido ao estresse gestacional e alterações metabólicas. Cerca de 40% das infecções se dão nas primeiras duas semanas após a secagem, e na ausência do tratamento de vacas secas, 10-15% dos quartos irão se tornar infectados nesse período (Owens e Nickerson, 1989; Santos e Fonseca, 2007). Deste modo, o período seco é o momento ideal para se fazer o tratamento dos animais, uma vez que o antibiótico permanece em alta concentração por longos períodos na glândula mamária dos animais em tratamento, possibilitando altas taxas de cura de infecções remanescentes da última lactação, ao mesmo tempo em que previne novas IIM (Zeconi et al., 1995). Outra vantagem é que o tratamento nessa ocasião não requer o descarte de leite devido à presença de antibióticos.

Em 100% das propriedades estudadas patógenos contagiosos foram predominantes, o que justificava a adoção do tratamento de vacas secas como alternativa de controle. No entanto, observou-se que 57,14% dos produtores não utilizavam a medida e que parte destes empregava-na seletivamente (Figura 4), tratando-se exclusivamente vacas secas com histórico de mamite clínica ou de CCSIs elevadas na lactação anterior. Verificou-se, à semelhança do problema verificado quanto ao tratamento de casos clínicos, que o tratamento de vacas secas era realizado de forma empírica, sem que se fizesse a determinação dos perfis etiológicos e de sensibilidade antibiótica dos patógenos presentes no rebanho.

## **8-Descarte de animais cronicamente infectados**

Observou-se que somente 14,28% das propriedades dispunham de um programa de identificação e de descarte de animais cronicamente acometidos pela mamite.

A adoção desta medida é fundamental para a redução de infecções por patógenos contagiosos, conduzindo rapidamente a uma redução na taxa de mamite clínica, permitindo também reduzir a CCSLT, já que vacas cronicamente infectadas contribuem com 10-12% da CCSLT (Hillerton, 1996). De acordo com Nickerson (1993), 40% dos casos de mamite de um rebanho se manifestam em cerca de 7% das vacas e cerca de 50% do leite descartado em função de tratamentos com antibióticos é proveniente de vacas cronicamente infectadas. Esses dados demonstram a importância que os animais cronicamente infectados têm como reservatórios de patógenos para os demais animais do rebanho, bem como a contribuição dos mesmos para as alterações na qualidade do leite, principalmente no que se refere às contagens de células somáticas. Assim, apesar do ônus relacionado ao monitoramento sistemático do rebanho, a identificação de animais cronicamente infectados e sua segregação ou descarte constituem medidas importantes para se reduzir novas infecções ocasionadas por patógenos contagiosos e melhorar a qualidade do leite.

## **9-Manutenção da ordenhadeira**

A ordenhadeira mecânica é imprescindível em rebanhos de produção intensiva, contudo a transição da ordenha manual para a mecanizada favoreceu sobremaneira as IIM provocadas por patógenos contagiosos (Myllys et al, 1994). A revisão periódica do equipamento permite detectar e sanar oportunamente falhas que possam prejudicar seu funcionamento, eliminando assim uma das principais causas de mamite e de alterações na qualidade do leite.

A manutenção regular do equipamento de ordenha era uma medida de controle negligenciada por 71,43% dos produtores, geralmente realizada em intervalos irregulares ou somente quando ocorriam quebras do equipamento. Destas propriedades, somente seis apresentavam o equipamento em condições satisfatórias de acordo com os quesitos avaliados, enquanto nas demais, 19 propriedades (54,28%), o

equipamento apresentava sinais evidentes de desgaste e falhas de funcionamento. Os problemas mais comuns foram o desgaste de insufladores, pulsadores desregulados, pressão de vácuo inadequada e baixa capacidade de vácuo, constatados em grande parte dos equipamentos (Figura 5).

O mau funcionamento e utilização da ordenhadeira mecânica, principalmente no que diz respeito à pressão elevada de vácuo e sobreordena, afeta a integridade do esfíncter da teta, propiciando o aumento da ocorrência da mamite, principalmente da contagiosa (Costa,1998). Irregularidades quanto ao funcionamento do equipamento de ordenha também podem ocasionar perda de integridade da camada de queratina. A importância desta barreira foi demonstrada experimentalmente por Capuco et al. (1992), quando verificaram que animais que tinham a queratina dos tetos removida mecanicamente se tornavam mais

susceptíveis à IIM por *Streptococcus agalactiae*.

Segundo Santos e Fonseca (2007) a checagem do equipamento de ordenha deve incluir a relação de pulsação, taxa de pulsação, pressão manômetro central e nas unidades de ordenha, condições gerais de higiene geral antes de iniciar a ordenha, condições gerais das borrachas, sobretudo daquelas que entram em contato com o leite, e a capacidade de reserva de vácuo do sistema.

#### **IV. CONCLUSÃO**

Observaram-se falhas com relação às medidas básicas de controle e de prevenção da mamite na maioria das propriedades estudadas, o que justificou os elevados índices de mamite clínica e subclínica e as elevadas contagens de células somáticas observadas.

Tabela 1. Dados sobre manejo, índices de mamite clínica (IMC) e subclínica (IMSC) e contagens de células somáticas no leite do tanque (CCSLT) de 35 rebanhos leiteiros do sul de Minas Gerais, no período de março de 2004 a dezembro de 2006

Rebanho	Manejo Utilizado	IMSC (%)	IMC (%)	CCSLT
9	Confinamento total	50	0	325
26	Confinamento total	43,56	4,54	336
3	Free-stall	58,75	25	1.471
7	Free-stall	66,66	3,57	484
8	Free-stall	17,42	4,54	149
28	Free-stall	36,98	8,21	420
4	Semi-confinado	62,26	6,6	651
11	Semi-confinado	51,92	9,79	656
14	Semi-confinado	80,55	19,44	1.809
15	Semi-confinado	47,8	15,78	548
18	Semi-confinado	22,4	6,25	415
20	Semi-confinado	30,26	6,86	201
24	Semi-confinado	67,3	6,15	1.284
30	Semi-confinado	69,75	12,9	1.314
31	Semi-confinado	34,16	10	969
32	Semi-confinado	27,13	6,53	2.277
33	Semi-confinado	40	10	533
34	Semi-confinado	63,57	5,71	1.200
1	À pasto	65,13	15,78	1.178
2	À pasto	41,24	11,11	468
5	À pasto	57,95	4,54	678
6	À pasto	60,32	6,25	304
10	À pasto	58,59	9,37	1.008
12	À pasto	76,58	6,34	1.182
13	À pasto	70,2	18,36	1.000
16	À pasto	85,45	16,36	1.702
17	À pasto	53,88	4,44	1.010
19	À pasto	50	18,51	532
21	À pasto	69,61	9,41	1.956
22	À pasto	35,41	22,22	927
23	À pasto	54,6	28,57	3.181
25	À pasto	53,16	2,53	790
27	À pasto	17,14	1,9	336
29	À pasto	71,83	1,4	465
35	À pasto	35,66	7,35	750

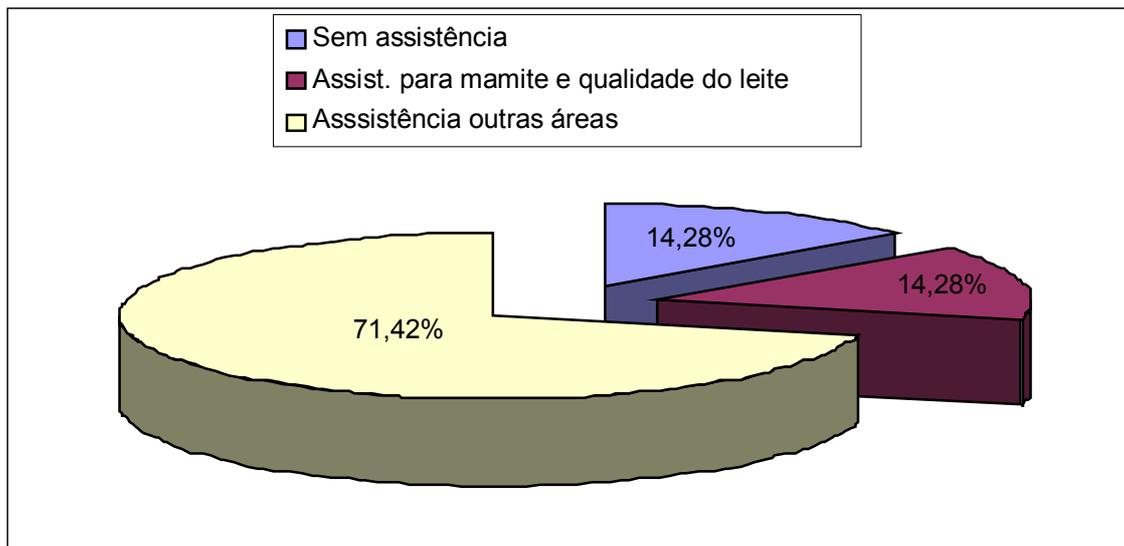


Figura 1. Distribuição percentual de 35 propriedades leiteiras da região sul do estado de Minas Gerais de acordo com o tipo de assistência veterinária, no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2006

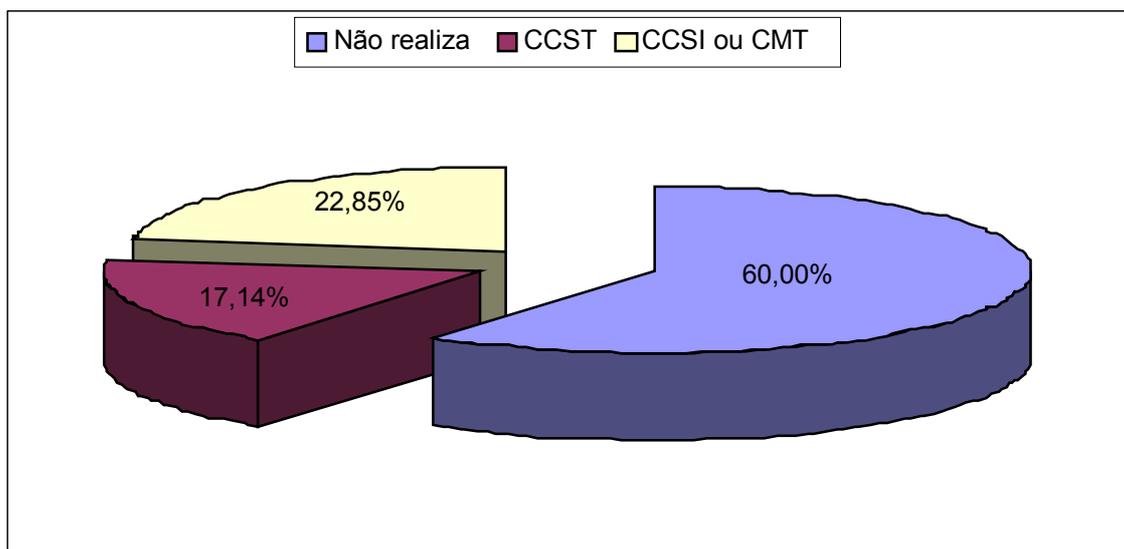


Figura 2. Distribuição percentual de 35 propriedades leiteiras da região sul do estado de Minas Gerais de acordo com a forma de monitoramento da mastite subclínica, no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2006



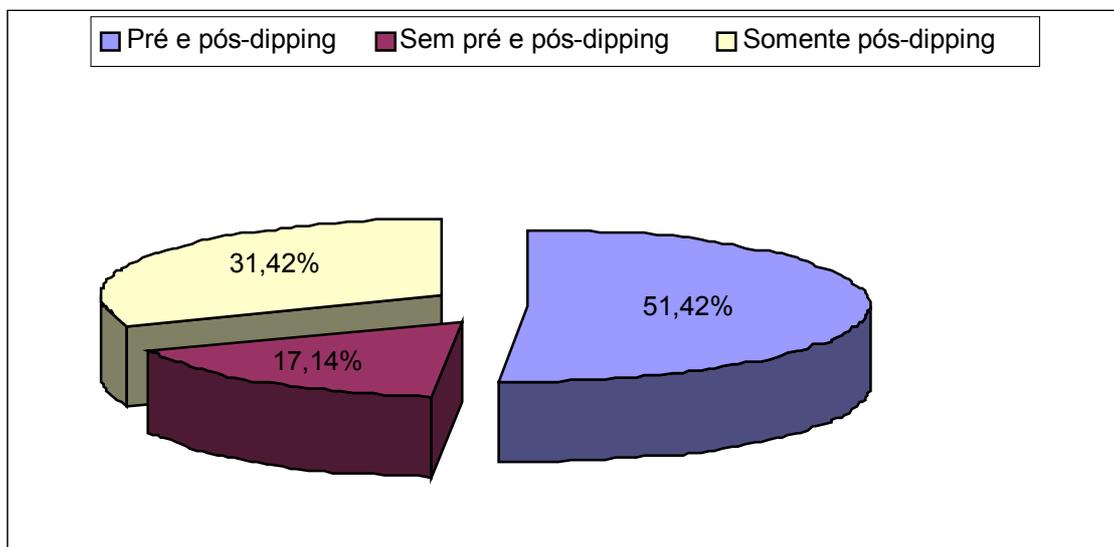


Figura 3. Distribuição percentual de 35 propriedades leiteiras da região sul do estado de Minas Gerais de acordo com utilização do pré e pós-dipping, no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2006

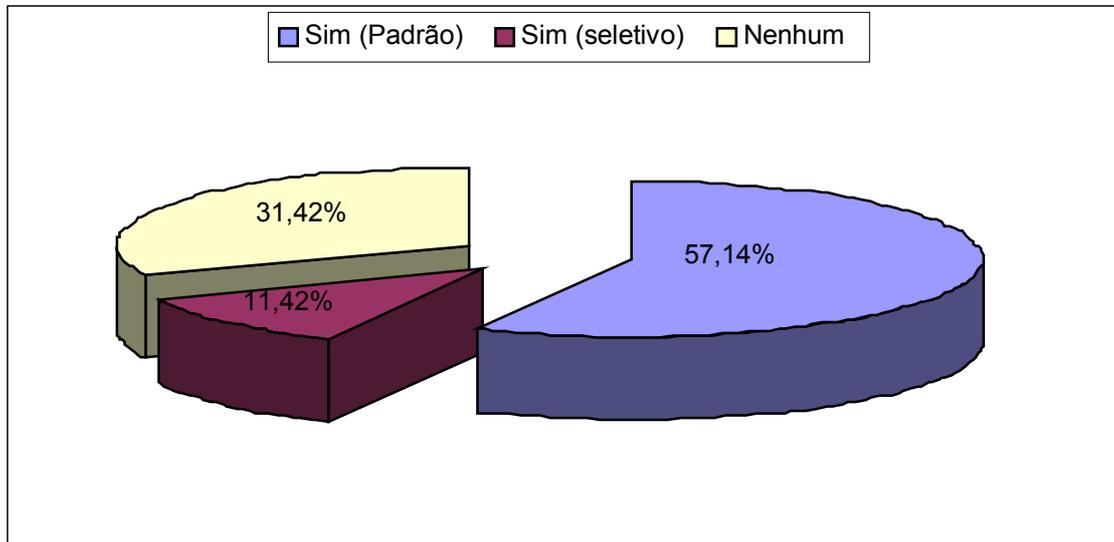


Figura 4. Distribuição percentual de 35 propriedades leiteiras da região sul do estado de Minas Gerais de acordo com a utilização do tratamento de vacas secas, no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2006



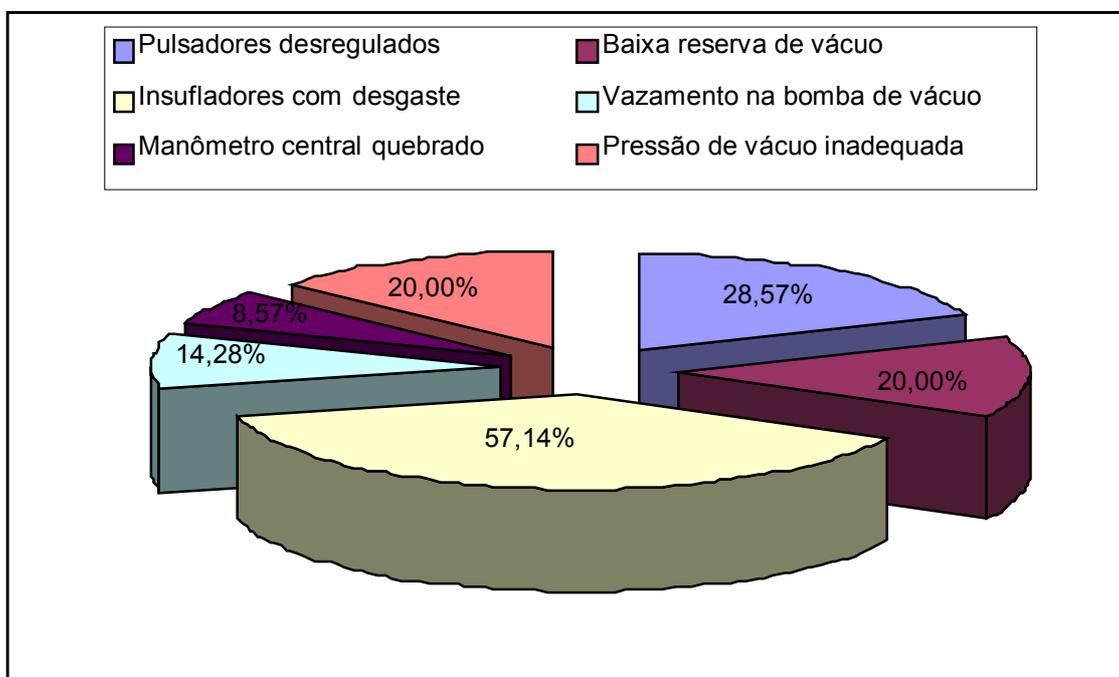


Figura 5: Problemas mais comuns constatados nos equipamentos de ordenhas de 35 propriedades leiteiras da região sul de Minas Gerais, no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2006



### 3. CONCLUSÕES GERAL

Verificou-se o predomínio da mamite contagiosa nos rebanhos estudados, tendo *Staphylococcus* coagulase positivos, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* e *Staphylococcus* coagulase negativos como os principais agentes envolvidos.

A mamite de origem ambiental apresentou importância secundária. *Streptococcus uberis* e bacilos gram-negativos foram os principais agentes envolvidos nestes casos.

Os microrganismos mais frequentemente isolados foram associados predominantemente com a forma subclínica da mamite.

*Staphylococcus* coagulase positivos e *Streptococcus agalactiae* foram os microrganismos mais frequentemente envolvidos nos casos clínicos e subclínicos de mamite. Agentes ambientais e *Streptococcus agalactiae* apresentaram maior associação com quadros clínicos em relação aos demais patógenos isolados.

Estudos genotípicos e fenotípicos demonstraram que, apesar da grande diversidade populacional de *Staphylococcus aureus* envolvidos na etiologia da mamite bovina, existem clones predominantes, de grande similaridade genética, que respondem pela maioria das infecções e que estes foram comuns aos rebanhos da região estudada. Não se verificou a existência de associação entre os tipos predominantes observados na PCR-RFLP ou antibiograma com a forma de apresentação da mamite.

Leveduras apresentaram, em geral, pouca expressão na etiologia de IIM nos rebanhos estudados. *Candida* foi o gênero predominante, verificando-se grande variação quanto às espécies envolvidas e quanto às taxas de infecções observadas entre os diferentes rebanhos.

Verificaram-se falhas nas medidas básicas de controle da mamite na maioria dos rebanhos analisados, o que justificou os elevados índices de mamite clínica e subclínica e as elevadas contagens de células somáticas observadas. Estes resultados demonstraram, por parte dos produtores, o desconhecimento do impacto econômico da mamite bovina e dos novos quesitos de qualidade vigentes, o que aponta a necessidade de uma atuação mais incisiva por parte dos demais segmentos envolvidos no agro-negócio do leite, uma vez que os problemas observados nos estabelecimentos de produção repercutem em toda cadeia produtiva do leite.

### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAL

AALBAEK, B.; STENDERUP, J.; JENSEN., H.E. et al. Mycotic and algal bovine mastitis in Denmark. *APMIS*, v. 102, n. 6, p. 541-456, 1994.

AARESTRUP, F. M.; DANGLER, C. A.; SORDILLO, L. M. Prevalence of coagulase gene polymorphism in *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 59, n. 02, p. 124-128, 1995.

AARESTRUP, F.M.; JENSEN, N.E. Prevalence and duration of intramammary infection in danish heifers during the peripartum period. *Journal of Dairy Sciences*, v. 80, n. 2, p. 307-312, 1997.

ALTEKRUSE, S.F.; TIMBO, B.B.; MOWBRAY, J.C. et al. Cheese-associated outbreaks of human illness in the United States, from 1973 to 1992: Sanity manufacturing practices protect consumers. *Journal of Food Protection*, v. 61, n. 10, p. 1405-1407, 1998.

AMARAL, L. A. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina. In: **ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES**, 3, 1999, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ UNESP, 1999. p.19-26.

- ANNEMÜLLER, C.; LÄMMLER, C.; ZSCHÖCK, M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, v. 69, p. 217-224, 1999.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. Review: Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, v. 61, p. 1-10, 2000.
- BANSAL, B.K.; SING., K.B.; RANDHAVA, K.B. et al. Evaluation of post-milking teat dipping and dry period therapy programme for mastitis control in cows. *Indian Journal Dairy Sciences*, v. 49, n. 9, p. 734-737, 1993.
- BARBALHO, T.C.F.; MOTA, R.A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos na mastite subclínica bovina no Estado do Pernambuco. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 2, n.2, p.31-36, 2001.
- BERGER-BACHI, B.; BARBERIS-MAINO, L.; STRASSLE, A. et al. *FemA*, a host-mediated factor essential for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: molecular cloning and characterization. *Molecular and General Genetics*, v. 219, n. 1-2, p. 263-269, 1989.
- BES, M.; GUÉRIN-FAUBLÉE, V.; MEUGNIER, H. et al. Improvement of the identification of staphylococci isolated from bovine mammary infections using molecular methods. *Veterinary Microbiology*, v. 71, p. 287-294, 2000.
- BEXIGA, R.; CAVACO, L.; VILELA, C.L. Isolamento de *Prototheca zopfii* a partir de leite bovino. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 98, n. 545, p. 33-37, 2003.
- BODDIE, R.L.; NICKERSON, S.C.; ADKINSON, R.W. Efficacies of teat germicides containing 0,5% chlorhexidine and 1% iodine during experimental challenge with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Dairy Sciences*, v. 80, n. 11, p. 2.809-2.814, 1997.
- BOTHA, F.S.; BRAND, P.A.J. A simplified key for identification of coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *South African Journal Dairy Sciences*, v. 19, n. 2, p. 39-44, 1987.
- BRABES, K.C.S.; CARVALHO, E.P.; DIONÍSIO, F.L. et al. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas do gênero *Staphylococcus* na etiologia da mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira*, v. 2, n. 3, p. 4-11, 1999.
- BRADLEY, A.J. Bovine mastitis: an evolving disease. *Veterinary Journal*, v. 164, n. 2, p. 116-128, 2002.
- BRANLEY, A.D.; DODD, F.H. Reviews of the progress of dairy sciences: mastitis control, progress and prospects. *Journal of Dairy Research*, v. 51, p. 481-512, 1984.
- BRANT, M.C.; FIGUEIREDO, J.B. Prevalência da mastite subclínica e perdas de produção em vacas leiteiras. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 46, n. 6, p. 595-606, 1994.
- BRASIL.** Instrução Normativa SDA/n.51 de 18 de Setembro de 2002. Estabelece os parâmetros técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e seu transporte a granel, em conformidade com os Anexos a esta Instrução Normativa. *Diário Oficial da União*, 18/09/2002.
- BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V. *Programas de controle das mastites causadas por microrganismos contagiosos e do ambiente*. Juiz de Fora: EMBRAPA/CNPGL, 1998. 25p.

- BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; VEIGA, V.M.O. et al. Udder infection patterns in hand and machine milked dairy herds under subtropical conditions. In: **PANAMERICAN CONGRESS ON MASTITIS CONTROL AND MILK QUALITY**, 1998, Mérida. **Proc...** México: 1998. p.148-151.
- BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; RIBEIRO, M.T. et al. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários de vacas em lactação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, n 2, p. 129-135, 1999.
- BROWING, J.W.; MEIN, G.A.; BRIGHLING, P. et al. Strategies for mastitis control: dry cow therapy and culling. *Australian Veterinary Journal*, v. 71, n. 6, p. 179-181, 1994.
- BUELOW, K.L.; THOMAS, C.B.; GOODGER, W.J. et al. Effect of milk sample collection strategy on the sensitivity and specificity of bacteriologic culture and somatic cell count for detection of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 26, p. 1-8, 1996.
- BUENO, V.F.F.; NICOLAU, E.S.; MESQUITA, A.J. et al. Mastite bovina clínica e subclínica na região de Pirassununga, SP: frequências e redução na produção. *Ciência Animal Brasileira*, v. 3, n. 2, p. 47-52, 2002.
- BURVENICH, C.; VAN MERRIS, V.; MEHRZAD, J. et al. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Veterinary Research*, v. 34, p. 521-564, 2003.
- BUYSER, M.L.; DUFOR, B.; MAIRE, M. et al. Implications of milk and milk products in food-borne diseases in France and different industrialised countries. *International Journal of Food Microbiology*, v. 67, p. 1-17, 2001.
- BUZZINI, P.; TURCHETTI, B.; FACELLI, R. et al. First large-scale isolation of *Prototheca zopfii* from milk produced by dairy herds in Italy. *Mycopathologia*, v. 158, p. 427-430, 2004.
- BUZZOLA, F.R.; QUELLE, L.; GOMEZ, M.I. et al. Genotypic analysis of *Staphylococcus aureus* from milk of dairy cows with mastitis in Argentina. *Epidemiological Infection*, v. 126, p. 445-452, 2001.
- CAPUCO, A.V.; BRIGHT, S.A.; PANKEY, J.W. et al. Increased susceptibility to intramammary infection following removal of teat canal keratin. *Journal of Dairy Sciences*, v. 75, n. 8, p. 2126-2130, 1992.
- CAPURRO, A.; CONHA, C.; NILSON, L. OSTENSSON, K. Identification of coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 40, n. 4, p. 315-321, 1999.
- CARDOSO, H.F.T.; COSTA, G.M.; SILVA, N. Susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de leite bovino no Estado de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 22, n. 5, p. 199-206, 2000.
- CARDOSO, H.F.T.; SILVA, N.; SENA, M.J. et al. Production of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. *Letters in Applied Microbiology*, v. 29, p. 347-349, 1999.
- CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; ANUNCIAÇÃO, L.L.C. et al. Staphylococcal food poisoning in Minas Gerais State, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 47, n. 2, p. 113-22, 1995.
- CASSOLI, L.D.; MACHADO, P.F. Impacto da Instrução Normativa 51 na qualidade do leite. In: **ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES**, 4, 2007, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ – UNESP, 2007. p.30-37.
- CDC-WHO - EPI-INFO 6.04b – **A word processing, database and statistics program for public health**. Center of Disease Control e Prevention (CDC) – World Health Organization, Geneva, Switzerland, Version 6.04b, January, 1997.

- CERQUEIRA, M.M.O.P.; SENA, M.J. Produção higiênica e fatores determinantes de qualidade do leite. *Ciência Veterinária nos Trópicos. Recife*, v. 1, n. 2, p. 115-134, 1998.
- CHEN, T.R.; HSIAO, M.H.; CHIOU, C.S. et al. Development and use of PCR primers for the investigation of C1, C2 and C3 enterotoxins types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-borne outbreaks. *International Journal of Microbiology*, v. 71, n. 1, p. 63-70, 2001.
- CHIRICO, J., JONSSON, P., KJLLBERG, S., et al. Summer mastitis experimentally induced by *Hydrotaea irritans* exposed to bacteria. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 2, n. 11, p. 187-192, 1997.
- COSTA, E.O. ; RIBEIRO, A. R.; MELVILLE, P.A. et al. Avaliação da eficácia da anti-sepsia pós-ordenha no controle de mastite aplicando o modelo "split herd". *Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira*, v. 2, n. 2, p. 4-9, 1999b.
- COSTA, E.O. Importância da mastite na produção leiteira do país. *Revista de Educação Continuada-CRMV-SP*, v. 1, n. 1, p 3-9, 1998.
- COSTA, E.O.; GANDRA, C.R.; PIRES, M.F. et al. Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the State of São Paulo, Brazil. *Mycopathologia*, v. 124, n. 1, p. 13-17, 1993.
- COSTA, E.O.; GARINO Jr, F.; WATANABE, E.T. et al. Proporção de ocorrência da mastite clínica em relação à subclínica correlacionada com os principais agentes etiológicos. *Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira*, v. 4, n. 3, p. 10-13, 2001.
- COSTA, E.O.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R. et al. Índices de mastite bovina clínica e subclínica nos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 17, n. 5, p. 215-217, 1995.
- COSTA, E.O.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R. et al. Prevalence of intramammary infections in primigravid brazilian dairy heifers. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 29, p. 151-155, 1996.
- COSTA, E.O.; MOTA, R.; SANTOS, F.G.B. et al. Contagem de células somáticas de amostras de leite de glândulas mamárias de fêmeas bovinas em lactação infectadas por microrganismos dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Corynebacterium*. *Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira*, v. 8, n. 2, p. 3-7, 2005.
- COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; GARINO-JR, F. et al. Avaliação da condutibilidade elétrica do leite de glândula mamária com mastite: correlação com CMT e exames microbiológicos. *Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira*, v. 1, n. 1, p. 3-8, 1998.
- COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T. et al. Controle de um surto de *Prototheca zopfii* em uma propriedade leiteira. *Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira*, v.2, n. 6, p. 12-16, 1999a.
- COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T. et al. Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms. *Journal of Veterinary Medicine*, v. 45, p. 65-71, 1998a.
- COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T. et al. Mastite subclínica: prejuízos causados e os custos de prevenção em propriedades leiteiras. *Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira*, v. 2, n. 2, p. 16-20, 1999.
- COUTINHO, L.C.A.; MEDEIROS, E.S. SILVA, L.B.G et al. Perfil de sensibilidade e resistência de isolados de *Candida* spp em vacas de leite procedentes do Estado do Pernambuco. In: **ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES**, 4, 2007, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ – UNESP, 2007. p. 84.

- CRAWSHAW, W.M.; MCDONALD, N.R.; DUNCAN, G. Outbreak of *Candida rugosa* mastitis in a dairy herd after intramammary antibiotic treatment. *Veterinary Record*, v. 156, n. 25, p. 812-813, 2005.
- CUENCA, F.F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 22, n. 6, p. 355-60, 2004.
- CUNHA, M.L.R.S. *Staphylococcus aureus*: toxinas e saúde pública. In: **ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES**, 4, 2007, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ – UNESP, 2007. p. p.56-63.
- DEGRAVES, F.J.; FETROW, J. Economics of mastitis and mastitis control. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 9, n. 3, p. 421-434, 1993.
- DEVRIESE, L.A.; VANCANNEYT, M.; BAELE, M. et al. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov. a new coagulase-positive species from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, p. 1569–1573, 2005.
- DOGAN, B.; KLAESSIG, S.; RISHNIW, M. et al. Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, v. 116, p. 27-282, 2006.
- DONATELE, D.M.; MOTTA, O.V.; FOLLY, M.M. Perfil antimicrobiano de linhagens de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva na mastite subclínica de vacas leiteiras nas regiões norte e noroeste do Estado do Rio de Janeiro. *Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira*, v. 5, n. 2, p. 3-6, 2002.
- DRECHSLER, P.A.; O'NEIL, J.K.; MURDOUGH, P.A et al. Efficacy evaluation on five chlorhexidine teat dip formulations. *Journal of Dairy Sciences*, v. 76, n. 9, p. 2783-2789, 1993.
- DUARTE, R.S.; MIRANDA, O.P.; BELLEI, B.C. et al. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolated recovered from milk of dairy cows in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 9, p. 4214-4222, 2004.
- ELAD, D.; SHPIGEL, N.Y.; WINKLER, M. et al. Feed contamination with *Candida krusei* as a probable source of mycotic mastitis in dairy cows. *Journal American Veterinary Medical Association*, v. 207, n. 5, p. 620-622, 1995.
- ERSKINE, R.J.; SEARS, P.M.; BARTLETT, P.C. et al. Efficacy of postmilking disinfection with benzyl alcohol versus iodophor in the prevention of new intramammary infections in lactating cows. *Journal of Dairy Sciences*, v. 81, n. 1, p. 116-120, 1998.
- ERSKINE, R.J.; WAGNER, S.; DEGRAVES, F.J. Mastitis therapy and pharmacology. *Veterinary Clinical Food Animal Practice*, v. 19, n. 1, p. 109-138, 2003.
- FANG, W., PYORALA, S. Mastitis-causing *Escherichia coli*: serum sensitivity and susceptibility to selected antibacterians in milk. *Journal of Dairy Sciences*, v. 79, n. 1, p. 76-82, 1996.
- FARNSWORTH, R.J.; SORENSEN, D.K. Prevalence and species distribution of yeasts in mammary glands of dairy cows in Minnesota. *Canadian Journal Comparative Medicine*, v. 36, p. 329-332, 1972.
- FERNANDES, J.C.T. Agentes etiológicos da mastite bovina no RS, no período de 1972-1989. *Arquivos da faculdade de Veterinária da UFRGS*, n. 10, p. 151-163, 1992.
- FILLIPPSSEN, L.F.; MOREIRA, F.B.; SAKASHITA, A.T. et al. Prevalência da mastite bovina causada por *Prototheca zopfii* em rebanhos leiteiros, na região norte do Paraná. *Ciência Rural*, v. 29, n. 1, p. 87-89, 1999.

- FITZGERALD, J.R.; MEANEY, W.J.; HARTIGAN, P.J. et al. Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered cows. *Epidemiology and Infection*, v. 119, p. 261-269, 1997.
- FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000, 175p.
- FOSTER, G.; ROSS, H.M.; HUTSON, R.A. et al. *Staphylococcus lutrae* sp. nov., a new coagulase-positive species isolated from otters. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 47, n. 3, p. 724-726, 1997.
- FOX, L.K.; BESSER, T.E.; JACKSON, S.M. Evaluation of coagulase-negative variant of *Staphylococcus aureus* as a cause of intramammary infections in a herd of dairy cattle. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 209, n. 6, p. 1143-1146, 1996.
- FOX, L.K.; HANCOCK, D.D. Effect of segregation on prevention of intramammary infections by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Sciences*, v. 72, n. 2, p. 540-544, 1989.
- GIL, A. C. *Como elaborar projetos de pesquisa*. São Paulo: Atlas, 1991.160p.
- GOH, S.; BYRNE, S.K.; ZHANG, J.L. et al. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, n. 7, p. 1642-1645, 1992.
- GONZALEZ, R.N.; WILSON, D.J.; SICHLES, S.A. et al. Outbreak of clinical mastitis caused by *Trichosporon beigellii* in dairy herds. *Journal American Veterinary Medical Association*, v. 218, n. 2, p. 238-42, 2001.
- GRAY, D.M.; SCHALM, O.W. The mastitis variable in milk yield as estimated by California Mastitis Tests. *American Veterinary Journal Research*, v. 32, p. 541-543, 1962.
- GRUET, P.; MAINCENT, P.; BERTHELOT, X. et al. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Advanced Drugs Delivery Reviews*, v. 50, p. 245-259, 2001.
- GUIMARÃES, F.F. Modificação da geografia da produção mundial de leite. *Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira*, v. 9, n. 1, p. 19-23, 2006.
- HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *Journal of Dairy Sciences*, v. 77, n. 7, p. 2103-2112, 1994.
- HARMON, R.J.; CLARK, T.; RAMESH, T. et al. Environmental pathogen numbers in pasture and bedding of dairy cattle. *Journal of Dairy Sciences*, v. 75, p. 256, 1992.
- HARMON, R.J.; LANGLOIS, B.E. Mastitis due to coagulase-negative *Staphylococcus* species. *Agri-Practice*, v. 10, n. 1, p. 29-34, 1989.
- HAVERI, M.; ROSLÖF, L.; RANTALA, L. et al. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent infections with different clinical characteristics. *Journal of applied Microbiology*, v. 103, p. 993-1000, 2007.
- HILLERTON, J.E. Controle da mastite bovina. In: **WORKSHOP SOBRE PROGRAMA DE CONTROLE INTEGRADO DA MASTITE BOVINA**, 1996, Juiz de Fora. *Anais...* Juiz de Fora: Embrapa/CNPGL, 1996.
- HILLERTON, J.E.; BERRY, E.A. The management and treatment of environmental streptococcal mastitis. *Veterinary Clinical Food Animal Practice*, v. 19, n. 1, p. 157-169, 2003.
- HILLERTON, J.E.; SHEARN, M.F.S.; TEVERSON, R.M. et al. Effect of pre-milking teat dipping on clinical mastitis in dairy farms in England. *Journal of Dairy Research*, v. 60, p. 31-41, 1993.

- HOGAN, J.S.; SMITH, K.L. Coliform mastitis. *Veterinary Research*, v. 34, p. 507-519, 2003.
- HOGAN, J.S.; SMITH, K.L. Occurrence of clinical and subclinical environmental streptococcal mastitis. In: **PROCEEDINGS OF THE SYMPOSIUM ON UDDER HEALTH MANAGEMENT FOR ENVIRONMENTAL STREPTOCOCCI**, 1997. National Mastitis Council Inc, p.59-75, 1997.
- HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A. et al. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9.ed. Baltimore, USA: Williams e Wilkins, 1994. 787p.
- HOOKEY, J.V.; RICHARDSON, J.F.; COOKSON, B.D. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR Restriction Fragment Length Polymorphism and DNA sequence analysis of coagulase gene. *Journal Clinical Microbiology*, v. 36, n. 4, p. 1083-1089, 1998.
- HUNTER, P.R.; GASTON, M.A. Numerical index of discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal Clinical Microbiology*, v. 26, n. 11, p. 2465-2466, 1988.
- HURTADO, M. P.; DE LA PARTE, M. A.; BRITO, A. *Staphylococcus aureus*: revision of the mechanisms of pathogenicity and physiopathology of staphylococcal infections. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, v. 22, n. 2, p. 112-118, 2002.
- HUTTON, C. H., FOX, L. K., HANCOCK, D. D. Mastitis control practices: differences between herds with high and low milk somatic cell counts. *Journal of Dairy Sciences*, v. 73, p. 1135-1143, 1990.
- JANOSI, S.; RATZ, F.; SZIGETI, G. et al. Review of the microbiological, pathological and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. *Veterinary Quartely*, v. 23, n. 2, p. 58-61, 2001.
- JOO, Y.S.; FOX, L.K.; DAVIS, W.C. et al. *Staphylococcus aureus* associated with mammary glands of cows: genotyping to distinguish different strains among herds. *Veterinary Microbiology*, v. 80, p. 131-138, 2001.
- KANEMITSU, K.; YAMAMOTO, H.; TAKEMURA, H. et al. Relatedness between the coagulase gene 3'-end region and coagulase serotypes among *Staphylococcus aureus* strains. *Microbiology and Immunology*, v. 45, n. 1, p. 23-27, 2001.
- KAPUR, V.; SISCHO, W.M.; GREER, R.S. et al. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 2, p. 376-380, 1995.
- KEEFE, G.P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *Canadian Veterinary Journal*, v. 38, p. 429-437, 1997.
- KELLER, B.; SCHEIBL, P.; BLECKMANN, E. et al. Differentiation of yeasts in mastitis milk. *Mycoses*, v. 43, n. 1, p. 17-19, 2000.
- KIRK, J.H., BARTLETT, P.C. Nonclinical *Pseudomonas aeruginosa* mastitis in a dairy herd. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 184, n. 6, p. 671-673, 1984.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M. et al. *Diagnóstico microbiológico*. 5.ed. Belo Horizonte: MEDSI Editora Médica e Científica Ltda, 2001. 1465p.
- KRUKOSWKI, H.; TIETZE, M.; MAJESWSKI, T. et al. Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin region, Poland. *Mycopathologia*, v. 150, p. 5-7, 2000.
- KRUKOWSKI, H.; LISOWSKI, A.; RÓZANSKI, P. et al. Yeast and algae isolated from cows with mastitis in south eastern part of Poland. *Poland Journal of Veterinary Sciences*, v. 9, n. 3, p. 181-184, 2006.

- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. *The yeasts, a taxonomic study*. 4.ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. 1.055p.
- LAFFRANCHI, A.; MULLER, E.E.; FREITAS, J.C. et al.. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas ao longo dos primeiros quatro meses de lactação. *Ciência Rural*, v. 31, n. 6, p. 1027-1032, 2001.
- LANGE, C.; CARDOSO, M.; SENCZEK, D. et al. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolated from cases of bovine mastitis in Brazil. *Veterinary Microbiology*, v. 67, p. 127-141, 1999.
- LANGONI, H. Agentes emergentes na etiologia da mastite bovina. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 19, n. 6, p. 238-240, 1997.
- LANGONI, H. Mastite bovina. Conceitos e Fundamentos. In: **ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES**, 4, 2007, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ – UNESP, 2007. p. 8-17.
- LANGONI, H., PINTO, M.P., DOMINGUES, P.F. et al. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 43, n. 6, p. 507-515, 1991.
- LANGONI, H., SILVA, A.V., CABRAL, K.G. et al. Etiologic aspects on bovine mastitis: aerobic bacterial flora. In: **PANAMERICAN CONGRESS ON MASTITIS CONTROL AND MILK QUALITY**, 1, 1998, Mérida. *Proc...* México: 1998. p. 468-480.
- LANGONI, H.; CABRAL, K.G.; DOMINGUES, P.F. et al. Utilização da enrofloxacin (Baytril) no tratamento da mastite bovina estafilocócica. *Ciência Rural*, v. 30, n. 1, p. 167-170, 2000.
- LARANJA, L.F.; MACHADO, P.F. Ocorrência de mastite bovina em fazendas produtoras de leite tipo B no estado de São Paulo. *Scientia Agrícola, Piracicaba*, v. 51, n. 3, p. 578-585, 1994.
- LARSEN, H.D.; SLOTH, K.H.; ELBERG, C. et al. The dynamics of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in nine Danish dairy herds. *Veterinary Microbiology*, v. 71, p. 89-101, 2000.
- LeBLANK, S.J.; LISSEMORE, K.D.; KELTON, D.F. et al. Major advances in diseases prevention in dairy cattle. *Journal of Dairy Sciences*, v. 89, n. 4, p. 1267-1279, 2006.
- LEIGH, J.A. *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis? *Veterinary Journal*, v. 157, n. 3, p. 225-238, 1999.
- LIPMAN, L.J.A.; NIJS, A.; LAM, T.J.G.M. et al. Genotyping by PCR of *Staphylococcus aureus* strains isolated from mammary gland of cows. *Veterinary Microbiology*, v. 48, p. 51-55, 1996.
- LOPES, E.O.; VIANA, A.K.M. Controle da mastite em rebanhos leiteiros-um enfoque técnico da iniciativa privada. In: **WORKSHOP SOBRE PROGRAMA DE CONTROLE INTEGRADO DA MASTITE BOVINA**, 1996, Juiz de Fora. *Anais...* Juiz de Fora: EMBRAPA, 1996.
- LÓPEZ, J.M.; BEST, A.B. Relación entre estado y función de equipos de ordeña com la sanidad de la glándula mamaria. *Avances en Ciencias Veterinarias*, v. 9, n. 1, p. 49-55, 1994.
- MARTY, F.M.; BAROUCH, D.H.; COAKLEY, E.P. et al. Disseminated trichosporonosis caused by *Trichosporon loubieri*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 11, p. 5317-5320, 2003.
- MATSUNAGA, T.; KAMATA, S.; KAKIICHI, N. et al. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. *Journal Veterinary Medical Sciences*, v. 55, n. 2, p. 297-300, 1993.

- McCRACKEN, J.A.; PRETTY, J.N.; CONWAY, G.R. *An Introduction to Rapid Rural Appraisal for Agricultural Development*. London: International Institute for Environment and Development, 1988. 96p.
- McDONALD, J.S.; KINSEL, M.; ADAMS, D.S. et al. Studying the effects of backflushing milking units. *Veterinary Medicine*, p. 382-386, 1993.
- McKELLAR, Q. A. Intramammary treatment of mastitis in cows. *In Practice*, November, p. 244-249, 1991.
- MERL, K.; ABDULMAWJOOD, A.; LÄMMLER, C. et al. Determination of epidemiological relationships of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. *FEMS Microbiology Letters*, v. 226, n. 1, p. 87-92, 2003.
- MORETTI, A.; PASQUALI, P.; MENCARONI, G. et al. Relationship between cell counts in bovine milk and the presence of mastitis pathogens (yeasts and bacteria). *Journal of Veterinary Medicine*, v. 45, p. 129-132, 1998.
- MOTA, R.A.; PINHEIRO JUNIOR, J.W.; SILVA, D.R. et al. Etiologia da mastite subclínica em bovinos da bacia leiteira do Estado do Pernambuco. *Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira*, v. 7, n. 1, p. 10-13, 2004.
- MULLER, E. E. Profilaxia e controle da mastite. In: **ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES**, 3, 1999, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ UNESP, 1999. p.57-61.
- MYLLYS, V.; HOKANEN-BUZALSKI, T.; HUOVINEN, P.; e tal. Association of changes in the bacterial ecology of bovine mastitis with changes in the use of milking machines and antibacterial drugs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 35, n. 4, p. 363-369, 1994.
- NADER FILHO, A.N.; ITURRINO, R.P.S.; ROSSI-JUNIOR, O.D. Mastite subclínica em rebanhos produtores de leite gordura 3,2%. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 36, n. 5, p. 549-58, 1984.
- NICKERSON, S.C. Eliminating chronic *Staphylococcus aureus* mastitis. *Veterinary Medicine*, April, p. 375-381, 1993.
- NICKERSON, S.C. Mastitis management: Strategies to combat mastitis. *Agri-Practice*, v. 16, n. 1, p. 17-22, 1995.
- NICKERSON, S.C.; OWENS, W.E. *Staphylococcus aureus* mastitis: reasons for treatment failures and therapeutic approaches for control. *Agri-Practice*, v. 14, n. 9, p. 18-23, 1993.
- NICKERSON, S.C.; OWENS, W.E.; BODDIE, R.L. Mastitis in dairy heifers: initial studies on prevalence and control. *Journal of Dairy Sciences*, v. 78, n. 7, p. 1607-1618, 1995.
- OLIVEIRA, M.O. *Avaliação técnico-econômica do controle da mastite bovina*. 1989. 65f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- OLIVEIRA, R.P. *Epidemiologia molecular da mastite bovina causada por Staphylococcus aureus*. 2001, 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- OSTERAS, O.; RONNINGEN, O.; SANDVIK, L. et al. Field studies show associations between pulsator characteristics and udder health. *Journal of Dairy Research*, v. 62, p. 1-13, 1995.
- OWENS, W. E., OLIVER, S. P., GILLESPIE, B. E et al. Role of horn flies (*Haematobia irritans*) in *Staphylococcus aureus* induced mastitis in dairy heifers. *American Journal of Veterinary Research*, v. 59, n. 9, p. 1122-1124, 1998.

- OWENS, W.E.; NICKERSON, S.C. Antibiotic levels in milk and mammary tissues during various treatment regimens for bovine mastitis. *Agri-Practice*, v. 10, n. 1, p. 10-15, 1989.
- PACKER, R.A. Bovine mastitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal American Veterinary Medical Association*, v. 170, n. 10, p. 1.166, 1977.
- PANKEY, J.W.; PANKEY, P.B.; BARKER, R.M. et al. The prevalence of mastitis in primiparous heifers in eleven Waikato dairy herds. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 44, p. 41-44, 1996.
- PARDO, P.E.; METTIFOGO, E.; MÜLLER, E.E. et al. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas no período pós-parto. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 18, n. 3/4, p. 115-118, 1998.
- PARDO, R.B.; STURION, D.J.; BASILE, J.R. et al. Levantamento dos agentes etiológicos da mastite bovina na região de Arapongas (PR). *UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 1, n. 1, p. 25-30, 1999.
- PERFORMANCE standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard*. 8.ed. Wayne, Pennsylvania: NCCLS, 2003.
- PHILPOT, W.N. Economics of mastitis control. *Veterinary Clinical of North American*, v. 6, p. 233-245, 1984.
- PYÖRÄLÄ, S. New strategies to prevent mastitis. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 37, p. 211-216, 2002.
- PYÖRÄLÄ, S.; PYÖRÄLÄ, E. Accuracy of methods using somatic cell count and N-acetyl-β-D-glucosaminidase activity in milk to assess the bacteriological cure of bovine mastitis. *Journal of Dairy Sciences*, v. 80, n. 11, p. 2820-2825, 1997.
- QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B. et al. *Clinical veterinary microbiology*, London: Wolfe, 1994. 648p.
- RAIA JR, R.; COSTA, E.O. Deficiências das informações técnicas (bulas) em produtos para tratamento de mastite como fator predisponente para a ocorrência de resíduos de antimicrobiano no leite. *Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira*, v. 9, n. 2, p. 3-8, 2006.
- RAIMUNDO, O.; DEIGHTON, M.; CAPSTICK, J. et al. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymorfim of coagulase gene. *Veterinary Microbiology*, v. 66, p. 275-284, 1999.
- RANJAN, R.; SWARUP, D.; PATRA, R.C. et al. Bovine protothecal mastitis: a review. *Perspectives in Agriculture, Veterinary Sciences, Nutrition and Natural Resources*, v. 1, n. 17, p. 1-7, 2006.
- RIBEIRO, A.R. *Estudo da mastite bovina causada por microrganismos ambientais: influência do manejo e higiene, sazonalidade e qualidade microbiológica da água*. 2001. 138fp. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- RIBEIRO, M.G.; COSTA, E.O.; LEITE, D.S. et al. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 5, p. 724-731, 2006.
- RIBEIRO, M.T.; CARVALHO, A.C. Higiene dos equipamentos de ordenha e tanques de resfriamento, visando à qualidade do leite. In: MARTINS, C.E.; ALENCAR, C.A.B.; BRESSAN, M. *Sustentabilidade na Produção de Leite no Leste Mineiro*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. p.175-179.
- RIEDNER, S.; ALBUQUERQUE, A.J.D.; BADKE, M.R.T. et al. Prevalência da mastite em dois tambos de Santa Maria-RS. *Revista Científica de Ciências Rurais*, v. 17, p. 261-273, 1987.

- ROBERSON, J. R.; FOX, L. K.; HANCOCK, D.D. et al. Sources of intramammary infections from *Staphylococcus aureus* in dairy heifers at first parturition. *Journal of Dairy Sciences*, n. 3, n. 81, p. 687-693, 1998.
- ROBERSON, J.R.; FOX, L.K.; HANCOCK, D.D. et al. Prevalence of coagulase-positive staphylococci, others than *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. *American Journal of Veterinary Research*, v. 57, n.1, p.54-58, 1996.
- SANTOS, M.V; FONSECA, L.F.L. *Estratégias para controle da mastite e melhoria da qualidade do leite*. São Paulo: Manole Ltda, 2007, 314p.
- SANTOS, R.C.; MARIN, J.M. Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. *Mycopathologia*, v. 59, p. 251-253, 2005.
- SAULNIER, P., BOURNEIX, C., PREVOST, G. et al. Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, n. 4, p. 982-985, 1993.
- SCHLEGELOVÁ, J.; DENDIS, M.; BENEDÍK, J. et al. *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows and humans on farms differ in coagulase genotype. *Veterinary Microbiology*, v. 92, p. 327-334, 2003.
- SCHUKKEN, Y.H.; WILSON, D.J.; WELCOME, F. et al. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Veterinary Research*, v. 34, p. 579-596, 2003.
- SCHWARZKOPF, A.; KARCH, H. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* coagulase genes: potential and limits for use as epidemiological marker. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, n. 10, p. 2407-2412, 1994.
- SEARS, P.H.; McCARTHY, K.K. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Veterinary Clinical of North American Food Animal Practice*, .v. 19, n. 1, p. 171-185, 2003.
- SHOPSIN, B.; GOMEZ, M.; WADDINGTON, M. et al. Use of coagulase gene (coa) repeat region nucleotide sequences for typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 9, p. 3453-3456, 2000.
- SILVA, E. R.; SILVA, N. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 69, n. 4, p. 260-264, 2005.
- SILVA, N. Diagnóstico de mamite em animais de importância econômica. In: **ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES**, 3, 1999, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ UNESP, 1999. p.51-55.
- SILVA, N., FIGUEIREDO, J.B., OLIVEIRA, M. Mamite no Rebanho Bovino da Escola Média de Agricultura de Florestal-UFV-MG. Parte II. Frequência e Etiologia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 35, n. 1, p. 85-91, 1983.
- SILVA, N.; COSTA, G.M. An outbreak of acute bovine mastitis caused by *Klebsiella pneumoniae* in a dairy herd. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 53, n. 4, p. 1-5, 2001.
- SILVEIRA-FILHO, V.M.; SANTOS, F.G.B.; FREITAS, M.L.F. et al. Molecular epidemiologic study of *Staphylococcus aureus* associated to bovine mastitis from Pernambuco state, Brazil. *Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira*, v. 8, n. 1, p. 12-17, 2005.
- SMITH, K.L.; HOGAN, J.S. Control of environmental mastitis. In: **PROC. ATTI INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF BOVINE MASTITIS**, 1992, Milano. *Proc...* Milano: Università Degli Studi di Milano, 1992. p.37-52.

- SMITH, K.L.; HOGAN, J.S. *Environmental mastitis. Veterinary Clinical of North American Food Animal Practice*, v. 9, p.37-52, 1993.
- SOL, J.; SAMPINON, O.C.; HARTMAN, E. et al. Effect of preculture freezing and incubation on bacteriological isolation from subclinical mastitis samples. *Veterinary Microbiology*, v. 85, p. 241-249, 2002.
- SORDILLO, L.M.; SHAFER-WEAVER, K.; DEROSA, D. Symposium on bovine immunology – Immunobiology of mammary gland. *Journal of Dairy Sciences*, v. 80, n. 8, p. 1851-1865, 1997.
- SPENCER, S.B. A importância e procedimentos para a limpeza e higienização de equipamentos de leite. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE**, 2, 2000, Curitiba. Anais... Curitiba: UFPR, 2000. p.53-58.
- STEPHAN, R.; ANNEMÜLLER, C.; HASSAN, A.A. et al. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Veterinary Microbiology*, v. 78, p. 373-382, 2001.
- SU, C.; KANEVSKY, I.; JAYARAO, B.M.; et al. Phylogenetic relationships of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis based on coagulase gene polymorphism. *Veterinary Microbiology*, v.71, p. 53-58, 2000.
- TAKEUCHI, S.; ISHIGURO, K.; IKEGAMI, M. et al. Production of toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cow's milk and farm bulk milk. *Veterinary Microbiology*, v. 59, p. 251-258, 1998.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M. et al. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, v. 24, p. 1596-1599, 2007.
- TRONCO, V.M. *Manual para inspeção da qualidade do leite*. Santa Maria: Editora UFSM, 1997. 166p.
- VANNUFFELD, P.; GIGI, J.; EZZEDINE, H. et al. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, p. 2864-67, 1995.
- VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T.A. et al. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary Microbiology*, v. 92, p. 179-185, 2003.
- VEIGA, V.M.O. *Diagnóstico da mastite bovina*. Juiz de Fora: EMBRAPA-CNPGL-ADT, 1998. 24p. (Circular Técnica n. 51).
- VINTOV, J.; AARESTRUP, F.M.; ZINN, C.E. et al. Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. *Veterinary Microbiology*, v. 95, p. 133-147, 2003.
- WATANABE, S.; ITO, T.; TAKEUCHI, F. et al. Structural comparison of ten serotypes of staphylocoagulases in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, v. 187, n. 11, p. 3698-3707, 2005.
- WATTS, J.L.; LOWERY, D.E.; TELL, J.F. et al. Identification of *Corynebacterium bovis* and others coryneforms isolated from bovine mammary glands. *Journal of Dairy Sciences*, v. 83, p. 2.373-2.379, 2000.
- WELLENBER, G.J.; van der POEL, W.H.M.; van OIRSCHOT, J.T. Viral infections and bovine mastitis: a review. *Veterinary Microbiology*, v. 88, p. 27-45, 2002.
- WILSON, D.J.; GONZALES, R.N.; SEARS, P.M. Segregation or use of separate milking units for cows infected with *Staphylococcus aureus*: effects on prevalence of infection and bulk tank somatic cell count. *Journal of Dairy Sciences*, v. 78, n. 9, p. 2083-2085, 1995.

WILSON, D.J.; GONZALEZ, R.N.; HELENA, H. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *Journal of Dairy Sciences*, v. 80, p. 2592-2598, 1997.

WOODWARD, W.D.; WARD, A.C.S.; FOX, L.K. et al. Teat skin normal flora and colonization with mastitis pathogen inhibitors. *Veterinary Microbiology*, v.17, p.357-365, 1988.

YARROW, D. Methods for the isolation and identification of yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. *The yeasts, a taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier, 1998. p. 77-100.

YERUHAM, I.; BRAVERMAN, Y.; SHPIGEL, N.Y. et al. Mastitis in dairy cattle caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and feasibility of transmission by houseflies. *Veterinary Quartely*, v. 18, n. 3, p. 87-89, 1996.

ZAFALON, L.F.; AMARAL, L.A.; NADER FILHO, A. et al. Influência de bactérias do gênero *Corynebacterium* e estafilococos coagulase positivos e negativos sobre a contagem de células somáticas e a produção láctea de quartos mamários com mastite subclínica. *Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira*, v. 2, n. 6, p. 4-6, 1999.

ZECCONI, A.; CESARIS, L.; LIANDRIS, E. et al. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microbial Pathogenesis*, v. 40, p. 177-183, 2006.

ZECCONI, A.; MORONI, P. CASULA, R. et al. Influence of some individual and management factors associated with drying off on bacteriological cure rate of bovine mammary gland. *Milchwissenschaft*, v. 50, n. 8, p. 433-435, 1995.

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