

**MAYRA ZILTA PERMÍNIO RODRIGUES BEZERRA DE ALMEIDA**

**ESTUDO DA MASTITE SUBCLÍNICA EM OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS E SUA  
INFLUÊNCIA SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE**

**RECIFE**

**2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**MAYRA ZILTA PERMÍNIO RODRIGUES BEZERRA DE ALMEIDA**

**ESTUDO DA MASTITE SUBCLÍNICA EM OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS E SUA  
INFLUÊNCIA SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientador:  
Dr<sup>a</sup> Carla Lopes de Mendonça

**Recife  
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**ESTUDO DA MASTITE SUBCLÍNICA EM OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS E SUA  
INFLUÊNCIA SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE**

Tese de Doutorado elaborada por

**MAYRA ZILTA PERMÍNIO RODRIGUES BEZERRA DE ALMEIDA**

Aprovada pela

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra CARLA LOPES DE MENDONÇA

Orientadora -Clínica de Bovinos, Campus Garanhuns - UFRPE

---

Dr. JOSÉ AUGUSTO BASTOS AFONSO

Clínica de Bovinos, Campus Garanhuns - UFRPE

---

Prof<sup>a</sup> Dra MARIA JOSÉ DE SENA

Depto de Medicina Veterinária - UFRPE

---

Prof. Dr. PIERRE SOARES CASTRO

Depto de Medicina Veterinária - UFRPE

---

Prof<sup>a</sup> Dra ELIZABETE RODRIGUES DA SILVA

Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE

---

Prof<sup>a</sup> Dra NORMA DOS SANTOS LAZARO

Pesquisador Visitante (FAPERJ), FIOCRUZ, RJ

Recife, Fevereiro de 2008

*Dedico à minha família de origem, base de toda a minha vida, exemplo de responsabilidade, honestidade, companheirismo e amor ao que se propõe fazer.*

*Ao meu marido José Bezerra por tão infinito apoio em todas as etapas deste trabalho e meu filho José Bento, minha melhor obra de vida, concedida por Deus!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por tamanha generosidade em conceder-me saúde, paz e a possibilidade de sempre sonhar e concretizar o que desejo.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo suporte financeiro (MCT/CNPq/CT-Infra/FACEPE nº 006/2003), indispensável para o desenvolvimento dos nossos trabalhos de pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro através de bolsa concedida, durante o curso.

A Carla Lopes, pela confiança, trabalho em conjunto e amizade estabelecida no decorrer desses anos.

A Profa Dra Elsa Mamizuka e ao aluno de pós-graduação Franklin Bispo do Laboratório de Referência Nacional em Fagotipagem de *S. aureus* da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela caracterização genotípica dos isolados de *S.aureus*.

À Profa Dra Irma Nelly Gutierrez do Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela análise da PFGE utilizando o software bionumerics versão 5.0.

À Profa Dra Norma dos Santos Lazaro do Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, RJ, pela caracterização bioquímica das amostras Gram negativas.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e seus professores, pelo aprendizado obtido durante o curso.

A empresa Parmalat, pela confiança em liberar suas instalações para realização de análises laboratoriais, especialmente a Luzivaldo e Dr<sup>a</sup> Íris, do Laboratório de Controle de Qualidade Parmalat.

Ao Dr. José Augusto, pela orientação e agradável convivência.

Ao prof. Antonio Ricardo, pela realização da análise estatística.

À Edna, pela amizade, presteza e disposição à resolução de nossas dificuldades.

Aos colegas Luis Gustavo e Roberta Buonora, pela companhia e ajuda nas atividades deste trabalho.

Aos proprietários dos animais utilizados neste trabalho, pela compreensão e ajuda.

A Clínica de Bovinos de Garanhuns, personificada através de seus técnicos, residentes e funcionários, por há uma década fazer parte de minha trajetória profissional, acolhendo e acreditando em minhas possibilidades.

Ao meu pai, que mesmo ausente, fisicamente, se mantém de modo constante e marcante em minha vida sempre me conduzindo por caminhos que levam à responsabilidade, determinação, integridade e fé em Deus.

À minha mãe, sempre presente nos momentos em que mais preciso e como ela mesmo diz, mesmo quando não se está de corpo pode-se fazer presença em coração.

À minha irmã, pelo carinho e apoio em minhas atividades.

À minha família, sempre compreensiva com as minhas ausências.

À minha sogra Célia, pela generosidade, preocupação e amor dispensado.

Às minhas cunhadas (Celita e Teresa) e cunhados (Márcio e Silvio), por todo carinho, atenção e amor fraternal.

Aos meus sobrinhos (Ana Vitória, Beatriz, Daniel, Eduardo, Felipe, Larissa e Leonardo), pela alegria e harmonia existente em nossa convivência e por compreenderem minha ausência e limitação durante este período.

À Ana Paula e Aparecida, que mantêm minha casa em ordem, cuidando com muito carinho das minhas preciosidades, dando-me suporte físico e emocional para realização deste trabalho.

*“Cada um de nós compõe a sua própria história,  
E cada ser em si, carrega o dom de ser capaz,  
De ser feliz”*

*Almir Sater e Renato Teixeira*

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
<b>RESUMO</b>	14
<b>ABSTRACT</b>	16
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	18
<b>2 OBJETIVOS</b>	20
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b>	21
3.1 Mastite Ovina	21
3.2 Mastite Subclínica	23
3.2.1- Epidemiologia	24
3.2.2 Diagnóstico	27
3.2.2.1 <i>California Mastitis Test</i> (CMT)	27
3.2.2.2 Contagem de Células Somáticas	29
3.2.3 Agentes Etiológicos causadores de mastite em ovinos	32
3.2.4 Perfil de sensibilidade frente a antimicrobianos	35
3.2.5 Caracterização genética de <i>Staphylococcus aureus</i>	36
3.2.6 Alterações Físico-químicas	38
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	42
4.1- Local de Realização do trabalho	42
4.2- Animais	42
4.3- Exame clínico da glândula mamária	42
4.3.1- <i>California Mastitis Test</i> (CMT)	42
4.4- Colheita e processamento das amostras.	43
4.4.1- Contagem Direta de Células Somáticas	43
4.4.2- Análise físico-química do leite	44
4.4.3- Análise bacteriológica	44
4.4.4- Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos	45



4.4.5- Caracterização molecular das cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	46
4.5- Dados epidemiológicos	48
4.6- Análise Estatística dos dados	48
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	50
5.1- <i>California Mastitis Test</i> (CMT) e Contagem de Células Somáticas (CCS)	50
5.2- Isolamento bacteriano	53
5.2.1- Perfil de Sensibilidade frente a antimicrobianos	58
5.3- Relação entre o isolamento bacteriano e o <i>California Mastitis Test</i> (CMT)	61
5.4- Frequência do isolamento bacteriano e suas respectivas contagens de células somáticas das amostras reagentes e não reagentes ao <i>California Mastitis Test</i> .	65
5.5- Alteração da composição físico-química do leite e infecção intramamária	67
5.5.1- Acidez Dornic	67
5.5.2- Teor de Cloretos	69
5.5.3-Densidade	70
5.5.4- Gordura	71
5.5.5- pH	73
5.6- Alteração da composição físico-química do leite e o <i>California Mastitis Test</i>	75
5.7- Análise Epidemiológica	79
5.7.1- Genotipagem de <i>Staphylococcus aureus</i> pela técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)	82
<b>6 CONCLUSÕES</b>	87
<b>7 REFERÊNCIAS</b>	88

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Frequência dos resultados positivos e negativos (n=244) do CMT do leite de ovelhas Santa Inês.	51
<b>Figura 2</b> - Frequência dos diferentes graus de positividade nas 72 amostras de leite de ovelhas Santa Inês reagentes ao CMT.	51
<b>Figura 3</b> - Demonstração do gráfico <i>Box-plot</i> da tendência crescente da intensidade da reação do CMT e a elevação dos valores médios da CCS.	52
<b>Figura 4</b> - Demonstração linear da associação positiva da intensidade do CMT e do isolamento bacteriano.	63
<b>Figura 5</b> – Valores médios da acidez Dornic ( <sup>0</sup> D) do leite de glândulas mamárias sadias, infectadas e infectadas por SCN, SCP, <i>Streptococcus</i> spp. e bactérias Gram-negativas em ovelhas da raça Santa Inês.	68
<b>Figura 6</b> - Valores médios do teor de cloretos (mEq/L) do leite de glândulas mamárias sadias, infectadas e infectadas por SCN, SCP, <i>Streptococcus</i> spp. e bactérias Gram-negativas em ovelhas da raça Santa Inês.	70
<b>Figura 7</b> - Valores médios da densidade do leite de glândulas mamárias sadias, infectadas e infectadas por SCN, SCP, <i>Streptococcus</i> spp. e bactérias Gram-negativas em ovelhas da raça Santa Inês	71
<b>Figura 8</b> - Valores médios do percentual de gordura (%) do leite de glândulas mamárias sadias, infectadas e infectadas por SCN, SCP, <i>Streptococcus</i> spp. e bactérias Gram-negativas em ovelhas da raça Santa Inês.	73
<b>Figura 9</b> - Valores médios do pH do leite de glândulas mamárias sadias, infectadas e infectadas por SCN, SCP, <i>Streptococcus</i> spp. e bactérias Gram-negativas em ovelhas da raça Santa Inês.	74
<b>Figura 10</b> – Valores médios da Acidez Dornic ( <sup>0</sup> D) do leite de ovelhas da raça Santa Inês nas diferentes reações do CMT.	76
<b>Figura 11</b> – Valores médios do teor de cloretos (mEq/L) do leite de ovelhas da raça Santa Inês nas diferentes reações do CMT.	76
<b>Figura 12</b> - Valores médios da densidade do leite de ovelhas da raça Santa Inês nas diferentes reações do CMT.	77

<b>Figura 13</b> - Valores médios do percentual de gordura (%) do leite de ovelhas da raça Santa Inês nas diferentes reações do CMT.	78
<b>Figura 14</b> - Valores médios do pH do leite de ovelhas da raça Santa Inês nas diferentes reações do CMT.	79
<b>Figura 15</b> - Distribuição dos resultados do CMT nos rebanhos de ovelhas Santa Inês estudados.	79
<b>Figura 16</b> – Relação clonal de cepas de <i>S.aureus</i> solados de leite de ovelhas da raça Santa Inês em diferentes rebanhos.	84

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Resultados do <i>California Mastitis Test</i> (CMT) e valores médios e desvios padrão ( $\bar{x} \pm s$ ) da contagem de células somáticas (CCS) de amostras de leite de ovelhas Santa Inês.	52
<b>Tabela 2</b> – Frequência de isolamento dos agentes bacterianos das amostras de leite de ovelhas da raça Santa Inês (n=106).	54
<b>Tabela 3</b> – Perfis de associação bacteriana identificados em 6 amostras de leite de ovelhas da raça Santa Inês.	58
<b>Tabela 4</b> - Susceptibilidade antimicrobiana de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo, coagulase negativo e <i>Streptococcus</i> spp. isolados de leite de ovelhas da raça Santa Inês.	59
<b>Tabela 5</b> - Susceptibilidade antimicrobiana das bactérias Gram-negativa isoladas de leite de ovelhas da raça Santa Inês.	60
<b>Tabela 6</b> - Distribuição dos microrganismos isolados nas amostras de leite de ovelhas da raça Santa Inês agrupados de acordo com a reação do CMT.	61
<b>Tabela 7</b> - Frequência absoluta e relativa do isolamento bacteriano nas diferentes reações do <i>California Mastitis Test</i> obtidos das amostras de leite de ovelhas da raça Santa Inês.	62
<b>Tabela 8</b> – Frequência do isolamento bacteriano nos diferentes intervalos de valores de contagem de células somáticas das amostras de leite de ovelhas Santa Inês reagentes ao CMT.	65
<b>Tabela 9</b> - Frequência do isolamento bacteriano nos diferentes intervalos de valores de contagem de células somáticas das amostras de leite de ovelhas Santa Inês não reagentes ao CMT.	67
<b>Tabela 10</b> - Valores médios e desvios padrão da acidez Dornic ( $^{\circ}D$ ) do leite de ovelhas da raça Santa Inês oriundo de glândulas mamárias sadias, infectadas e infectadas por diferentes agentes bacterianos.	68
<b>Tabela 11</b> - Valores médios e desvios padrão do teor de cloreto (mEq/L) do leite de ovelhas da raça Santa Inês oriundo de glândulas mamárias sadias, infectadas e infectadas por diferentes agentes bacterianos.	69

<b>Tabela 12</b> - Valores médios e desvios padrão da densidade do leite de ovelhas da raça Santa Inês oriundo de glândulas mamárias sadias, infectadas e infectadas por diferentes agentes bacterianos.	70
<b>Tabela 13</b> - Valores médios e desvios padrão da Gordura (%) do leite de ovelhas da raça Santa Inês oriundo de glândulas mamárias sadias, infectadas e infectadas por diferentes agentes bacterianos.	72
<b>Tabela 14</b> - Valores médios e desvios padrão do pH do leite de ovelhas da raça Santa Inês oriundo de glândulas mamárias sadias, infectadas e infectadas por diferentes agentes bacterianos.	74
<b>Tabela 15</b> - Valores médios e desvio padrão ( $\bar{x} \pm s$ ) dos componentes físico-químicos (acidez, cloreto, densidade, gordura e pH) do leite de ovelhas da raça Santa Inês nos diferentes resultados do CMT.	75
<b>Tabela 16</b> - Distribuição dos padrões genéticos e respectivas linhagens obtidas pela eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) das 18 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de leite de ovelhas Santa Inês em diferentes municípios.	85
<b>Tabela 17</b> - Distribuição dos padrões genéticos e respectivas linhagens obtidas pela eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) das 18 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de leite de ovelhas Santa Inês de acordo com o exame clínico.	86

## RESUMO

Este trabalho teve por objetivo realizar um estudo da mastite subclínica em ovelhas da raça Santa Inês e sua influência sobre as características físico-químicas do leite. Foram analisados 31 rebanhos, destes 135 ovelhas, primíparas e múltiparas em diferentes estágios de lactação. Foram examinadas 244 glândulas mamárias, com posterior colheita do leite para realização do *California Mastitis Test* (CMT), contagem direta de células somáticas (CCS), análise bacteriológica e físico-química dos componentes do leite (acidez Dornic, teor de cloretos, densidade, gordura e pH). Foram assinaladas as principais características epidemiológicas dos rebanhos estudados, assim como a caracterização genotípica de 18 isolados de *S. aureus* pela técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Das 244 amostras analisadas pelo CMT, 172 (70,49%) foram negativas e 72 (29,50%) positivas. Verificou-se nas amostras positivas ao CMT, crescimento bacteriano em 73,61%, enquanto nas negativas, 27,32%, sendo observada associação entre o CMT e o crescimento bacteriano ( $p < 0,05$ ). Os valores médios de CCS relacionados ao CMT negativo foram de  $1,57 \times 10^5$  céls/mL e das amostras positivas de 1+; 2+ e 3+, respectivamente de  $1,01 \times 10^6$  céls/mL,  $3,23 \times 10^6$  células/mL e  $8,41 \times 10^6$  céls/mL, existindo forte dependência da CCS em relação à intensidade da reação do CMT. Os microrganismos isolados foram *Staphylococcus* coagulase negativo (65,09%), *Staphylococcus aureus* (13,21%), *Staphylococcus hyicus* (1,88%), *Streptococcus* spp. (7,55%), *Bacillus* spp. (2,83%), *Citrobacter freundii* (0,94%), *Pantoea agglomerans* (0,94%), *Enterobacter cloacae* (1,88%), *Escherichia coli* (0,94%), *Burkholderia cepacia* (1,88%), *Pseudomonas putida* (0,94%), *Pseudomonas stutzeri* (0,94%) e *Stenotrophomonas maltophilia* (0,94%). De maneira geral os isolados foram sensíveis aos antimicrobianos testados. O CMT demonstrou ser um bom indicador da mastite subclínica nesta espécie animal, sendo recomendado a colheita para isolamento bacteriano as amostras com resultados a partir de 1+. Constatou-se que as chances de detecção de glândulas infectadas são maiores em resultados de CCS a partir de  $1 \times 10^6$  céls/mL. Considerando os diferentes agentes bacterianos isolados, as infecções intramamárias por *Staphylococcus* coagulase positivo e bactérias Gram-negativas acarretaram alterações mais intensas ( $P < 0,05$ ) nos constituintes físico-químicos avaliados. Foi verificada alterações ( $P < 0,05$ ) nos valores da acidez Dornic, teor de cloretos, pH e densidade. Dos 31 rebanhos analisados, 25 (80,65%) tiveram animais reagentes ao CMT. 61,97% dos casos foram observados em ovelhas múltiparas,

56,34% em fêmeas com apenas uma cria e 66,07% destes animais tinham acometimento mamário unilateral. Na caracterização genotípica das cepas de *S. aureus* evidenciou-se três linhagens, destas LA e LC foram as mais prevalentes 38,9% e 50% respectivamente, estando distribuídas nos rebanhos em que este agente foi isolado.

**PALAVRAS CHAVE:** Infecção intramamária, ovinos, etiologia, CMT, CCS, composição físico-química, caracterização genotípica.

## ABSTRACT

The aim of this work was to accomplish a study of subclinical mastitis in ewes of Santa Inês breed and the influence over the physical-chemical characteristics. It was analyzed 31 flocks totalizing 135 primiparous and multiparous ewes in different lactation stages. It was examined 244 mammary glands before the milking samples was collected to realization of *Califórnia Mastitis Testis* (CMT), somatic cell direct count (SCC), bacteriological analysis and physical-chemical milk compounds (Dornic acidity, chloride concentration, density, fat and pH ). The main epidemiological characteristics of the herds was marked as well as the genotypic characterization of the 18 *S.aureus* isolates by the PFGE (pulsed-field gel electrophoresis). Of the 244 analysed samples by CMT, 172 were negative and 72 positive. It was observed in the CMT positive samples, bacterial growth in 73,61%, whilst in the negative 27,32 with association between CMT and bacterial growth ( $P<0,05$ ). The SCC mean values related to negative CMT was  $1,57 \times 10^5$  cells/mL, and the positive samples 1+, 2+ and 3+, respectively,  $1,01 \times 10^6$  cells/mL,  $3,23 \times 10^6$  cells/mL and  $8,41 \times 10^6$  cells/mL. With strong dependency between SCC in relation to the intensity of CMT reaction. The microorganisms isolated were *Staphylococcus* coagulase negative (65,09%), *Staphylococcus aureus* (13,21%), *Staphylococcus hyicus* (1,88%), *Streptococcus* spp.(7,55%), *Bacillus* spp.(2,83%), *Citrobacter freundii* (0,94%), *Pantoea agglomerans* (0,94%), *Enterobacter cloacae* (1,88%), *Escherichia coli* (0,94%), *Burkholderia cepacia* (1,88%), *Pseudomonas putida* (0,94%), *Pseudomonas stutzeri* (0,94%) e *Stenotrophomonas maltophilia* (0,94%). In a general manner all isolates were sensitive to the antimicrobians tested. The CMT showed to be a good indicator of subclinical mastitis in this species. With recommendations to collect and to do bacterial isolation of the results 1+ and over. It was verified that the chances of infected glands detection are higher in SCC results over  $1 \times 10^6$  cells/mL. In consideration of the different bacterial agents isolated the intramammary infections by coagulase positive Staphylococci and Gram negative bacterias cause more intense alterations in the physical-chemical constituents. It was observed alterations ( $P<0,05$ ) of the values of the Dornic acidity, chloride concentration, pH and density. Of the 31 analysed flocks 25 (80,65%) had reactive animals to the CMT. 61,97% of the cases were multiparous ewes, 56,34% in females with one lamb and 66,07% had one mammary gland compromised. In the genotypic characterization of the *S. aureus* strains, three lineages was observed of which LA and



LC were the most prevalent ones with 38,9and 50,0%, respectively, with distribution in the flocks where this agent was isolated.

**KEY-WORDS:** Intramammary infection, sheep, etiology, CMT, SCC, physical-chemical, composition, genotypic characterization.

# 1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura vem apresentando um crescimento expressivo no setor agropecuário, principalmente no nordeste do Brasil, em virtude do grande interesse comercial que este tipo de atividade vem representando (MEDEIROS, 1998).

O bom lucro aliado ao rápido retorno do capital investido são dois motivos que despertam cada vez mais o interesse na criação de ovinos. O mercado para carne de cordeiro é bastante promissor; a criação de ovino precoce está em franca expansão e se tornou uma ótima alternativa no agronegócio, aliado ao fato dos ovinos fornecerem pele de excelente qualidade para a indústria do calçado, e em algumas regiões, o leite (NETTO, 2000).

No Brasil o rebanho ovino é composto por uma população de 13.856.747 animais, destes, a região Nordeste detém 7.752.139 ovinos, mais de 50% da população nacional (IBGE, 2007), que não atende a demanda, em relação à carne, tendo o Brasil que importar 900.000 cabeças, com peso médio de 30Kg, em 2002 (ANUÁRIO BRASILEIRO DA PECUÁRIA, 2004).

A região Nordeste concentra o maior rebanho ovino do Brasil, e não somente o Estado de Pernambuco, que teve um crescimento superior a 40% em seu efetivo de animais na última década, mas também os outros Estados, vêm apresentando um crescimento significativo na criação desta espécie animal, sob o ponto de vista quantitativo e qualitativo, relacionado à melhoria do manejo alimentar, do melhoramento genético e das práticas sanitárias. No entanto, apesar do incremento da ovinocultura, em função da necessidade de uma maior produtividade dos rebanhos, tanto para produção de carne como de leite para suprir os borregos de forma adequada, alguns fatores que são considerados limitantes à exploração têm sido negligenciados, como as questões relacionadas ao manejo, a nutrição e a sanidade (ALBENZIO et al., 2001).

O surgimento de algumas enfermidades relacionadas a estas práticas, prejudicam o sistema de produção, destacando-se a mastite em ovelhas, devido a elevada ocorrência de casos nas propriedades rurais em que a atividade da ovinocultura vem se tornando primária. A enfermidade representa um entrave na criação de ovinos, devido às perdas econômicas que vem acarretando e por limitar a produção de borregos, devido ao comprometimento funcional da glândula mamária, causando sérios prejuízos econômicos aos criadores da região, principalmente a mastite subclínica que de forma silenciosa ocasiona grandes perdas (WATSON & BUSWELL, 1984; COSTA et al., 2001; OLIVEIRA, 2006).

Dentre as raças criadas na região, o ovino Santa Inês vem merecendo maior destaque por sua rusticidade e produção de carne. Outra característica bem peculiar desta raça é a capacidade de produção de leite, o que confere uma condição bastante favorável para a criação dos seus borregos, no entanto predispondo à maior ocorrência da mastite (OLIVEIRA, 2000).

Na mastite subclínica não se detectam alterações na secreção láctea e no úbere, embora possam ser observados redução na produção de leite, alterações na sua composição físico-química, aumento do número de células somáticas e isolamento de microrganismos patogênicos, representando um grande entrave na produtividade dos rebanhos por acarretar perdas qualitativas, comprometendo a qualidade nutricional deste para a alimentação dos borregos (GREEN, 1984; PHILPOT & NICKERSON, 1991; BRAMLEY et al., 1996; NACCARI et al., 2003; SANTOS, 2004; PUGH, 2005).

Esta apresentação tem maior conotação pela associação significativa entre o aparecimento de mastite clínica a partir de antecedentes de mastite subclínica, causada pelo mesmo agente etiológico, acarretando o comprometimento da cadeia produtiva, sendo uma das razões mais freqüentes para o descarte de matrizes nos rebanhos ovinos (WATKINS et al., 1991; MENZIENS, 2000; OLIVEIRA, 2006).

Diante das evidências descritas na literatura sobre a importância econômica da enfermidade e considerando ser a forma subclínica da doença um problema potencial aos rebanhos não somente leiteiros, mas também corte, bem como a escassez de informações sobre o impacto desta apresentação de mastite nos principais componentes do leite, em ovelhas da raça Santa Inês, torna-se necessário o conhecimento da mastite subclínica na espécie ovina e a influência desta sobre as características físico-químicas do leite, com a finalidade de minimizar o impacto econômico desencadeado, visando à contribuição para a melhoria da cadeia produtiva da ovinocultura regional, aliado ao fato de que no Brasil, e particularmente na região Nordeste, serem escassos os estudos relacionados a este tema nesta espécie animal.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Realizar um estudo da mastite subclínica em ovelhas da raça Santa Inês e sua influência nas características físico-químicas do leite.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar os principais agentes etiológicos envolvidos na etiologia da mastite subclínica na região estudada;
- Avaliar o perfil de susceptibilidade *in vitro* dos agentes isolados frente aos antimicrobianos;
- Estabelecer a relação entre o isolamento bacteriano e o *Califórnia Mastitis Test*;
- Estabelecer a relação entre o isolamento bacteriano e a contagem de células somáticas;
- Avaliar as alterações da composição físico-química (Acidez Dornic, Teor de Cloretos, densidade, Gordura e pH) do leite proveniente de glândulas infectadas e não infectadas;
- Avaliar as alterações da composição físico-química do leite proveniente de glândulas reagentes ou não ao *Califórnia Mastitis Test*;
- Resgatar as principais informações epidemiológicas referentes aos rebanhos estudados;
- Realizar a caracterização genotípica das cepas de *Staphylococcus aureus*, isoladas nos rebanhos analisados, pela técnica de eletroforese em gel de campo pulsado;

## **3 REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1 Mastite Ovina**

Mastite é o processo inflamatório da glândula mamária, causada por agentes infecciosos, traumas ou irritações químicas e que ocasiona alterações físicas, químicas, celulares e microbiológicas no leite. Pode ser classificada como clínica ou subclínica com ou sem apresentação de sintomas, respectivamente (RADOSTITS et al., 2000). Normalmente é causada por bactérias, cuja agressão ao tecido glandular mamário resulta em gradativa diminuição da secreção láctea e eventual depreciação do animal (VIANNI, 1997). A mastite é considerada uma enfermidade muito antiga, sendo inclusive citada antes mesmo do descobrimento de bactérias patogênicas na glândula mamária, pois, trabalhos publicados em 1776 citavam as afecções do úbere acarretando problemas aos rebanhos leiteiros (HEIDRICH & RENK, 1969).

A mastite em ovelhas é doença comum nos rebanhos de leite ou corte e ultimamente o interesse pela enfermidade nesta espécie animal tem aumentado, especialmente nos criatórios destinados à produção de carne, pois pode levar à redução no ganho de peso dos cordeiros e causar aumento da mortalidade, uma vez que o leite é alimento fundamental para a manutenção da espécie, especialmente como colostro, oferecendo resistência às crias nos primeiros meses de vida (LANGONI et al., 1999).

O acometimento da glândula mamária frequentemente leva à perda do úbere ou da metade mamária afetada. Algumas formas de mastite têm um impacto significativo sobre as ovelhas, outras alteram a produção e os componentes do leite e, algumas influenciam no desenvolvimento dos animais lactentes, acarretando sérias perdas ao criador (SANTOS et al., 2007).

Os prejuízos decorrentes dessa enfermidade estão diretamente relacionados, nos casos agudos, à morte de ovelhas no pico da lactação, tendo um efeito deletério no desenvolvimento do lactente, podendo levar à morte do borrego, aliado aos custos adicionais com a utilização de sucedâneos, como também nos casos crônicos o descarte precoce de animais de alta linhagem genética devido à perda das mamas acometidas e conseqüente desvalorização comercial dos mesmos (WATSON & BUSWELL, 1984; VAZ, 1996; WINTER, 2001).

Quanto à forma de manifestação, a mastite pode ser classificada como clínica e subclínica, com e sem sinais evidentes, respectivamente. A dificuldade de rápido diagnóstico e sua maior prevalência torna a apresentação subclínica mais preocupante (McFARLAND et al, 2000).

A principal característica da mastite clínica é o leite visivelmente anormal (descolorido, presença de coágulos, com grumos e pus), associado em muitos casos ao aumento de volume, elevação da temperatura, dor e endurecimento da glândula mamária (CROSSMAN E HUTCHISON, 1995; RADOSTITS et al., 2000; SEARS & MCCARTHY, 2003).

Quanto à forma de transmissão, as mastites podem ser classificadas em primárias (contagiosas) e secundárias (ambientais). As mastites primárias ocorrem quando as bactérias são transferidas de uma glândula mamária infectada para outra sadia, pelo equipamento de ordenha, pela cria ou pela mão do ordenhador; ocasionada por patógenos que têm como habitat preferencial a glândula mamária e a pele dos tetos, caracterizadas por baixa incidência de casos clínicos e alta incidência de casos subclínicos, geralmente de longa duração ou crônicos (VAZ, 1996; RADOSTITS et al., 2000; FONSECA & SANTOS, 2001).

A mastite ambiental ocorre quando bactérias com reservatórios de infecção distintos da glândula mamária (por exemplo, o ambiente) têm acesso a glândula mamária, causando a enfermidade. Algumas enterobactérias são representativas da categoria de patógenos deste tipo de mastite, ocorrendo maior incidência de casos clínicos, com freqüente manifestação aguda principalmente no pré e pós-parto imediato (SMITH & HOGAN, 1992; RADOSTITS et al., 2000).

A mastite aguda ocorre em cerca de 5 a 10% das ovelhas lactantes por ano, sendo muito comum após a parição e quando os borregos possuem três a quatro meses de idade. Rebanhos com alta incidência de mastite aguda tendem a ter uma alta prevalência de mastite focal crônica. Neste caso, o decréscimo na produção de leite ocasiona o aumento da mortalidade dos borregos, particularmente em rebanhos nos quais são detectados alguns problemas como, por exemplo, a falta de cuidado com os animais na parição e a falha na seleção de ovelhas, que possam vir a ter anormalidades no úbere. Já a mastite crônica difusa tem sido associada com o aumento da mortalidade do borrego, em virtude das glândulas afetadas produzirem quantidade insuficiente de leite para o desenvolvimento dos borregos (KIRK & GLENN, 1996; BERGONIER & BERTHELOT, 2003).

No Brasil, o primeiro relato da doença na espécie ovina foi feito por Fernandes & Cardoso (1985) ao descreverem um surto de mastite por *Staphylococcus aureus* no Rio Grande do Sul. Em estudo recente, no Estado de Pernambuco, Oliveira (2007) observou que a mastite clínica esteve presente em 48,4% dos rebanhos da raça Santa Inês investigados.

A enfermidade é conhecida e estudada em ovelhas leiteiras, há alguns anos nos países em que a produção de leite ovino tem importância econômica, por existir tradição na produção e consumo de queijos finos. No entanto, a descoberta de que a enfermidade pode comprometer o ganho de peso e a sobrevivência de cordeiros em rebanhos destinados à produção de carne, aumentou o interesse pelo problema também em animais de aptidão para corte (FTHENAKIS e JONES, 1990; VAZ, 1996). Considerando a importância da enfermidade em sua apresentação subclínica, alguns autores têm realizado pesquisas em nosso país, com animais de direcionamento para produção de carne, evidenciando prevalências que variam de acordo com as condições de rebanho, metodologia e até mesmo conceitos estabelecidos pelos pesquisadores (LANGONI et al., 1999; COUTINHO et al., 2006; DOMINGUES et al., 2006; ALMEIDA et al., 2007; BLAGITZ, 2007; HERNANDES et al., 2007).

### **3.2 Mastite Subclínica**

Na mastite subclínica não se detecta alterações na secreção láctea e no úbere, embora possam ser observadas redução na produção leiteira, alterações na composição físico-química do leite, aumento do número de células somáticas e isolamento de microrganismos patogênicos (BRAMLEY et al., 1996). Pode resultar no aparecimento de cordeiros subdesenvolvidos, com sinais de desnutrição, levando à morte provocada por inanição em raças de corte, tendo esta apresentação grande impacto na produtividade sendo sua prevalência maior que a da forma clínica (PHILPOT & NICKERSON, 1991; PUGH, 2005).

Entre os pesquisadores existem conceitos diversos para se definir mastite subclínica. Batavani et al. (2003) conceitua como sendo resultante de reações positivas no *California Mastitis Test* e no isolamento bacteriano. Para Fthenakis (1994) estes parâmetros são a cultura positiva e a contagem de células somáticas superior a  $1 \times 10^6$  células/mL. Diante da dificuldade de diagnóstico, a mastite subclínica passa despercebida pela ausência de sinais e torna-se a mais preocupante apresentação da doença (McFARLAND et al, 2000).

Embora a mastite clínica seja responsável por perdas expressivas, a mastite subclínica assume elevada importância econômica, pelos prejuízos na produção e maior ocorrência no rebanho, quando comparada à forma clínica, associada ainda à ausência de sinais clínicos que dificultam a sua detecção (GROSS et al, 1978; VIANNI et al., 1992).

A mastite subclínica é um dos problemas sanitários mais importantes em rebanhos ovinos leiteiros ou de corte, tendo grande impacto na produção de leite pois, além de ocasionar sua diminuição, também pode alterar os seus componentes, podendo prejudicar a cadeia produtiva. (WATSON & BUSWELL, 1984; MAISI, 1987, GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ & CÁRMENES, 1996; OLIVEIRA, 2006). É uma importante afecção para animais direcionados à produção de carne, uma vez que o leite é o nutriente fundamental para a manutenção da espécie, particularmente o colostro, proporcionando proteção imunológica às crias em sua fase inicial de vida (LANGONI et al., 1999). Vários autores ratificam esta afirmação quando relatam que ovelhas com mastite subclínica podem ter sua produção de leite reduzida, podendo ainda causar diminuição de peso, retardo de crescimento e aumento da taxa de mortalidade dos cordeiros lactentes, o que se justifica pelo fato do leite ovino ser a principal fonte de nutrientes para os cordeiros durante as primeiras semanas de vida podendo, muitas vezes, passar despercebida (GROSS et al, 1978; McCARTHY et al., 1988; FTHENAKIS & JONES, 1990; MAVROGENIS et al., 1995; BRITO, 2004). A doença assume também grande importância econômica quando se detecta um maior percentual de ocorrência em animais de alto padrão genético, pois De Ila Cruz et al. (1994) consideram que quanto maior a produção leiteira maior a prevalência de mastite subclínica.

Vale ressaltar que a apresentação subclínica da mastite tem maior conotação por haver associação significativa entre o desenvolvimento de mastite clínica a partir de antecedentes de mastite subclínica, causada pelo mesmo agente etiológico (BOR , 1989; WATKINS et al.,1991).

### **3.2.1- Epidemiologia**

Nas ovelhas da raça Santa Inês acredita-se que a predisposição para a ocorrência desta enfermidade esteja relacionada à maior produção leiteira desta raça, principalmente durante o período das chuvas, quando há uma maior oferta de alimento, conseqüentemente um aumento na produção de leite (OLIVEIRA, 2000). Para Ribeiro et al. (2007) que avaliaram a composição e rendimento de queijo do leite de ovelhas Santa Inês, mesmo a raça sendo tradicionalmente



explorada para produção de carne, os animais apresentam alta produção de leite e duração da lactação elevada, com composição química do leite satisfatória à fabricação de queijos finos.

Gonzalez-Rodriguez et al. (1995) pesquisando a correlação entre a CCS do leite e o estado infeccioso das metades mamárias em ovelhas infectadas naturalmente, evidenciaram prevalência de 39,8% de mastite subclínica. Valores similares (41,4%) também foram descritos por ARIZNABARRETA et al. (2002), quando trabalharam com infecção em metades mamárias de ovelhas leiteiras realizando estudo de correlação da glândula mamária infectada e CCS em leite.

Em estudo realizado por Bergonier & Berthelot (2003) a incidência observada de mastite subclínica foi muito variável, 10 a 50%. Resultados superiores foram verificados por Batavani et al. (2003) em estudo de frequência da mastite subclínica em ovelhas quando relataram que o CMT mostrou alta prevalência da enfermidade, 71% dos animais testados de diferentes rebanhos eram positivos ao teste. Al-Majali & Jawabreh (2003) avaliando 318 ovelhas em lactação, encontraram prevalência de 18,3%, não evidenciando relação com lesões nos tetos, mas sim com a idade. Della Libera et al. (2007) cita que mastite subclínica nos pequenos ruminantes tem incidência anual entre 5-30%. No Brasil a ocorrência de mastite ovina subclínica é pouco conhecida, existindo relatos de 5% nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (VAZ, 1996) e em rebanhos da região de São Paulo Langoni et al. (1999) observaram 24% de isolamento bacteriano nas metades mamárias estudadas, enquanto Domingues et al. (2006) ao analisarem um rebanho de ovelhas de corte em Botucatu, detectaram 36,3% dos animais positivos.

É difícil considerar a prevalência de mastite subclínica ovina, por haver uma grande variação nos relatos, isto porque ocorrem diferenças quanto ao manejo, nutrição, tamanho do rebanho, raça, parição e período de lactação nos estudos realizados (FTHENAKIS, 1994; BATAVANI et al.2003).

A ocorrência de mastite subclínica é maior em ovelhas multíparas que em primíparas (STHEFANAKIS et al., 1995). Albenzio et al. (2002) relataram aumento dos casos de mastite infecciosa ovina com o aumento do número de lactações.

McDougall et al. (2002) verificaram que os animais estavam mais predispostos à infecção subclínica no início da lactação do que 40 dias pós-parto. Menziens & Ramanoon (2001) identificaram como período de maior susceptibilidade o início e o final da lactação. O final da

lactação das ovelhas se inicia no momento em que os cordeiros são separados da mãe, sendo este período também considerado propício ao acometimento da glândula mamária ovina pela mastite subclínica (FTHENAKIS, 1996). Em trabalho recente, Blagitz et al. (2007) observaram que não houve diferença quanto ao resultado do CMT e exame bacteriológico que pudesse ser associada às fases de lactação, embora a celularidade tenha sido maior no início e final da lactação. Hendy et al. (1981) relataram que um período seco maior que sessenta dias aumenta os riscos de desenvolvimento da infecção intramamária.

Tem-se observado que a frequência da enfermidade é mais alta nos casos em que a ovelha produz somente um cordeiro; quando o parto é duplo ou triplo o consumo de leite aumenta, favorecendo o melhor funcionamento das glândulas mamárias (OLIVEIRA, 2000).

A condição corporal das ovelhas ao parto e durante o início da lactação constitui uma situação de extrema importância, pois ovelhas de baixa produção leiteira para suprir o número de cordeiros, são particularmente predispostas a lesões nas tetas. Isto ocorre devido à forte sucção exercida pelo cordeiro, podendo a mastite ser desencadeada por lesões nos tetos. Situação contrária se dá a partir da sucção inadequada dos tetos pelos cordeiros, induzindo a um ineficiente esgotamento do leite da glândula e à predisposição à infecção intramamária (MENZIENS & RAMANOON, 2001). A má conformação do úbere também pode impedir o acesso de borregos lactentes e levar a um acúmulo de leite nas glândulas predispondo à enfermidade (VAZ, 1996).

Os cordeiros rejeitados também contribuem para manutenção da doença no rebanho, uma vez que têm o hábito de sugar várias ovelhas, que podem estar infectadas ou não, aumentando o risco de disseminação da doença (BERGONIER & BERTHELOT, 2003).

Em ovelhas criadas a pasto a incidência da enfermidade é baixa, sendo os casos existentes relacionados por PUGH (2005), ao hábito destes animais ao decúbito noturno, expondo os tetos ao solo, já nos animais estabulados muitos são os casos desencadeados devido às lesões na teta (RADOSTITS et al, 2000). Sevi et al. (2001), sugerem que o espaço é um fator crítico na criação de ovelhas leiteiras e indicam que uma área menor que  $7\text{m}^3/\text{animal}$  pode afetar a performance e a saúde dos animais.

Em trabalho com rebanhos criados em sistema intensivo, Albenzio et al. (2002), observaram que os casos de mastite infecciosa (amostras de leite com isolamento bacteriano

positivo e  $CCS > 10^6$ ) aumentaram com o número de lactações, entretanto os de mastite não infecciosa (amostras de leite bacteriologicamente negativas e  $CCS > 10^6$ ) foram mais frequentes em ovelhas jovens e os casos de mastite latente (amostras de leite bacteriologicamente positivas e  $CCS < 3 \times 10^5$ ) predominantemente relatada na terceira e quarta parições.

Watkins et al. (1991) e Fthenakis (1994) observaram uma associação positiva significativa entre a prevalência de mastite subclínica e a idade das ovelhas. Relatos similares foram realizados por Sthefanakis et al. (1995), que estudaram a frequência de mastite subclínica em ovelhas de leite e observaram maior ocorrência da doença em ovelhas múltíparas que em primíparas.

### **3.2.2 Diagnóstico**

O diagnóstico da mastite subclínica em ovelhas é importante em decorrência da doença ser conhecida por causar diminuição na quantidade e qualidade da produção do leite (TORREZ-HERNANDEZ & HOHENBOKEN, 1979; FTHENAKIS, 1988; FTHENAKIS & JONES, 1990), resultando em diminuição de taxa de crescimento de crias e aumento da mortalidade de borregos (GROSS et al., 1978; FTHENAKIS, 1988; FTHENAKIS & JONES, 1990). A contagem de células por microscopia direta ou automática, o *California Mastitis Test* (CMT), assim como outros métodos, têm sido utilizados na detecção da mastite subclínica, que é a forma predominante nesta espécie (KEISLER et al., 1992; McDOUGALL et al., 2001; ALBENZIO et al., 2002). A sua importância como fator limitante à produção está bem documentada em vacas e cabras e pouco relatada em ovelhas, porém diante de sua importância faz-se necessária o seu monitoramento (PENGOV, 2001). Independente do método de diagnóstico há concordância de que este deva ser utilizado de maneira a identificar os animais doentes o mais rapidamente possível, para que se evite a disseminação da enfermidade, o descarte dos animais, a perda de peso da cria, e os gastos com medicamentos (VAZ, 1996; LAS HERAS, 1999a).

#### **3.2.2.1 California Mastitis Test (CMT)**

O CMT é um método subjetivo de análise sendo considerado semi-quantitativo, baseado na estimativa da CCS no leite, identificando de forma indireta aumentos na quantidade de tais células (MENZIENS & RAMANOON, 2001). O teste baseia-se na avaliação do pH e presença

de células com DNA, portanto, o maior ou menor número de células presente no leite determina a maior ou menor intensidade da resposta (PUGH, 2005).

O CMT tem sido bem utilizado para vacas e é mais acurado nesta espécie, pois, ovelhas, tendem a ter uma alta contagem celular, fragmentos nucleares, partículas citoplasmáticas e gordura em leite normal (FTHENAKIS, 1991) sendo portanto considerado um teste subjetivo que pode ser usado como triagem na espécie ovina para identificar animais para cultura, podendo encontrar nos animais selecionados um alto percentual de cultura negativa. Diante da subjetividade do teste, por produzir resultados falso-positivos ou falso-negativos, tem-se questionado a sua interpretação (GREEN, 1984; MAISI et al., 1987; BATAVANI et al., 2003). A capacidade do teste para prever a infecção intramamária ovina depende da prevalência e do agente etiológico presente no rebanho (HUESTON et al., 1986).

Para MENZIENS & RAMANOON (2001) este teste pode ser muito útil como triagem para identificação de ovelhas com mastite subclínica, considerando que as chances de seleção de animais com infecção intramamária são maiores quando amostras consideradas com valor de CMT de 1 + ou maiores são selecionadas. Os resultados obtidos por Clements et al. (2003) em seu trabalho de avaliação de procedimentos diagnósticos para mastite subclínica em ovelhas de corte, sugerem que o CMT é melhor utilizado como teste diagnóstico com um limite de 3 + e uma CCS  $> 1,2 \times 10^6$ , especialmente em rebanhos onde há baixa prevalência da doença.

McDougall et al. (2001) relataram que o CMT é o melhor teste indireto como preditor de infecções mastíticas em ovinos e caprinos, e que está associado ao aumento da contagem de células somáticas e isolamento bacteriano, podendo variar de acordo com o operador, raça do animal, patogenicidade das bactérias e rebanho. Blagitz (2007) analisando glândulas mamárias de ovelhas Santa Inês concluiu que havia relação entre o exame físico, o perfil celular e o bacteriológico, no entanto, a inflamação da mama foi melhor identificada pelo CMT. A confiabilidade do CMT foi comparada em um estudo à campo com outros métodos indiretos, contagem de células somáticas (CCS) e cultivo bacteriológico, onde foram utilizados animais de três raças diferentes, a acurácia do CMT foi alta quando comparada com a CCS, com a correlação de 0,82; 87% das amostras foram classificadas corretamente, 4% falso-positivas e um valor preditivo de resultados positivos de 89,6%. Desta forma os autores consideraram que o CMT pode ser uma boa técnica diagnóstica nas três raças avaliadas (GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ & CÁRMENES, 1996). Berriatua et al. (2001) ratificaram este conceito quando ao investigar um

surto de mastite subclínica em um rebanho de ovelhas leiteiras, determinaram que os resultados de CMT positivo foram significativamente associados com os resultados de cultivo bacteriológico positivo ( $P < 0,01$ ). Maisi et al. (1987) e Watkins et al (1991) também indicaram que o CMT foi de fácil utilização no diagnóstico da mastite subclínica ovina em rebanhos de corte, com boa correlação com resultados de exame bacteriológico e de contagem de células somáticas no leite.

A sensibilidade e especificidade do CMT e CCS foram demonstradas por Berthelot et al.(2006), excedendo 90%, o que constitui o teste como confiável e útil para identificação de infecção intramamária na espécie ovina. Hueston et al. (1986) demonstrou que os resultados positivos ou negativos do CMT dependem da prevalência da doença.

### **3.2.2.2 Contagem de Células Somáticas**

A resposta inflamatória da glândula mamária apresenta como consequência direta o aumento no número de leucócitos de origem sanguínea que são transportados para dentro do lúmen alveolar. Dessa forma, células somáticas no leite designa as células presentes no leite, que incluem as células de origem sanguínea (leucócitos) e células de descamação do epitélio glandular secretor (FONSECA & SANTOS, 2001).

O processo inflamatório subclínico da glândula mamária é caracterizado por uma migração anormal de células somáticas no leite (SCHULTZ, 1977). Portanto, a contagem de células em uma amostra de leite permite avaliar a intensidade do processo inflamatório de acordo com o maior ou menor número dessas células por mL de leite, podendo, em casos de baixo conteúdo celular, não ter ocorrido alteração em decorrência de um estágio muito inicial ou final do processo inflamatório da mama, ou ainda por colonização da mesma por agentes bacterianos de baixa patogenicidade (ALBENZIO et al., 2002).

A contagem de células somáticas é a base dos programas de controle de leite para vacas, caprinos e ovinos em outros países (PAAPE et al., 2007) e pode ser realizada por microscopia óptica direta (PRESCOTT & BREED, 1910) e por métodos (GREEN, 1984). Schalm et al. (1971) citaram o método microscópico direto de Prescott & Breed como um dos melhores testes para avaliação precisa do número de células somáticas do leite. A CCS por métodos eletrônicos tem sido discutida por alguns autores como passíveis de adequação, considerando que a padronização dos aparelhos costuma ser realizada utilizando-se leite de vacas, que apesar de

garantir menor custo na realização do teste desconsidera as diferenças entre as características celulares das espécies. Aliado ao custo de calibração com leite ovino, existe ainda a dificuldade de aceitação deste procedimento por parte dos laboratórios que rotineiramente trabalham com amostras de leite da espécie bovina (OLIVEIRA, 2006).

A CCS se destaca pela praticidade e pela precisão dentre os métodos de diagnóstico que se baseiam na maior presença de células somáticas em amostras de leite de animais infectados, sendo um parâmetro inflamatório considerado bom, como fator preditivo de processos inflamatórios, infecciosos ou não, da glândula mamária (SCHULTZ, 1977; SILVA, 1999b) embora possa ser influenciada por variação diurna, idade, estágio de lactação, níveis de produção, número de crias, quantidade da amostra e outros agentes etiológicos (PERIS et al., 1991; GONZALLO et al., 1994;). A CCS é inversamente proporcional à produção de leite, à medida que a quantidade de leite diminui a contagem de células somáticas aumenta (PUGH, 2005).

Fthenakis (1996), evidenciou o aumento nos valores médios da CCS no final da lactação sem a presença de infecção intramamária, o que para Gonzalo et al. (1994) é considerado como aumento fisiológico de início ou final de lactação. Contrariamente, os resultados das investigações de Silva et al. (1999b) e Luengo et al. (2004), indicaram que a CCS se elevou com o aumento do número de parições e estágio de lactação em cabras e vacas mas não em ovelhas. Fthenakis (1996), estudando o comportamento da CCS de três raças distintas de ovelhas leiteiras, determinou que a raça e parição não afetaram a CCS, enquanto razões não infecciosas como variação diurna e estágio de lactação afetaram a contagem celular na espécie ovina.

A elevação da CCS no leite de uma glândula afetada está geralmente associada à sua diminuição de produção. Essa redução na produção de leite pode ocorrer a partir do dano físico às células epiteliais secretoras da glândula mamária, assim como a alterações na permeabilidade vascular no alvéolo secretor (FONSECA & SANTOS, 2001).

A alta contagem de células somáticas e a diminuição da produção de leite estão associadas às infecções subclínicas, onde se faz necessária a implantação de programas de controle da enfermidade para melhoria da qualidade do leite e aumento do retorno econômico da produção. A mensuração da CCS em leite de ovelhas pode ser um recurso efetivo para monitoramento de mastite subclínica (PENGOV, 2001; GONZALO et al., 2002).

Em animais saudáveis geralmente a contagem de células somáticas é em torno de  $5 \times 10^5$  céls/mL, mas em animais com mastite subclínica ou com infecções crônicas o valor excede  $1 \times$

$10^6$  céls/mL (FTHENAKIS et al., 1998). A intensidade da resposta é variável em função do tipo e virulência do agente envolvido no processo infeccioso (FTHENAKIS & JONES, 1990; ARIZNABARRETA et al., 2002; SUAREZ et al., 2002). Para Green (1984) o valor médio da contagem de células, para glândulas mamárias não infectadas é de  $3,42 \times 10^5$  células/mL e para glândulas infectadas de  $3,99 \times 10^6$  células/mL, recomendando ainda que amostras lácteas com contagens superiores a  $1,0 \times 10^6$  células/mL sejam examinadas bacteriologicamente, por representarem perdas na produção de leite em ovelhas.

Nos Estados Unidos o limite legal estabelecido para as espécies caprina e ovina é de  $1,0 \times 10^6$  células/mL (PAAPE et al., 2007). Fthenakis (1996) ratificaram este limite quando relataram que CCS menor que  $1 \times 10^6$  foi encontrada em 98,1% das glândulas sadias analisadas. No Sul do Brasil, Brito et al.(2006) relataram valores médios de CCS de 171.750 células/mL para ovelhas leiteiras.

As células somáticas se elevam com intensidade variável em função do tipo de agente etiológico envolvido no processo infeccioso (GREEN, 1984). Valores médios de CCS de 932.000 células /mL foram relatados por Pugh (2005) em pesquisa com glândulas mamárias infectadas por *Staphylococcus* coagulase-negativo, enquanto infecções por outros patógenos apresentaram média de 2.443.000 células/mL e a média em amostras não infectadas foi de 272.000 células/mL.

Winter et al. (2004) avaliaram casos de mastite subclínica por *Listeria* spp. e observaram que a contagem de células somáticas se elevou de 800.000 céls/mL para 10.100.000 céls/mL. Para Harmon (1994), Gonzalez et al. (1995) e Paape et al. (2007) o principal fator influenciador no aumento das células somáticas do leite é o nível de infecção da glândula mamária. Moroni et al. (2001) avaliando a correlação da infecção da glândula mamária à parâmetros imunes em ovelhas, relataram a importância da CCS para o diagnóstico de infecções intramamárias, mostrando contagens de células somáticas muito altas nas metades mamárias infectadas.

As amostras com contagens inferiores a 500.000 células e isolamento positivo e as amostras com contagens superiores a 500.000 células e isolamento negativo, provavelmente se devem a animais portadores assintomáticos e processos inflamatórios não infecciosos, tratamentos recentes para mastite, além da possibilidade de baixa patogenicidade do agente, do não isolamento do microrganismo em apenas um exame ou da presença de agentes infecciosos com exigências de crescimento incompatíveis com os meios de cultivo empregados (SCHULTZ, 1977; BURRIEL, 1997; PHILPOT & NICKERSON, 2002; HARTMAN et al., 2007). Fthenakis

(1988) observou que CCS de glândulas infectadas experimentalmente foi menor que um milhão nas primeiras 12 horas após inoculação, justificando em alguns casos a bacteriologia positiva, com contagens celulares baixas no leite.

### **3.2.3 Agentes Etiológicos causadores de mastite em ovinos**

O isolamento e a identificação de patógenos causadores de infecção intramamária é um critério indicado para definir o diagnóstico da mastite, principalmente para a mastite subclínica, pois, considerando as possibilidades de elevação fisiológica da CCS, as interpretações de métodos de diagnóstico baseados na presença de células de defesa no leite, como o CMT e a CCS, devem ser realizadas de maneira criteriosa, associando os resultados obtidos com o isolamento bacteriano (SILVA, 1999a; OLIVEIRA, 2006). Para Gonzalo et al, (1993), a identificação do agente etiológico envolvido é importante, uma vez que alguns microrganismos estão associados à altas contagens de células somáticas, enquanto outros induzem apenas a uma moderada inflamação.

A mastite subclínica em pequenos ruminantes pode ter como agente etiológico mais prevalente, bactérias como *Staphylococcus* coagulase-negativo e *Staphylococcus aureus* (DOMINGUES & LEITE, 2005; COUTINHO et, 2006; OLIVEIRA, 2006). Al-Majali & Jawabreh (2003) trabalhando com prevalência e etiologia da mastite subclínica ovina, isolaram em maior frequência *Staphylococcus aureus* (39%). São relatados ainda como agentes de mastite subclínica, *Corynebacterium bovis*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *Micrococcus* sp., *Bacillus* spp. e *Streptococcus* spp. (FERNANDEZ et al., 2001; MENZIES & RAMANOON, 2001; PENGOV et al., 2001; OLIVEIRA, 2006). Batavani et al. (2003), estudando a mastite subclínica ovina observou prevalência de 39% das mamas infectadas e as principais bactérias foram *Staphylococcus* coagulase negativo (41%), *Bacillus cereus* (33%), *Staphylococcus aureus* (22%) e *Streptococcus* spp. (4%).

Os *Staphylococcus* coagulase-negativos, são considerados não patogênicos ou de baixa patogenicidade para a glândula mamária de ruminantes. Entretanto, algumas espécies têm sido incriminadas como causadoras de resposta inflamatória similar ao *Staphylococcus* coagulase positivo, permitindo concluir claramente que estas bactérias são patogênicas para a glândula mamária de ovelhas (FTHENAKIS & JONES, 1990; BATAVANI et al., 2003).



Fthenakis & Jones (1990) em experimento reproduzindo a infecção intramamária empregando seis espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativo, observaram diferenças de patogenicidade entre os isolados inoculados, que acarretaram elevação na contagem de células somáticas e reação inflamatória em amostras de tecido mamário que foram biopsiadas, variando as apresentações de mastite subclínica à mastite clínica.

Em estudo de prevalência e incidência da mastite subclínica em cabras e ovelhas McDougall et al. (2002), determinaram que o *Staphylococcus* coagulase-negativo foi o agente etiológico mais comumente isolado e que o leite bacteriologicamente positivo teve aumento significativo na CCS, quando comparado ao leite das glândulas sem infecção.

Várias espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativo são comumente encontradas no leite e sobre a pele do teto de ruminantes domésticos, e podem ser introduzidas da pele para a glândula mamária no ato de sucção do cordeiro (BURRIEL, 1998; BATAVANI et al., 2003). Estes microrganismos têm sido considerados como a maior causa de infecção intramamária subclínica em várias investigações (WATSON & BUSWELL, 1984; HUESTON et al., 1986; BOR et al., 1989; KEISLER et al., 1992; VIANNI et al., 1992; LAFI et al., 1998; HARTMAN et al., 2007). Fthenakis (1988), relatou que estas bactérias estão presente em 43,5% dos tetos e 24,5% da cisterna do teto de glândulas sadias (sem parênquima infectado), sendo a possível razão de bactérias isoladas de amostras com CCS menores que 1 milhão, podendo-se considerar como possíveis sítios de origem.

A inoculação experimental da glândula mamária por *Staphylococcus epidermidis* foi realizada por Winter & Colditz (2002), tendo como resposta um fluxo intenso de neutrófilos para o leite, porém de forma transitória, acompanhado por febre e discreta leucopenia, o que permitiu aos autores a conclusão de que a atenuação do mecanismo de defesa do hospedeiro pode dificultar a eliminação da bactéria pela glândula mamária, sendo um fator importante para o desenvolvimento de mastite subclínica ou crônica. Os *Staphylococcus* coagulase-negativos em ovelhas ocasionam não somente mastite subclínica, mas também mastite clínica, pois o estágio clínico pode evoluir de um processo subclínico (BOR et al., 1989).

Devido à sua grande importância, o *Staphylococcus aureus* desperta muito interesse entre os pesquisadores mundiais. Este agente se caracteriza por colonizar o canal do teto, situando-se em posição estratégica para penetração na glândula mamária, e ao penetrar burla as defesas celulares, é fagocitado por neutrófilos, permanecendo viável no interior destes e ao destruí-los,

inicia novas infecções. O *S. aureus* possui a capacidade de encistamento, formando focos encapsulados e de difícil acesso a antibioterapia que não possua boa dispersão, o que favorece o desenvolvimento de processos subclínicos e crônicos (SEARS E MCARTHY, 2003; GONÇALVES, 2006). Dinges et al. (2000) estudaram as suas toxinas, comprovando sua atividade pirogênica e hemolítica. Rainard et al. (2003) estabeleceram uma relação entre as leucotoxinas produzidas e a resposta das células polimorfonucleares. Simão (2004) e Santos (2004) relataram as alterações clínicas, hematológicas e físico-químicas do leite de ovelhas Santa Inês com mastite induzida experimentalmente por este agente. Mork et al. (2005) identificaram 64 diferentes biotipos de *Staphylococcus aureus* em infecção intramamária ovina.

Outro agente causal das infecções intramamárias subclínicas em ovinos é o *Streptococcus* spp., sendo detectado por Hartman et al. (2007) como segundo gênero de bactéria mais encontrado nas amostras de leite de ovelhas da raça Bergamácia. Vários pesquisadores evidenciaram a presença de *Streptococcus* spp. em rebanhos ovinos e obtiveram isolamentos em leite de glândulas mamárias clinicamente sadias, com percentuais variáveis entre 4% e 25% (GONZALEZ et al., 1995; BATAVANI et al., 2003; AL-MAJALI & JAWABREH, 2003; COUTINHO, 2006; HERNANDES et al., 2007).

As espécies de *Pseudomonas* são microrganismos ambientais encontrados na água, solo e plantas mas também podem ser encontradas na pele, mucosas e fezes, tendo como principal representante do gênero a *Pseudomonas aeruginosa*, que causa infecções oportunistas, embora outras espécies possam ser isoladas a partir de espécimens clínicos (MANTERE-ALHONEN, 1995; QUINN et al., 2005). A *P. aeruginosa* pode ser responsável por uma pequena quantidade de casos e pode ser causa de mastite clínica e subclínica, sendo responsável por surtos com significativa repercussão sanitária e econômica. É considerada um patógeno oportunista que geralmente ocasiona doença depois do estresse, condições debilitantes, sendo comum no ambiente de fazenda, especialmente em água (LAS HERAS et al., 1999b).

Berriatua et al. (2001) publicaram o relato de um surto de mastite subclínica por infecção natural em um rebanho ovino leiteiro, associado à bactéria *Burkholderia cepacia*, onde isolou-se o microrganismo de 66,7% das amostras positivas ao CMT, sendo a primeira descrição do complexo *B. cepacia* causando infecção ovina.

Gonzalez et al. (1995) estudando a correlação entre CCS e infecção intramamária, evidenciaram isolamento de enterobactérias em aproximadamente 7% das amostras analisadas e

Al-Majali & Jawabreh (2003) detectaram 19% de isolamento destas bactérias em leite de ovelhas leiteiras. No Brasil, Oliveira (2006) analisando o leite de ovelhas da raça Santa Inês de um rebanho do Estado de Sergipe, evidenciou que 14% das amostras positivas ao isolamento bacteriano era de *enterobactérias*.

Outros agentes etiológicos considerados na mastite são os fungos, que causam infecção intramamária raramente diagnosticada; leveduras e algas que também podem infectar a glândula mamária ovina, porém passam despercebidos por ocasionarem mastite subclínica (DOMINGUES & LEITE, 2003). Pugh (2005) relata a importância do *Mycoplasma* spp. como patógeno relevante e cada vez mais freqüente na glândula mamária de pequenos ruminantes, com diagnóstico difícil, havendo tentativas repetidas de cultura bacteriana, que falham no isolamento do patógeno e diante disto, a infecção intramamária raramente é diagnosticada. Deve-se considerar ainda o diagnóstico diferencial para o retrovírus Maedi-Visna, pois tem sido implicado em alterações da glândula mamária ovina (VAZ, 1996; MENZIENS & RAMANOON, 2001), podendo estar presente no rebanho, como constatado por De La Cruz et al. (1994), quando pesquisaram a etiologia e prevalência da mastite subclínica em várias fazendas e evidenciaram soroprevalência de 12% nos animais em estudo. No Brasil, Costa et al. (2007) realizando levantamento sorológico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes em ovinos da raça Santa Inês no Estado de Pernambuco evidenciaram baixa prevalência nos animais testados, muito embora em um dos rebanhos da região do Agreste tenha sido verificada sorologia positiva em 11,10% dos animais analisados.

#### **3.2.4 Perfil de susceptibilidade frente a antimicrobianos**

O uso indiscriminado de agentes antimicrobianos para tratamento de mastite pode ocasionar o aumento dos níveis de resistência de muitos microrganismos a estas drogas (CONTRERAS et al., 1995; COSTA et al., 1999). A resistência bacteriana múltipla aos antimicrobianos tem levado a sérios problemas no tratamento de doenças bacterianas e tem se tornado um grande problema de Saúde Pública, uma vez que muitos antibióticos usados em animais também são usados em seres humanos (FTHENAKIS et al., 1998; GÕNI et al., 2004).

Fernandez Riera et al. (2000) determinando a sensibilidade antimicrobiana de cepas de *S. aureus*, isoladas de mastite clínica e subclínica ovina, relataram que a resistência antibiótica dos microrganismos presentes no leite ovino é baixa, sendo este comportamento bacteriano associado

ao uso limitado de drogas antimicrobianas nestes animais. A resistência dos agentes bacterianos se dá pelo emprego prévio de antimicrobianos, que podem ser utilizados no tratamento da mastite assim como de outras enfermidades, inclusive inibindo o crescimento bacteriano em análises microbiológicas (CONTRERAS et al., 1995).

Os *Staphylococcus aureus* isolados de leite de ovelhas com mastite subclínica foram mais sensíveis à ação dos antimicrobianos que as cepas de mastite clínica (FERNANDEZ RIERA et al., 2000). Pengov & Ceru (2003) observaram que *S. aureus* isolados de leite ovino expressaram uma alta taxa de sensibilidade em relação às amostras bovinas. A alta sensibilidade de isolados de leite de ovelhas foi demonstrado por Gutierrez et al. (1990) quando determinaram o perfil de sensibilidade de *Staphylococcus* spp. a drogas antimicrobianas e observaram que todas as amostras foram sensíveis a cefalotina, neomicina e novobiocina; embora a resistência à penicilina e tetraciclina tenha sido evidenciada em algumas amostras. Fthenakis (1998), estudando a sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de cepas de *Staphylococcus* spp. de leite ovino, também verificaram alta sensibilidade, uma vez que 100% dos crescimentos bacterianos foram sensíveis a cefoperazona, cefuroxima, cloxacilina, enrofloxacina e meticilina. Os maiores índices de resistência foram relatados por Coutinho et al. (2006) que estabeleceram o perfil em bactérias (*Staphylococcus* coagulase-negativo, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. e *Micrococcus* sp) isoladas de leite ovino, e constataram maior resistência destes microrganismos com o uso da penicilina G, neomicina e ampicilina. A resistência dos *S. aureus* aos antimicrobianos pode ser codificada cromossomicamente mediada por plasmídios (SOUZA et al., 2005).

O perfil de sensibilidade *in vitro* dos *Streptococcus* spp. isolados em metades mamárias de ovelhas da raça Santa Inês foi realizado por Domingues et al. (2006), e evidenciaram que as drogas de melhor eficácia neste grupo bacteriano foram o florfenicol, gentamicina e cefalexina.

Langoni et al. (1999) relataram a partir da avaliação do perfil de sensibilidade de patógenos da mastite ovina que as *enterobactériaceas* exibiram maior sensibilidade a gentamicina (71,43%), neomicina (64,29%), cefalotina (53,04%), ampicilina (23,07%) e oxacilina (6,60%).

### **3.2.5 Caracterização genética das cepas de *Staphylococcus aureus***

Apesar da diversidade de agentes etiológicos implicados na mastite ovina, as bactérias do gênero *Staphylococcus* são o grupo mais freqüentemente isolado, sendo responsáveis por 75-80%

dos casos subclínicos (FERNANDEZ RIERA et al., 2000). Dentro deste gênero *S. aureus* representa um agente de importância histórica tanto por sua casuística na mastite clínica e subclínica como por suas implicações na Saúde Pública (LAS HERAS et al., 1999).

Em contraste com a mastite bovina existem poucas informações no campo da epidemiologia molecular de *S. aureus* isolados de mastite subclínica ovina. Por esta razão são necessários estudos para se estabelecer os reservatórios, a transmissão, a dinâmica da infecção, os fatores de risco e a associação entre clones isolados (VAUTOR et al., 2005).

Os métodos fenotípicos caracterizam os produtos da expressão gênica, diferenciando as cepas. A genotipagem é baseada na análise da estrutura genética de um microrganismo, caracterizados pela fragmentação do cromossomo ou pelo estudo de DNA extracromossômico. Os métodos genotípicos apresentam menor variação natural, mas podem ser afetados por inserções ou deleções do DNA cromossômico, por ganho ou perda de DNA extracromossômico ou por mutações aleatórias que criam ou eliminam sítios de reconhecimento, alterando a ação das endonucleases de restrição (TENOVER et al., 1997; TAMBIC, et al., 1999).

De acordo com Gonçalves (2006) a diversidade de protocolos existentes para extração e purificação de DNA genômico de bactérias Gram-positivas reflete a variabilidade da composição bioquímica encontrada em diferentes células e microrganismos. Estas diferenças protocolares procuram solucionar problemas decorrentes de DNAses endógenas, do isolamento de polissacarídeos inibidores de enzimas, de substâncias fenólicas ou de outras substâncias que possam danificar o material genético.

A técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed field gel electrophoresis*-PFGE) foi inicialmente utilizada como um método de investigação de DNA cromossômico de células eucariontes, sendo posteriormente usada para tipagem de muitas cepas bacterianas, como uma variação da eletroforese convencional em gel de agarose (TENOVER et al., 1995). A orientação do campo elétrico é alterada ou pulsada periodicamente, e as moléculas de DNA respondem orientando-se continuamente mudando a direção de migração através do gel de agarose. Esta técnica pode ser utilizada tanto para bactérias Gram-positivas quanto para Gram-negativas e é considerada altamente discriminatória e reprodutível para cepas endêmicas e epidêmicas (BERETTA, 2004; TENOVER et al., 1995; TENOVER et al., 1997).

Segundo Beretta (2004) devido à diversidade e estabilidade de perfis de DNA genômico, vários autores (OLIVE & BEAN, 1999; MONTESINOS et al., 2002) indicaram a técnica de

PFGE para tipagem epidemiológica de cepas de *Staphylococcus aureus* por ser muito precisa, sendo considerada padrão ouro, devido ao seu alto poder discriminatório entre cepas.

A técnica de PFGE tem sido amplamente utilizada para estudo de vários microrganismos envolvidos em surtos de infecções. Para cada espécie, deve ser aplicada a enzima de restrição, que melhor identifique as variações entre cepas. No caso de *S. aureus*, a enzima *SmaI* é a mais indicada (VAN BELKUM et al., 1998; BERETTA, 2004; VAUTOR et al., 2005; SILVEIRA-FILHO, 2007).

Os critérios de interpretação para as categorias de relação genética e epidemiológica são: isolados iguais, muito relacionados, possivelmente relacionados e isolados não relacionados. O critério de interpretação para a tipagem de bactérias utilizando o método de PFGE permite as definições de padrões de similaridade entre cepas bacterianas (TENOVER et al.; 1995; BLANC et al., 2001).

### **3.2.6 Alterações Físico-químicas**

Vários fatores interferem na quantidade e qualidade do leite produzido, dentre entre esses fatores estão a raça, idade da ovelha, estágio de lactação, o número de cordeiros, manejo de rebanho, nível nutricional, luminosidade e infecções no úbere (RAINARD et al., 1990; WILSON et al., 1995; FUERTES et al., 1998; PUGLIESE et al., 2000).

Na mastite, as alterações provocadas no tecido mamário refletem não somente na produção, como também nas características físico-químicas do leite, onde os principais componentes podem estar alterados, comprometendo a qualidade nutricional deste para a alimentação dos borregos (GREEN, 1984; SANTOS, 2004).

As alterações físico-químicas da composição do leite também são utilizadas para diagnosticar indiretamente as mastites, notadamente as mastites subclínicas, por sua forma silenciosa de manifestação (SILVA, 1999a), uma vez que as infecções da glândula mamária provocam redução da produção e mudança da composição do leite, que variam de acordo com a intensidade e a duração das infecções (BRITO et al., 1997). TRONCO (2003) justifica estas alterações pelo fato do leite ter uma composição que favorece como substrato ideal para o desenvolvimento de diversos grupos de microrganismos, que podem provocar alterações no leite e mesmo sua contaminação. Pode-se atribuir as alterações das características físico-químicas do leite produzido por uma glândula infectada, a três fatores principais: alterações na permeabilidade

vascular devido ao processo inflamatório, lesão do epitélio secretor responsável pela síntese de alguns componentes específicos do leite e ação de enzimas originadas pelas células somáticas e microrganismos presentes no leite (FONSECA & SANTOS, 2001).

Como o estado sanitário da glândula mamária influencia na quantidade e qualidade do leite produzido (PUGLIESE et al., 2000), as determinações dos teores de gordura, proteína, lactose e extrato seco são importantes, não só para avaliação dos parâmetros normais do leite ovino, mas também para as alterações provocadas pela mastite, uma vez que a modificação na composição do leite mastítico é reflexo do processo inflamatório instalado na glândula mamária. Ocorre ainda elevação das proteínas em decorrência do aumento de permeabilidade, assim como a passagem de eletrólitos que fazem com que o pH se aproxime ao do sangue (SCHALM, 1977).

Nas mastites subclínicas o leite é caracterizado por alcalinização do pH, aumento do número de células somáticas e diminuição da produção (RADOSTITS et al., 2002). Assenat (1991) relata valores de pH, para ovelhas da raça Lacaune, entre 6,60 e 6,68 e Brito (2003 e 2006) trabalhando com ovelhas leiteiras na Serra Gaúcha, revela que o pH médio durante a lactação desses animais situa-se entre 6,53 e 6,7. Em estudo experimental induzindo mastite clínica com *S. aureus*, Santos et al. (2007) evidenciaram o comprometimento da produção e as alterações significativas das características físico-químicas do leite, caracterizadas por redução da acidez Dornic e do teor de gordura e a elevação do pH e do teor de cloretos. Em trabalho com ovelhas Santa Inês, foi observada diferença significativa no pH do leite de glândulas sadias quando comparadas às infectadas, havendo um aumento desta variável (NUNES et al., 2007). Lima Júnior (1991) estudando os efeitos da mastite subclínica na espécie caprina, sobre as características físico-químicas, verificou diferença entre metades mamárias sadias e doentes nos valores médios de pH, sendo bastante sensível como indicador de mastite subclínica em cabras. Della Libera et al., (2001) comparando vacas com valores médios de CCS de até 500.000 a vacas com valores médios de CCS superiores a 500.000, também evidenciou valores estatisticamente mais altos de pH e teor de cloretos nos animais com contagens mais altas. Entre as características físico-químicas do leite, o pH é uma das alterações mais pronunciadas, tendendo a alcalinidade (FONSECA & SANTOS, 2001).

O aumento da passagem de íons cloretos ( $Cl^-$ ) para o leite de glândulas infectadas, ocorre como mecanismo de compensação para restabelecer o equilíbrio osmótico do leite em relação ao sangue, uma vez que a lactose que desempenha papel importante neste equilíbrio encontra-se

diminuída nos processos mastíticos (em torno de 10%), elevando assim o teor de cloretos do leite (FONSECA & SANTOS, 2001). Nunes et al.(2007) em estudo com ovelhas da raça Santa Inês, corroboraram estes relatos quando afirmaram que amostras de leite com cultivo bacteriológico positivo tiveram teor de cloreto significativamente aumentado, indicando aumento de permeabilidade. Lima Júnior (1991) avaliando os efeitos da mastite subclínica sobre as características físico-químicas do leite caprino, observou que os valores médios de teor de cloreto foram mais altos nas amostras de leite oriundas de animais com a enfermidade do que nas amostras de leite de animais sadios.

A gordura é o componente do leite que tem maior amplitude de variação e dependendo da dieta fornecida aos animais pode variar entre duas e três unidades percentuais. A gordura do leite depende de variáveis como raça, alimentação, manejo dos animais e fase de lactação (SCHULZ, 1997; PERES, 2001). Valores médios de gordura em leite de ovelhas leiteiras de 5,97%, 6,7% até 7,19% foram descritos, respectivamente, por Assenat (1991), Gonzalo et al. (1994) e Luquet (1991). No Brasil, Oliveira (2006) avaliou a composição do leite de ovelhas Santa Inês durante diferentes períodos de lactação e relatou a variação no teor de gordura entre 3,59% a 9,51%. Em animais com mastite evidencia-se um decréscimo no teor de gordura, em torno de 10% (FONSECA & SANTOS, 2001). Embora Albenzio et al. (2002), tenham observado nas mastites infecciosas alto conteúdo de gordura no leite das ovelhas, que pode ter ocorrido pelo fato de ser produzido um pequeno volume de leite, quando comparado às ovelhas com mastite latente. Para Della Cruz et al. (1994) não houve diferença significativa para produção de leite ou gordura quando ovelhas infectadas por *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* foram comparadas às saudáveis, apesar do autor associar este resultado à variação de produção entre animais encontrada nas fazendas analisadas, sugerindo que pode influenciar na detecção de possíveis diferenças entre ovelhas sadias e infectadas subclínicamente. Não ocorreram diferenças estatísticas entre o percentual de gordura do leite de vacas ou cabras sadias ou com mastite subclínica (VIANNI, 1986; LIMA JÚNIOR, 1991).

Densidade é o peso específico do leite, determinado pela concentração de elementos em solução e suspensão e pela porcentagem de gordura. Como a água apresenta densidade de 1g/mL, a gordura possui densidade abaixo desse valor e a densidade dos sólidos não gordurosos apresenta valores superiores, a densidade final do leite depende do balanço desses componentes. A densidade sofre impacto direto da diminuição dos sólidos totais do leite, apresentando uma



sutil diminuição do seu valor (FONSECA & SANTOS, 2001; TRONCO, 2003). Assenat (1991) relatou que a densidade média do leite de ovelha varia entre 1.036g/mL e 1.037g/mL. Brito (2003) realizando caracterização físico-química do leite de ovelhas da raça Lacaune, encontrou densidade média de 1.035,8 g/mL. Souza et al. (2005), avaliando a composição química do leite de ovelhas da raça Corriedale, observaram que a menor densidade do leite foi 1.030,00 e a mais alta foi de 1.042,0. Lima Júnior (1991) avaliou a influência da mastite subclínica sobre a densidade do leite de cabras e revelou que não houve diferença significativa entre as médias da densidade de leite de animais sadios ou com a doença.

O teste de acidez Dornic detecta aumentos na concentração de ácido láctico, uma vez que esse é formado pela fermentação da lactose por bactérias e, conseqüentemente, indica a qualidade microbiológica inadequada do leite. Sendo assim, uma elevada acidez implica em elevados níveis de ácido láctico resultante da alta contagem bacteriana (PERES, 2001). Embora, não somente a presença de ácido láctico determine alteração na acidez, outros componentes do leite também interferem nesse parâmetro, entre esses compostos podem ser citados a concentração de dióxido de carbono, citrato, fosfato e proteína; os resultados de trabalho de Brito et al. (2006) demonstraram que estes compostos aumentam fisiologicamente com o progresso da lactação, pois a acidez pode variar por causas normais como: raça, individualidade animal, fase colostrar e período de lactação, tendo encontrado valores médios de acidez Dornic de 25,13 +/- 4,7 °D. Conforme Assenat (1991), a acidez do leite ovino em graus Dornic (°D), situa-se entre 18 e 22°D. Lima Júnior (1991) estabelecendo os efeitos da mastite subclínica sobre as características físico-químicas do leite, relatou que esta enfermidade em cabras ocasiona a diminuição dos valores de acidez do leite.

#### **4- MATERIAL E MÉTODOS**

##### **4.1- Local de Realização do trabalho**

O estudo foi realizado em 31 rebanhos de ovinos da raça Santa Inês localizados em 15 municípios na região do Agreste Meridional do Estado de Pernambuco (Águas Belas, Bom Conselho, Brejão, Buíque, Canhotinho, Garanhuns, Iati, Itaíba, Jupi, Lajedo, Paratama, Pedra, Saloá, São João e Teresinha). As amostras foram processadas no Laboratório Clínico da Clínica de Bovinos, Campus Garanhuns / UFRPE, Laboratório de Referência Nacional em Fagotipagem de *S. aureus* da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Laboratório de Ecologia

Microbiana Molecular do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP e Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, RJ.

#### **4.2- Animais**

Foram empregadas 135 ovelhas primíparas e multíparas da raça Santa Inês em diferentes estágios de lactação. Nenhuma das ovelhas em estudo se encontrava no período de secagem nem recém paridas, não sendo colhido material nos quinze dias após o parto, nem em final de lactação. Nos rebanhos estudados não se adotava o manejo de ordenha das ovelhas, por se tratar de uma raça de aptidão para corte. Os borregos foram separados de suas mães aproximadamente 12 horas antes do exame da glândula mamária para posterior colheita do leite.

#### **4.3- Exame clínico da glândula mamária**

O exame clínico da glândula mamária foi efetuado seguindo as recomendações de Grünert (1993) e Diffay et al. (2005), com posterior análise da secreção láctea e triagem dos animais sem alterações nas características físicas do leite e no exame da glândula para posterior acompanhamento laboratorial dessas amostras.

##### **4.3.1- *California Mastitis Test* (CMT)**

O CMT foi realizado seguindo as recomendações de Schalm & Noorlander (1957). Os resultados foram classificados em quatro escores: negativo (negativo ou traços), 1+, 2+ e 3+ (SCHALM et al.,1971) sendo consideradas positivas as reações que na leitura apresentaram a formação de gel, indicando uma reação entre o agente aniônico de superfície tensoativa presente no reagente utilizado e o ácido desoxirribonucléico-DNA liberado do núcleo das células presentes no leite.

#### **4.4- Colheita e processamento das amostras**

Após desprezar os primeiros jatos de cada metade mamária e realizado o CMT, aproximadamente 30mL de leite foi colhido para a contagem de células somáticas e análise

físico-química do leite, sendo mantidos sob refrigeração. Logo em seguida, após prévia higienização do úbere e criteriosa antissepsia do óstio do teto com álcool a 70°GL, as amostras (aproximadamente 5mL) foram acondicionadas em tubos de vidro com tampa rosqueada previamente esterilizados e transportadas ao laboratório, sob refrigeração em caixa de material isotérmico, contendo gelo reciclável para análise bacteriológica.

#### **4.4.1- Contagem Direta de Células Somáticas**

A contagem de células por microscopia direta foi realizada de acordo com o método de Prescott & Breed (1910), modificado pelo *Subcommittee on Screening Tests, National Mastitis Council* (1968), Schalm et al. (1971) e adaptado por Santos (2007). Para cada amostra foram preparados dois esfregaços, onde inicialmente o leite era homogeneizado e com auxílio de uma pipeta automática, 10µL de leite era distribuído em uma área de 1cm<sup>2</sup> de uma lâmina de vidro. Em seguida os esfregaços foram secos a 35<sup>0</sup>C em superfície plana por cinco minutos, sendo posteriormente imergidos em xilol por dez minutos, drenados, secos e mergulhados em álcool etílico a 95 °GL por cinco minutos; após secagem os esfregaços foram corados. O corante utilizado foi o Panótico Rápido<sup>1</sup> (corante hematológico), imergindo os esfregaços por 10 segundos na solução nº 1, 10 segundos na solução nº 2 e 1 minuto na solução nº 3, para depois serem rapidamente lavados em água destilada, e após secos procedia-se a leitura em microscópio ótico<sup>2</sup>. Para realização das contagens celulares utilizou-se objetiva de imersão, o fator microscópio (FM) foi de 352876,82 e o fator de trabalho (FT) 3528,77. Em cada esfregaço, cem diferentes campos foram contados e a contagem de células somáticas calculada a partir da fórmula:  $CCS = FT \times C$ , onde C correspondia a média do número total de células contadas nos dois esfregaços.

Todas as células com núcleo, como também aquelas com mais da metade do corpo celular dentro do campo microscópico foram contadas. Elementos celulares com núcleos desintegrados e fragmentos celulares foram desconsiderados.

---

<sup>1</sup> Panótico Rápido (corante para uso hematológico) – Laborclin produtos para laboratórios Ltda, Pinhais, PR.

<sup>2</sup> Microscópio *Leica*, model CME, USA.

#### 4.4.2- Análise físico-química do leite

As amostras de leite foram analisadas seguindo as recomendações do Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA, 1981). Antes da realização dos testes as amostras foram homogeneizadas por inversão e posteriormente determinou-se a densidade, a acidez em graus Dornic (<sup>0</sup>D), o potencial de hidrogênio (pH), a gordura (%) e o teor de cloretos (mEq/L), este último sendo determinado quantitativamente pelo método colorimétrico, seguindo as recomendações do fabricante<sup>3</sup> com leitura efetuada em analisador bioquímico semi automático<sup>4</sup>.

#### 4.4.3- Análise bacteriológica

O cultivo bacteriológico das amostras de leite foi realizado de acordo com o método recomendado pelo *National Mastitis Council* (1990). As amostras de leite foram incubadas a 37<sup>0</sup>C por 24h, em condições de aerobiose. Após homogeneização e com o auxílio de uma alça de platina calibrada, 10μL de leite foram transferidos para placas de ágar sangue desfibrinado de carneiro a 5% e agar MacConkey<sup>5</sup> e incubadas a 37<sup>0</sup>C, realizando-se leituras às 24, 48, 72 e 96h. Nestas, foram observadas as características culturais das colônias (morfologia, produção de pigmento e hemólise) e morfo-tintoriais, por meio do método de coloração de Gram, permitindo desta forma uma visão preliminar das bactérias envolvidas no processo (QUINN et al., 1994).

Para a caracterização dos membros dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* foram adotadas as especificações de Carter e Cole Júnior (1990) e Quinn et al. (1994). Inicialmente realizou-se a prova da catalase; as colônias identificadas como pertencentes ao gênero *Staphylococcus* foram submetidas ao teste da coagulase em tubo, utilizando plasma de coelho<sup>6</sup>. As amostras coagulase positiva foram submetidas a provas bioquímicas para identificação da espécie bacteriana (QUINN et al.,1994; MACFADDIN, 2000). Em relação aos Gram-negativos, cerca de cinco a dez colônias de cada placa de cultivo foram transferidas para o meio de triagem de Agar Ferro-Açúcar Triplo<sup>7</sup> e incubadas a 37<sup>0</sup>C por 18 – 24 horas. A identificação dos diversos gêneros e/ou espécies fundamentou-se na apreciação de um complexo conjunto de caracteres bioquímicos complementares, segundo as especificações de Ewing (1986), Carter e Cole Júnior

---

<sup>3</sup> Cloreto, LABTEST

<sup>4</sup> Analisador Bioquímico Semi-Automático - LABQUEST

<sup>5</sup> Agar MacConkey (Oxoid)

<sup>6</sup> Coagu-Plasma, Laborclin

<sup>7</sup> Triple Sugar Iron (TSI), Difco

(1990), Quinn et al.(1994). Os isolados bacterianos foram mantidos criopreservados (-20<sup>0</sup>C) em Caldo Infuso Cérebro-Coração<sup>8</sup>, adicionado de glicerol a 15%.

#### **4.4.4- Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos**

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado pelo método de difusão de discos (BAUER et al., 1966), seguindo as especificações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI/NCCLS (2005), tendo como critério de escolha aqueles empregados na terapêutica em Medicina Veterinária. Desta forma, 3 a 5 colônias com as mesmas características morfológicas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 4 a 5mL de caldo Casoy<sup>9</sup> e incubadas a 37<sup>0</sup>C por um período suficiente para apresentar uma turbidez equivalente a 0,5 da escala padrão de McFarland. Em seguida, foi realizada a semeadura com *swab* estéril sobre a superfície do meio de agar Mueller-Hinton<sup>10</sup>. A etapa seguinte consistia na deposição dos discos, fazendo-se leve pressão para permitir o contato entre os mesmos e a superfície do meio inoculado. Utilizou-se discos<sup>11</sup> impregnados com os seguintes antimicrobianos: Ampicilina (AMP-10µg), Cefalotina (CEP-30µg), Cefoxitina (FOX-30µg), Enrofloxacin (ENR-5µg), Eritromicina (ERY-15 µg), Estreptomicina (STR-10µg), Florfenicol (FLF-30µg), Gentamicina (GEN-10µg), Kanamicina (KAN-30 µg), Neomicina (NEO-30 µg), Oxacilina (OXA-1µg), Penicilina G (PEN-10UI), Penicilina/Novobiocina (PNM-40µg), Sulfazotrim (SXT-25µg) e Tetraciclina (TCY-30 µg). Para o controle da qualidade de execução e confiabilidade dos resultados obtidos, cepas padrão (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) foram testadas sob as mesmas condições de meios de cultivo e incubação.

#### **4.4.5- Genotipagem das cepas de *S. aureus***

Foram caracterizados 18 isolados de *S. aureus* obtidos de leite de ovelhas da raça Santa Inês, procedentes dos rebanhos estudados.

##### **a) Análise do DNA cromossômico por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).**

---

<sup>8</sup> Caldo BHI-Acumedica

<sup>9</sup> Caldo Casoy-Vetec

<sup>10</sup> Mueller Hinton-MicroMED

<sup>11</sup> Sensibiodisc, Cecon / Sensifar-Vet, Cefar Diagnóstica

A análise do DNA cromossômico foi realizada utilizando a técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) descrita por Pfaller et al. (1993).

As amostras de *S. aureus* foram semeadas em Ágar Columbia<sup>12</sup> acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado e foram incubadas em aerobiose em estufa bacteriológica durante 24 h a 37°C. Após este período, cerca de 5 colônias foram repicadas em tubos estéreis com tampa rosqueável contendo 10 mL de caldo TSB<sup>13</sup> e incubados *overnight* a 37°C sob agitação orbital de 180 rpm. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 4000 rpm durante cinco minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado três vezes com solução salina 0,9% (m/v) sob as mesmas condições descritas anteriormente e, após a segunda lavagem, a suspensão foi transferida para um tubo de centrifuga previamente pesado. A suspensão foi novamente centrifugada a 6500 rpm por 60 segundos e todo sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta. O sedimento foi pesado e ressuspensionado em 50 mM de EDTA (pH 8,0) na concentração final de 1 mg/μL. Desta suspensão, 10 μL foram transferidos para um tubo de microcentrifuga contendo 400 μL de tampão EC previamente aquecido a 50°C, adicionado de 450 μL de agarose Low Melting<sup>14</sup> 2% (p/v) e 20 μL de lisostafina<sup>15</sup> (1 mg/mL), previamente aquecidos. Esta mistura foi rapidamente transferida para os moldes de preparação dos blocos de agarose e mantidos sob refrigeração a 5°C durante 30 minutos. Os blocos foram transferidos para uma placa de microdiluição contendo 2,0 mL de tampão EC e incubados por 7 horas a 37°C. Após a incubação, os blocos foram lavados três vezes com 2,0 mL de tampão CHEF TE e, a seguir, novamente incubados por 12 horas em 2,0 mL de tampão ES adicionados de 100 μL de Proteinase K<sup>16</sup>. Em seguida, os blocos foram lavados cinco vezes com 2,0 mL de tampão CHEF TE, com intervalos de 1 hora entre as lavagens, e armazenados nesta solução até serem submetidos à digestão enzimática e eletroforese. A cepa *S. aureus* ATCC 6538 foi utilizada como controle positivo da reação.

#### **b) Digestão do DNA cromossômico pela enzima de restrição *Sma*I**

Para o tratamento com a enzima de restrição, metade de um bloco de agarose de cada amostra foi transferida para um novo recipiente contendo 300 μL de tampão DNS. O tampão foi substituído e os blocos incubados durante 1 hora à temperatura ambiente. Este processo foi

---

<sup>12</sup> Agar Columbia Difco

<sup>13</sup> Trypticase Soy Broth, Difco

<sup>14</sup> Sigma

<sup>15</sup> Sigma

<sup>16</sup> USB

repetido quatro vezes. Após este período, o tampão DNS foi substituído por 200 µL do tampão da enzima de restrição, previamente diluído e os blocos incubados por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida o tampão foi descartado e novamente adicionados 200 µL de tampão e 40U da enzima *SmaI*<sup>17</sup>. Os blocos foram então incubados durante 12 horas a 30°C. Quando os blocos não foram utilizados imediatamente, eles foram conservados sob refrigeração a 5°C após bloquear a reação pela adição de 200 µL de tampão TBE 1x.

### c) Eletroforese de campo pulsado

Os blocos de agarose contendo os fragmentos de DNA da bactéria foram fixados sobre o pente de preparação do gel com agarose previamente preparada e aquecida (1% de agarose em 120 mL de TBE 0,5x). Em seguida o gel de corrida foi preparado pela adição do restante da agarose líquida no suporte e a corrida de eletroforese foi programada e executada em um sistema de múltiplos estados. O equipamento utilizado foi o CHEF DR III<sup>18</sup>.

Para obter maior separação dos fragmentos de DNA e permitir melhor visualização dos resultados, ao serem comparados diversos padrões eletroforéticos, a duração do tempo de pulso foi aumentada gradativamente durante a corrida “*switch time ramping*”. A eletroforese foi realizada com intervalos de tempo de pulso de 1 a 30 segundos, que em geral permite a melhor separação dos fragmentos de DNA cromossômico de *S. aureus* quando este é clivado com *SmaI*.

A apresentação do programa de eletroforese empregado foi realizado no **Bloco 1** com tempo de corrida de 12 horas, voltagem de 6,0 volts/cm; ângulo de 120°; tempo de pulso inicial de 1 segundo e final de 5 segundos e temperatura de 14°C e no **Bloco 2** com tempo de corrida de 12 horas; voltagem de 6,0 volts/cm; ângulo de 120°; tempo de pulso inicial de 15 segundos e final de 30 segundos e temperatura de 14°C.

### d) Análise e interpretação dos resultados da PFGE

O agrupamento dos padrões de restrição obtidos por PFGE foi obtido utilizando o software bionumerics versão 5.0<sup>19</sup>.

Os critérios adotados para a identificação clonal das amostras de *S. aureus* foram os seguintes: amostras que compartilharam um mesmo padrão de fragmentos de restrição foram

---

<sup>17</sup> Fermentas

<sup>18</sup> BioRad

<sup>19</sup> Applied Maths, Kortrijk, Belgica

designadas com uma mesma notação alfabética. Amostras que divergiram por 1 a 3 fragmentos receberam, além de uma mesma notação, por pertencerem a um mesmo clone, índices numéricos diferentes representando os diferentes subtipos. As amostras que diferiram por 4 ou mais padrões de bandas receberam notações alfabéticas distintas, sendo consideradas pertencentes a tipos diferentes (TENOVER et al., 1995). As amostras genotipicamente idênticas e as que apresentaram não mais que três bandas diferentes foram agrupadas, de acordo com Booth et al. (2001), em uma mesma linhagem de *S. aureus*.

#### **4.5- Dados epidemiológicos**

As informações epidemiológicas foram obtidas mediante aplicação de um questionário ao criador ou tratador dos animais, no qual resgatou-se informações referentes aos rebanhos e aos animais estudados como idade, estágio da lactação, número de partos e crias, ocorrência anterior de mastite, número de glândulas afetadas, condição higiênico-sanitária, entre outras informações de importância epidemiológica.

#### **4.6- Análise Estatística dos dados**

Com a finalidade de quantificar a associação e de investigar o comportamento entre CMT e CCS foram realizadas análises estatísticas utilizando-se medidas resumidas da variância da variável qualitativa e o recurso do gráfico *box-plot*, respectivamente. Para verificar associação entre o grau de intensidade do CMT e o isolamento bacteriano, aplicou-se o teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson ao nível de significância de 5% de probabilidade (BUSSAB & MORETTIN, 2004).

As características físico-químicas do leite foram analisadas por meio da estatística descritiva e de inferência, onde as variáveis acidez, cloreto, densidade, gordura e pH foram agrupadas pelo *Califónia Mastitis Test* (CMT). Também como forma de avaliar a hipótese de normalidade e homogeneidade das variâncias dos dados, utilizou-se como mecanismo o método gráfico (gráfico de probabilidade e histograma) e o teste F, respectivamente. Os valores médios das variáveis acidez, cloreto, densidade, gordura e pH analisadas nas amostras de *Califónia Mastitis Test* (CMT negativo, 1+, 2+ e 3+) apresentaram distribuições amostrais normais, sendo os dados comparados pelo *teste t* de Student ao nível de significância de 5 % de probabilidade. Os dados das variáveis: acidez, cloreto, densidade, gordura e pH analisados nas amostras de



glândulas mamárias sadias, infectadas e infectadas pelos agentes *Staphylococcus* coagulase negativo, *Staphylococcus* coagulase positivo, *Streptococcus* spp. e grupo de bactérias Gram negativas apresentaram distribuições amostrais normais, sendo os valores médios destas variáveis comparados através do teste *t* de Student ao nível de significância de 5 % de probabilidade (VIEIRA, 1980). Com o objetivo de avaliar as características epidemiológicas, realizou-se um estudo descritivo das variáveis estudadas, seguindo as recomendações de Curi (1997).

Os softwares SPSS 8.0.0 versão Windows e Statistica 6.0 foram utilizados para realização da estatística descritiva e aplicação dos testes estatísticos sobre os dados das variáveis analisadas.

## 5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

De uma população constituída de 135 ovelhas, 270 glândulas mamárias foram submetidas ao exame clínico, sendo selecionadas 244 glândulas para este estudo, uma vez que 26 metades mamárias foram diagnosticadas com mastite clínica.

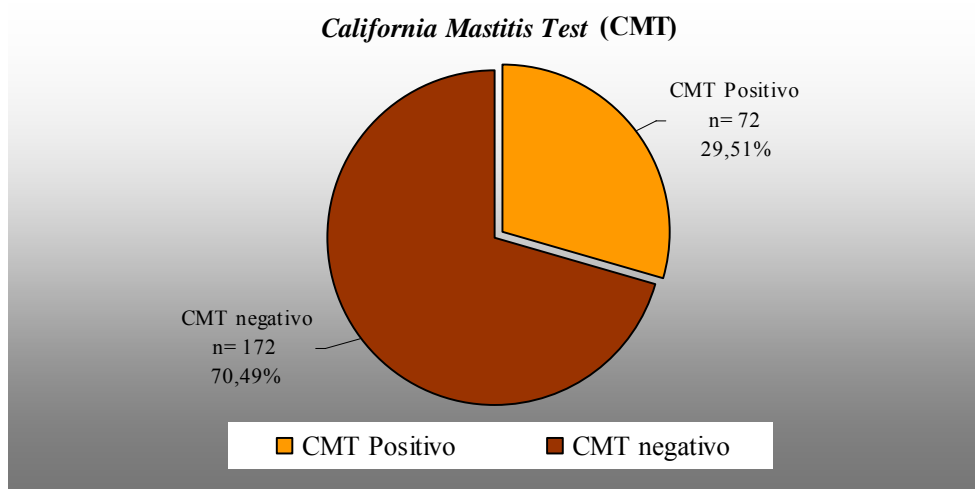
### 5.1- *Califórnia Mastitis Test (CMT)* e *Contagem de Células Somáticas (CCS)*

Das 244 amostras de leite provenientes das glândulas estudadas, 72 (29,51%) reagiram ao CMT (Figura 1), destas 18 apresentaram reação 1+ (25,0%); 25 reação 2+ (34,7%) e 29 reação 3+ (40,3%) (Figura 2).

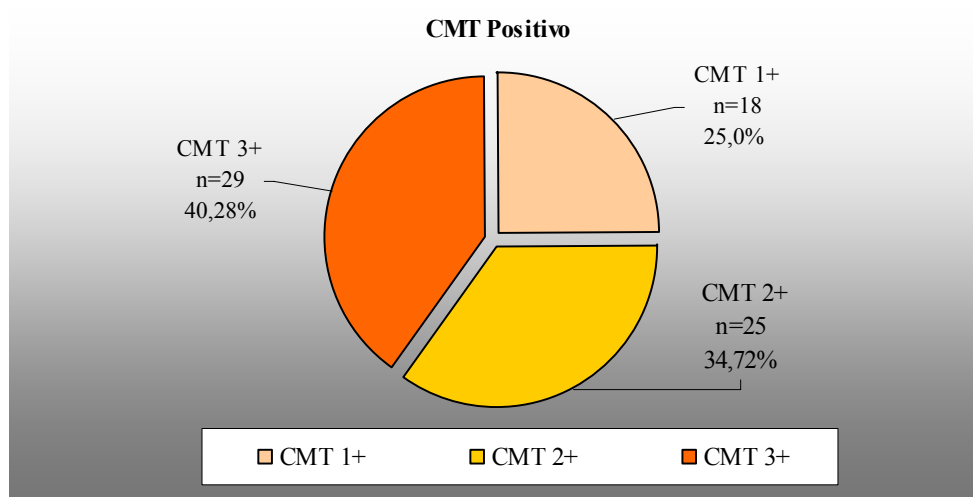
Resultados semelhantes foram observados por Domingues et al. (2006), que utilizaram o CMT como recurso de diagnóstico da mastite subclínica em um rebanho de ovelhas da raça Santa Inês observando 36,3% de glândulas positivas, com a seguinte distribuição de resultados por escores: 1+ (21,6%), 2+ (34,1%) e 3+ (44,3%), tendo sido também detectada similaridade a este estudo os achados de Coutinho et al. (2006), que verificaram um percentual de 31,45% de positividade ao teste em um estudo da mastite em um rebanho do Estado da Bahia. Oliveira (2006), em estudo da mastite ovina também em um único rebanho do Estado de Sergipe, realizou o CMT e diagnosticou um percentual maior de amostras consideradas positivas (41,1%), quando comparado às desse estudo.

Batavani et al. (2003), pesquisando 12 rebanhos de ovelhas nativas leiteiras no Iran, detectaram 71% das glândulas mamárias positivas ao CMT. Os autores atribuíram os altos valores de positividade do CMT encontrados nos rebanhos avaliados, às peculiaridades da espécie ovina em ter uma alta contagem celular, fragmentos nucleares, partículas citoplasmáticas e gordura em leite fisiológico, o que propicia o diagnóstico de resultados falso-positivos.

A utilização do CMT na espécie ovina, apesar de questionado por alguns autores (GREEN, 1984; MAISI et al., 1987; BATAVANI et al., 2003), vem sendo empregado e recomendado por outros, como teste indicativo da mastite subclínica por ser uma prova de fácil e barata execução, além de estar significativamente associado à contagem de células somáticas e ao cultivo bacteriológico positivo (WATKINS et al., 1991; FTHENAKIS, 1995; GONZALEZ-RODRIGUEZ & CÁRMENES, 1996; BERRIATUA et al., 2001; ALMEIDA et al., 2007a).



**Figura 1** - Frequência dos resultados positivos e negativos (n=244) do CMT do leite de ovelhas Santa Inês.



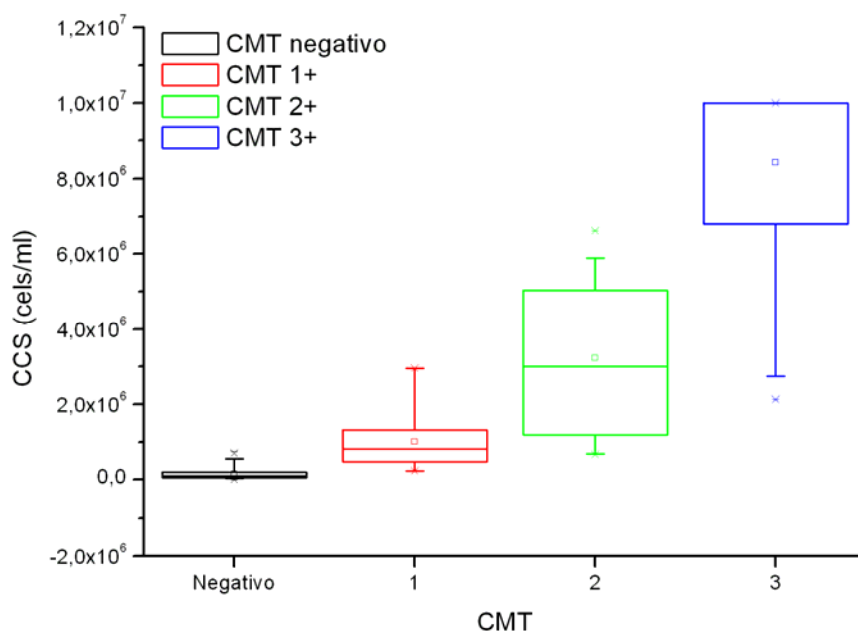
**Figura 2** - Frequência dos graus de positividade nas 72 amostras de leite de ovelhas Santa Inês reagentes ao CMT.

No que diz respeito à análise da contagem de células somáticas paralelamente aos respectivos graus de intensidade da prova do CMT 1+, 2+ e 3+, pode-se verificar valores médios da CCS de 1.008.060,83 céls/mL; 3.233.232,24 céls/mL e 8.417.936,0 céls/mL, respectivamente. As amostras não reagentes ao teste apresentaram valor médio de 157.622,54 células/mL (Tabela 1).

**Tabela 1** - Resultados do *California Mastitis Test* (CMT) e valores médios e desvios padrão ( $\bar{x} \pm s$ ) da contagem de células somáticas (CCS) de amostras de leite de ovelhas Santa Inês.

Reações do CMT	Glândulas mamárias (n=244)	%	CCS (cels/mL de leite) $\bar{x} \pm s$
negativo	172	70,49	157.622,54 $\pm$ 147.422,11
1+	18	7,38	1.008.060,83 $\pm$ 730.0590,23
2+	25	10,25	3.233.232,24 $\pm$ 2.014.055,06
3+	29	11,88	8.417.936,0 $\pm$ 2.679.453,08

Após análise do gráfico *Box-plot* (Figura 3), verificou-se a existência de forte dependência dos valores médios da CCS em relação aos níveis de intensidade do CMT (1+, 2+ e 3+), indicando forte dependência entre estas variáveis, em decorrência das características da curva exponencial, ou seja, quanto maior a intensidade da reação no CMT, maior a contagem de células somáticas.



**Figura 3** - Demonstração do gráfico *Box-plot* da tendência crescente da intensidade da reação do CMT e a elevação dos valores médios da CCS.

Esta forte associação observada entre os métodos direto e indireto de diagnóstico da mastite subclínica em ovelhas foi demonstrado por outros autores. GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ & CÁRMENES (1996) verificaram alta acurácia do CMT quando comparado à CCS, com um coeficiente de correlação de 0,82, classificando corretamente 87% das amostras. McDougall et al. (2001) também relataram a existência de correlação positiva (0,77) entre a CCS e o CMT. Maisi et al. (1987) e Watkins et al (1991) relataram boa correlação do CMT com os resultados da contagem de células somáticas e do exame bacteriológico do leite, demonstrando que este teste pode ser confiável e prático em animais de aptidão para carne.

Os valores médios de 8.417.936 células/mL, para a CCS das amostras classificadas como escore 3+, no CMT deste estudo, apesar de elevados quando comparados a alguns autores (GREEN, 1984; FTHENAKIS, 1995), foram semelhantes aos relatados por McDougall et al. (2001) trabalhando com ovelhas leiteiras. Os altos valores de CCS observados nesta pesquisa, superiores a oito milhões, correspondendo ao escore 3+ do CMT, podem ser justificados pelo fato das ovelhas Santa Inês, consideradas como de aptidão para corte e diferentes da grande maioria dos rebanhos analisados por outros autores, que trabalharam com ovelhas leiteiras, apresentarem volume inferior de leite, o que provavelmente acarretou maior concentração celular, associado ao agente infeccioso.

A CCS é inversamente proporcional à produção de leite, à medida que a quantidade de leite diminui a contagem de células somáticas aumenta (WILSON et al., 1995; PUGH, 2005). Para Contreras et al. (1996) e Zeng & Escobar (1997), as células fazem parte da defesa da glândula mamária e podem ser empregadas como parâmetro de saúde animal e qualidade do leite, podendo alterar-se entre outros fatores pela produção de leite da ovelha (MENZIES & RAMANOON, 1995).

Nas amostras não reagentes ao CMT, verificou-se valores médios de 157.622,54 céls/mL (Tabela 1), contagem esta inferior as relatadas em outros estudos, que variou de 171.750 a 630.000 células/mL em amostras de leite de ovelhas sadias (FTHENAKIS, 1994; FUERTES et al., 1998; McDOUGALL et al., 2001 e BRITO et al., 2006).

## **5.2- Isolamento bacteriano**

Das 244 amostras de leite analisadas, 100 (40,98%) apresentaram crescimento bacteriano. Destas, seis apresentaram crescimento misto, totalizando 106 isolados (Tabela 2).

Percentuais semelhantes de isolamento bacteriano a partir de leite de ovelhas têm sido observados por outros autores, como Ariznabarreta et al (2002), que relataram infecção intramamária subclínica de 41,4% das amostras, semelhante a Gonzalez-Rodriguez et al. (1995) que evidenciaram 39,8%. Já Batavani et al (2003), determinaram a presença de infecção intramamária, em rebanhos ovinos, em 51% das metades mamárias avaliadas. Langoni et al. (1999), em estudo da flora microbiana do leite de ovelhas no Estado de São Paulo, revelaram resultados de isolamento bacteriano inferiores a este estudo, com 24% de amostras positivas ao cultivo.

**Tabela 2** – Frequência de isolamento dos gêneros/espécies bacterianos nas amostras de leite de ovelhas da raça Santa Inês (n=106).

Agente bacteriano	Isolamento	
	n	(%)
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo (SCN)	69	65,09
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	13,21
<i>Staphylococcus hyicus</i>	2	1,88
<i>Streptococcus</i> spp.	8	7,55
<i>Bacillus</i> spp.	3	2,83
<i>Citrobacter freündii</i>	1	0,94
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	0,94
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	1,88
<i>Escherichia coli</i>	1	0,94
<i>Burkholderia cepacia</i>	2	1,88
<i>Pseudomonas putida</i>	1	0,94
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	0,94
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	0,94

Neste estudo o gênero com maior frequência de isolamento do leite das ovelhas Santa Inês foi *Staphylococcus* (SCN, *S.aureus* e *S. hyicus*) correspondendo a 80,18%, seguido pelo grupo das bactérias Gram-negativas (9,43%), *Streptococcus* spp. (7,55%) e *Bacillus* spp. (2,83%) (Tabela 2).

Dentre os *Staphylococcus* spp., os *Staphylococcus* coagulase negativos foram os microrganismos mais frequentemente isolados (65,09%) (Tabela 2). A elevada frequência de isolamentos de SCN reforça o papel deste grupo de bactérias como agente patogênico da mastite subclínica na espécie ovina. Dados similares foram encontrados por Ariznabarreta et al (2002), quando relataram que o gênero *Staphylococcus* foi isolado em 78,9% das culturas positivas, com *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) representando 74,8% dos isolados. Gonzalez et al. (1995) também observaram alta frequência de *Staphylococcus* spp. (73,9%), especialmente SCN,

representando 65% do gênero e valores ainda superiores, foram detectados por Bor et al. (1989) quando encontraram como bactérias mais comumente isoladas os SCN, com 93% dos isolados. Contreras et al. (2007) corrobora estes dados quando cita que os *Staphylococcus* spp. são os microrganismos causais da infecção intramamária em pequenos ruminantes mais freqüentemente diagnosticados.

Corroborando este estudo, outros pesquisadores isolaram em maior freqüência o gênero *Staphylococcus* spp. de glândulas mamárias de ovelhas clinicamente sadias, sendo o *Staphylococcus* coagulase negativo o mais representativo deste gênero (GONZALEZ et al., 1995; MAVROGENIS et al., 1995; LAFI et al., 1998; LANGONI, 1999; ARIZNABARRETA et al., 2002; BATAVANI, 2003, COUTINHO, 2006; HARTMAN et al., 2007). Fthenakis et al. (2004) encontraram o SCN em 94% das amostras analisadas em ovelhas com mastite subclínica na Grécia.

Estes microrganismos são considerados não patogênicos ou de baixa patogenicidade para glândula mamária de ruminantes, entretanto alguns SCN podem causar mastite clínica como um patógeno maior (FTHENAKIS & JONES, 1990; ARIZNABARRETA et al., 2002; OLIVEIRA, 2006), conforme relatado por Oliveira (2007) estudando os casos de mastite clínica na mesma região deste trabalho. Fthenakis & Jones (1990) estudando o efeito do SCN na glândula mamária ovina, provaram claramente que estas bactérias são patogênicas para a glândula, observando evidente variação na patogenicidade dos diferentes isolados. Os dados de Gutierrez et al. (1990) demonstraram a importância das cepas SCN como causa de mastite clínica ovina, quando detectaram esta bactéria em leite de ovelhas. Fthenakis (1988) relatou que os *Staphylococcus* coagulase negativo estão presente em 24,5% da cisterna do teto de glândulas sadias (sem parênquima infectado); podendo ser transferido da pele para a glândula mamária no ato de sucção do cordeiro, considerados como possíveis sítios de origem.

Os *Staphylococcus* coagulase positivos representaram 15,09% dos isolados bacterianos. Destacando-se maior freqüência do *S. aureus* (13,21%), seguido de *S. hyicus* (1,88%). O *S. hyicus* é um agente de virulência questionável e frequentemente isolado de casos de mastite em vacas (GOMES, 2007). A mastite por *S. aureus* é comumente associada à infecção da glândula tendo seu efeito patogênico atribuído à produção de enzimas e toxinas características dos *Staphylococcus* coagulase positivo (Pyörälä, 1995).

Resultados distintos foram relatados por Oliveira (2006) trabalhando com ovelhas Santa Inês com mastite subclínica, onde verificaram 28,9% de isolamento de *Staphylococcus aureus* e apenas 15,6% de *Staphylococcus* coagulase negativo.

O isolamento de *S. aureus* merece atenção especial por este agente ser responsável por casos clínicos e subclínicos, como constatado neste estudo (BERGONIER & BERTHELOT, 2003; CONTRERAS et al., 2007; ALMEIDA et al., 2007b; OLIVEIRA, 2007). Esta bactéria tem sido descrita dentre os mais importantes agentes etiológicos de infecção intramamária na espécie ovina e se caracteriza por colonizar o canal do teto sadio, podendo invadir a glândula mamária, e burlar as defesas celulares (COUTINHO et al., 2006; SIMÃO, 2004; CONTRERAS et al., 2007; GONÇALVES, 2006). Em investigação clínico-epidemiológica e bacteriológica da mastite em ovelhas Santa Inês, realizada na mesma região deste estudo, Oliveira (2007) verificaram um alto percentual de isolamento de *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativo como agentes causadores de mastite clínica, com alterações locais e sistêmicas, ratificando a preocupação do isolamento destes agentes de casos subclínicos.

O *S. aureus* se destaca na prevalência das mastites clínica e subclínica, o que pode ser explicado pela colonização da pele e canal do teto por este microrganismo, sendo parte da microbiota do teto, aumentando a probabilidade de infecção intramamária (DAVIDSON, 1961; QUINN et al, 2005). As infecções intramamárias podem se tornar crônicas ou subclínicas, uma vez que o *S. aureus* resiste à fagocitose, a partir de fatores antifagocitários, podendo ocorrer sua permanência no interior da célula, o que dificulta sua eliminação (QUINN et al, 2005).

Com relação ao isolamento de *Streptococcus* spp. foi encontrado um percentual de 7,55% sendo o agente mais isolado depois dos *Staphylococcus* spp. (Tabela 2); outros trabalhos também verificaram a presença deste microrganismo em ovelhas com mastite subclínica, apresentando percentuais variáveis de 4%, 9,8%, 12%, e 16,2%, relatados respectivamente por Batavani et al. (2003), Hernandez et al. (2007), Coutinho et al. (2006) e Gonzalez et al. (1995). Similar a este estudo, Hartman et al. (2007) verificaram a importância do *Streptococcus* spp. como agente causal das infecções intramamárias em ovinos, sendo detectado como segundo gênero de bactéria mais encontrado nas amostras de leite de ovelhas da raça Bergamácia

O pequeno percentual de frequência de isolamento de *Bacillus* spp. (2,83%) observado neste estudo (Tabela 2), vai de encontro aos trabalhos realizados por Hernandez et al. (2007) em propriedades da região de São Paulo, onde detectaram, 5,7% das amostras analisadas com



crescimento de *Bacillus* spp., Hartman et al. (2007) observaram isolamento de 16,22% e aos de Batavani et al. (2003) que relataram uma frequência muito superior, de 33%.

As bactérias Gram negativas fermentadoras (*Citrobacter freundii*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*) e não fermentadoras (*Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Stenotrophomonas maltophilia*) foram isoladas em 9,43% dos crescimentos bacterianos (Tabela 2).

Neste estudo, as enterobactérias representaram 4,7% do total de bactérias isoladas (Tabela 2). Resultados inferiores foram relatados por Domingues et al. (2006) ao evidenciarem um percentual de 3,8% de *Proteus* sp. e Hartman et al. (2007) um percentual de 2,7% de *Serratia* spp., únicas bactérias isoladas representantes da família Enterobacteriaceae. Já Langoni et al. (1999) pesquisando a microbiota bacteriana do leite de ovelhas encontraram um percentual muito baixo de 0,95% destas bactérias. Alguns autores citaram a presença desses agentes nas amostras de leite de ovelhas, muito embora sejam espécies pouco freqüente em glândulas sadias sendo incriminadas em processos de mastite clínica em ovelhas (OLIVEIRA, 2007). Hokanen-Buzalski & Seuna (1995), relataram o *Citrobacter freundii* como agente de mastite clínica em vacas, embora sendo considerado raro.

A presença de enterobactérias no leite de ovelhas com mastite subclínica chama a atenção para a possibilidade destas desencadarem um quadro clínico de mastite, tendo em vista os fatores de virulência inerentes à estes agentes, aliado a uma condição de estresse do animal (SANDHOLM & PYÖRÄLÄ, 1995).

Divergindo deste estudo, Albenzio et al. (2002) citaram a *E. coli* como sendo o agente mais freqüente da mastite subclínica ovina, atribuindo este fato ao estresse que os animais eram submetidos e às precárias condições de higiene do rebanho estudado

Neste estudo observou-se isolamento de *Burkholderia cepacia* em duas amostras de leite (1,88%) (Tabela 2). Berriatua et al. (2001) relataram a importância deste microrganismo como agente etiológico da mastite em ovelhas, quando descreveram um surto de mastite subclínica por infecção natural em um rebanho ovino leiteiro, onde isolou-se a bactéria em 66,7% das amostras positivas ao CMT.

O isolamento de *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri* e *Stenotrophomonas maltophilia* representou um percentual de 0,94%, cada uma, do total de isolados (Tabela 2). Não

foi encontrado na literatura trabalhos relatando o isolamento destas espécies de *Pseudomonas* em leite de ovelhas. Por outro lado alguns autores relataram a presença de baixos percentuais de isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* em suas investigações, sendo considerada por eles como causa de infecção intramamária clínica e subclínica (GONZALEZ–RODRIGUEZ et al., 1995; MCLENNAN et al 1997; LAFI et al., 1998; LAS HERAS et al 1999). MENZIES & RAMANOON (2001) relataram que *Pseudomonas* spp. tem ocorrência implicada em surtos de mastite aguda em ovelhas e cabras leiteiras em lactação. Las Heras et al. (1999) corroboraram este relato quando descreveram prevalência de 19% de *Pseudomonas aeruginosa* em um surto de mastite aguda em ovelhas leiteiras criadas em manejo intensivo, atribuindo como provável fonte de infecção a água utilizada na limpeza dos equipamentos. As espécies de *Pseudomonas* são microrganismos ambientais e podem causar infecções oportunistas, podendo ser isoladas de espécimes clínicos, conforme observado deste estudo (MANTERE-ALHONEN, 1995; QUINN et al., 2005).

Culturas bacterianas mistas foram observadas em seis amostras de leite (5,66%) e todas com a presença de *Staphylococcus* coagulase negativo, sendo a maior associação desta bactéria com as bactérias do gênero *Streptococcus* spp. (Tabela 3). Associações bacterianas também foram relatadas por Bor et al. (1989), Gonzalez et al. (1995) e Hernandez et al. (2007), com percentuais de 1%, 27% e 30,5%, respectivamente.

**Tabela 3** – Perfis de associação bacteriana identificados em 6 amostras de leite de ovelhas da raça Santa Inês.

Microrganismos	Isolamento	
	n	(%)
SCN + <i>Streptococcus</i> spp.	3	2,83
SCN + SCN	1	0,94
SCN + <i>S. aureus</i>	1	0,94
SCN + <i>Burkolderia cepacia</i>	1	0,94
Total	6	5,66

### 5.2.1- Perfil de Susceptibilidade frente a antimicrobianos *in vitro*

Os resultados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos das 69 amostras de *Staphylococcus* coagulase negativo revelaram de maneira geral que os isolados apresentaram percentual de sensibilidade elevado frente às drogas empregadas (Tabela 4). Embora tenha sido

observado diferentes percentuais de amostras intermediárias à eritromicina (17,39%), estreptomicina (15,94%), kanamicina (2,89%) e neomicina, oxacilina e sulfazotrin (1,45%).

Ao compararmos o perfil de sensibilidade dos isolados de SCN deste estudo aos de Coutinho et al. (2006) também trabalhando com ovelhas Santa Inês no Estado da Bahia, verificamos menor sensibilidade das amostras, onde 47,7% foram sensíveis a neomicina, 52,6% a ampicilina, 57,9% a penicilina G, 63,2% à enrofloxacina, 68,4% ao sulfazotrim, 78,9% à gentamicina, 89,5% a oxacilina e tetraciclina. Silva et al. (2004) trabalhando com caprino em estudo com isolados de leite, também verificaram menor susceptibilidade das espécies de SCN frente à penicilina G (40,0%) e a oxacilina (77,5%), quando comparados a este estudo.

**Tabela 4** - Susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* coagulase positivo, coagulase-negativo e *Streptococcus* spp. isolados de leite de ovelhas da raça Santa Inês.

Antimicrobianos	S-CP			S-CN			<i>Streptococcus</i> spp.		
	S(%)	I(%)	R(%)	S(%)	I(%)	R(%)	S(%)	I(%)	R(%)
AMP (10 µg)	87,5	0	12,5	86,95	0	13,04	100	0	0
CEP (30 µg)	100	0	0	99,55	1,45	0	100	0	0
FOX (30 µg)	100	0	0	99,55	0	1,45	80	0	20
ERY (15 µg)	100	0	0	81,15	17,39	1,45	60	20	20
STR (10 µg)	62,5	37,5	0	75,36	15,94	8,69	40	0	60
FLF (30 µg)	100	0	0	100	0	0	100	0	0
GEN (10 µg)	100	0	0	99,55	0	1,45	20	60	20
KAN (30 µg)	100	0	0	95,65	2,89	1,45	20	20	60
NEO (30 µg)	100	0	0	95,65	1,45	2,89	60	20	20
OXA (1µg)	100	0	0	91,30	1,45	7,24	80	20	0
PEN (10 UI)	87,5	0	12,5	84,05	0	25,95	80	20	0
PNM (40 µg)	100	0	0	100	0	0	100	0	0
SXT (25 µg)	100	0	0	97,10	1,45	1,45	80	20	0
TCY (30 µg)	87,5	0	12,5	94,20	0	5,79	60	0	40

O perfil de sensibilidade antimicrobiana revelou que as cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva foram 100% sensíveis às drogas testadas, excluindo-se a ampicilina, a penicilina G e a tetraciclina com um pequeno percentual de resistência de 12,5% (Tabela 4). Observou-se que dos isolados testados, 37,5% demonstraram condição intermediária de sensibilidade antimicrobiana à estreptomicina.

Resultados semelhantes foram também descritos por Fernández Riera et al. (2000) que observaram um alto percentual de sensibilidade antimicrobiana das cepas de *S. aureus* isolados de mastite clínica e subclínica ovina.

Em pesquisa de sensibilidade antimicrobiana de amostras de *S. aureus* isoladas de glândulas mamárias de bovinos e ovinos, Pengov & Ceru (2003) observaram menor sensibilidade antimicrobiana frente a penicilina G e a ampicilina, quando comparado a este estudo, verificando que os isolados de ovinos expressaram uma alta taxa de sensibilidade em relação às cepas bovinas.

Resultados distintos foram relatados por Coutinho et al. (2006) ao encontrarem amostras *S. aureus* resistentes a enrofloxacin, penicilina G e tetraciclina.

A alta sensibilidade antimicrobiana das cepas de *Staphylococcus* spp. evidenciada nos isolados de leite neste trabalho pode ser justificada pela pouca utilização destas drogas no momento de secagem da ovelha, sendo mais amplamente utilizados no tratamento das mastites clínicas.

Os *Streptococcus* spp. isolados das amostras de leite estudadas foram 100% sensíveis a amoxicilina, ampicilina, cefalotina, florfenicol e penicilina/novobiocina, apresentando maior resistência à kanamicina e estreptomicina (60,0%) e a tetraciclina (40,0%) (Tabela 4).

Resultados semelhantes foram evidenciados neste trabalho aos observados por Domingues et al., (2006) quanto à susceptibilidade ao florfenicol sendo considerada pelo autor como uma das drogas de melhor eficácia *in vitro* para as amostras de leite analisadas. Já com relação a tetraciclina Coutinho et al. (2006) evidenciaram a tetraciclina como droga 100% eficiente para as cepas testadas, divergindo deste estudo.

As bactérias Gram-negativas fermentadoras (4) isoladas do leite de ovelhas e testadas frente aos antimicrobianos utilizados foram 100% sensíveis *in vitro* apenas à cefoxitina. As demais drogas demonstraram percentuais variados de sensibilidade bacteriana apresentando um maior grau de resistência a estreptomicina, tetraciclina e neomicina (Tabela 5). Ao compararmos estes resultados aos de Langoni et al. (1999) verifica-se uma similaridade nos percentuais de sensibilidade frente a gentamicina, no entanto estes autores evidenciaram maior resistência dos isolados frente a neomicina, cefalotina e ampicilina.

Neste estudo não foram observadas cepas multirresistentes dentre as bactérias pertencentes a família Enterobacteriaceae, o que vem sendo relatado por outros autores ao

trabalharem com vacas leiteiras (RIBEIRO et al., 1999; RIBEIRO et al., 2006), provavelmente em decorrência ainda do pouco uso de antimicrobianos como medida preventiva da mastite em ovelhas.

**Tabela 5** - Susceptibilidade antimicrobiana das bactérias Gram-negativas isoladas de leite de ovelhas da raça Santa Inês.

Antimicrobianos	Gram-negativo					
	fermentadoras (n=4)			não fermentadoras (n=5)		
	S(%)	I(%)	R(%)	S(%)	I(%)	R(%)
AMP (10 µg)	75	25	0	80	0	20
CEP (30 µg)	75	0	25	80	0	20
FOX (30 µg)	100	0	0	40	0	60
ENR (5 µg)	75	0	25	60	0	40
STR (10 µg)	0	50	50	20	20	60
FLF (30 µg)	75	0	25	80	20	0
GEN (10 µg)	75	0	25	60	0	40
KAN (30 µg)	75	0	25	40	40	20
NEO (30 µg)	50	25	25	60	0	40
SXT (25 µg)	75	0	25	100	0	0
TCY (30 µg)	50	0	50	80	0	20

As bactérias não fermentadoras (5) quando testadas frente aos antimicrobianos mostraram-se 100% sensíveis somente ao sulfazotrim. Dentre os agentes isolados neste estudo, foram os que apresentaram um maior percentual de amostras revelando maior grau de resistência, principalmente frente a cefoxitina, estreptomicina, enrofloxacina e gentamicina.

Estes resultados foram distintos dos encontrados por Las Heras et al. (1999), que trabalhando com *P. aeruginosa* isolada de leite de ovelhas verificaram resistência frente a amoxicilina, tetraciclina e ao sulfazotrim.

Os resultados obtidos especialmente em relação aos diferentes graus de susceptibilidade intermediária nas cepas analisadas, refletem a importância de um contínuo monitoramento, com a finalidade de detectar mudanças nos padrões de susceptibilidade aos antimicrobianos.

### 5.3- Relação entre o isolamento bacteriano e o *California Mastitis Test* (CMT)

Das 244 amostras de leite analisadas, obteve-se isolamento bacteriano em 100 (40,98%). O cultivo em associação foi evidenciado em seis amostras, totalizando 106 isolados distribuídos nos diferentes graus de reação do CMT (Tabela 6).

**Tabela 6** - Distribuição dos microrganismos isolados nas amostras de leite de ovelhas da raça Santa Inês agrupados de acordo com a reação do CMT.

Microrganismos	Reação do CMT				Total
	Negativo	1+	2+	3+	
SCN	34	7	15	13	69
<i>S. aureus</i>	7	1	2	4	14
<i>S. hyicus</i>	0	0	0	2	2
<i>Streptococcus</i> spp.	2	2	2	2	8
<i>Bacillus</i> spp.	1	1	1	0	3
<i>Citrobacter freundii</i>	0	1	0	0	1
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	0	0	0	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0	0	1	2
<i>Escherichia coli</i>	0	0	1	0	1
<i>Burkholderia cepacia</i>	0	0	0	2	2
<i>Pseudomonas putida</i>	1	0	0	0	1
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0	0	0	1	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	0	0	0	1
Total	48	12	21	25	106

Das amostras com resultados positivos ao CMT (1+, 2+,3+) (n=72), observou-se crescimento em 53 (73,61%), enquanto nas negativas (n=172) verificou-se 47 (27,32%) amostras bacteriologicamente positivas, como pode ser observado na Tabela 7.

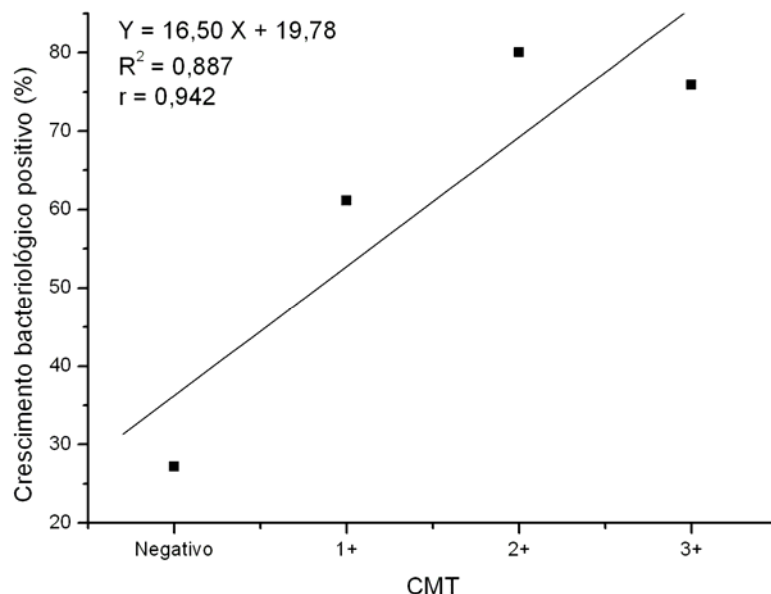
**Tabela 7** - Frequência absoluta e relativa do isolamento bacteriano nas diferentes reações do *California Mastitis Test* obtidos das amostras de leite de ovelhas da raça Santa Inês.

CMT	Isolamento Bacteriano	
	Frequência absoluta (n)	Frequência relativa (%)
Negativo (n=172)	47	27,32
1+ (n=18)	11	61,11
2+ (n=25)	20	80,00
3+ (n=29)	22	75,86

Foi observado crescimento bacteriano em 47 amostras (27,32%) das 172 negativas ao CMT. Provavelmente, a razão do isolamento bacteriano em amostras negativas ao CMT neste estudo esteja relacionada a presença destas bactérias na cisterna do teto das glândulas sadias, podendo considerar como possíveis sítios de origem, conforme relatado por Fthenakis (1988), funcionando estes animais como portadores assintomáticos (BISPO et al., 2007). Outra possibilidade foi descrita por Albenzio et al. (2002), quando afirmaram que o isolamento pode não ser acompanhado por um aumento no conteúdo celular, pois em muitos casos o processo infeccioso progride lentamente sem expressar um estágio agudo ou tem uma fase aguda de curta duração, não sendo detectado indiretamente no CMT. Várias espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativo são comumente encontradas nos canais do teto e sobre a pele do teto de ruminantes domésticos e podem ser introduzidas para a glândula mamária no ato de sucção do cordeiro, sem contudo existir infecção do parênquima mamário (BURRIEL, 1998, FTHENAKIS, 1988; BATAVANI et al., 2003).

À medida que a reação de CMT se intensificou, elevou-se o percentual de isolamento bacteriano, observando-se que 73,23% das amostras CMT positivas foram também positivas no cultivo bacteriológico, verificando-se concordância entre os resultados do CMT e cultivo bacteriológico. Foi verificada forte associação entre a prova do CMT e o resultado bacteriológico, indicando dependência significativa ( $P < 0,05$ ) entre as variáveis, com forte grau de associação, caracterizando a tendência linear crescente entre o resultado da prova do CMT e o crescimento bacteriológico, indicando maior probabilidade de isolamento bacteriano à medida que intensifica a reação do CMT (Figura 4).

Resultados semelhantes foram descritos por McDougall (2001) em que o isolamento bacteriano foi associado ao aumento da intensidade do CMT em ovelhas de leite. Batavani et al. (2003), trabalhando com ovelhas de diferentes rebanhos leiteiros verificaram um percentual de 54,72% de concordância dos resultados do crescimento bacteriano e CMT.



**Figura 4** - Demonstração linear da associação positiva da intensidade do CMT e do isolamento bacteriano.

Das 72 amostras positivas na prova do CMT não foi observado crescimento bacteriano em 19 delas (26,39%).

A ausência de crescimento bacteriano verificado nas amostras reagentes ao CMT pode ser justificada pela eliminação intermitente dos agentes bacterianos (BURRIEL, 1997; ALBENZIO et al., 2002; HARTMAN et al., 2007); pelo não isolamento nos meios de cultura convencionais de microrganismos mais exigentes, como por exemplo os fungos, leveduras, algas (DOMINGUES & LEITE, 2003), *Mycoplasma* spp (DUARTE, 1991; PUGH, 2005) e vírus, como o Maedi-visna reconhecidos por infectar pequenos ruminantes, mas raramente acarretar sinais clínicos (CUTLIP et al., 1985; CONTRERAS et al., 2007); pela participação de algumas enzimas ou proteínas do leite (lisozima, lactoferrina), que poderiam inibir a detecção dos patógenos e em alguns casos a infecção poderia ser provocada por toxinas bacterianas e por componentes bio-ativos liberados pelos neutrófilos, que permanecem durante a eliminação das bactérias invasoras (ALBENZIO et al., 2002) e pelo emprego prévio de antimicrobianos, que poderiam estar sendo utilizados no tratamento de outras enfermidades, inibindo o crescimento bacteriano (CONTRERAS et al., 1995).

Resultados semelhantes foram citados por Albenzio et al. (2002) trabalhando com rebanhos ovinos criados intensivamente onde relataram que a ocorrência da mastite subclínica



pode não estar acompanhada pelo isolamento do agente etiológico. Domingues et al (2006) realizando trabalho para determinar a ocorrência de mastite subclínica em ovelhas da raça Santa Inês afirmaram que 16% das amostras positivas ao CMT não tiveram crescimento bacteriano, percentual este um pouco inferior aos deste estudo. O aumento de amostras falso-positivas pode ser observado no final da lactação (GONZALEZ et al., 1996), no entanto neste estudo não foram empregados animais em fase final de lactação. Philpot & Nickerson (2002) relataram que aproximadamente 10% das amostras oriundas de casos clínicos ou de glândulas com contagens celulares altas apresentam cultura bacteriológica negativa.

Alguns autores relataram que a capacidade do CMT em prever a infecção intramamária em ovinos depende da prevalência e dos agentes presentes no rebanho (HUESTON et al. 1986; KEISLER et al., 1992).

Diante dos resultados obtidos verificou-se que as chances de detecção de glândulas infectadas são maiores quando amostras de leite com escore de CMT de 1+ ou superiores são diagnosticadas. Resultados semelhantes foram descritos por González-Rodríguez & Cármenes (1996) e Menziens & Ramanan, (2001), quando afirmaram que o CMT pode ser muito útil como um teste de triagem para identificação de ovelhas leiteiras com mastite subclínica, indicando maior probabilidade de infecção intramamária nas amostras de leite com resultados superiores a 1+ no CMT. Estes achados contrariam os relatos de Pugh et al. (2005) quando afirmaram que por apresentarem maior conteúdo celular que os bovinos, o CMT não é considerado seguro para pequenos ruminantes e por esse motivo, o resultado 1+ deve ser considerado normal, observação esta também relatada por Maisi et al. (1987), que sugerem maior probabilidade de detecção de glândulas infectadas resultados 2+ e 3+ no CMT e Clements et al. (2003) somente a partir de 3+.

#### 5.4- Frequência do isolamento bacteriano e suas respectivas contagens de células somáticas das amostras reagentes e não reagentes ao *California Mastitis Test*

Após análise dos dados verificou-se que 76,78% das amostras reagentes ao CMT apresentaram contagens superior a  $1 \times 10^6$  cels/mL, 16,07% contagens entre  $0,5 \times 10^6$  cels/mL e  $1 \times 10^6$  cels/mL e apenas 7,14% inferiores a  $0,5 \times 10^6$  cels/mL (Tabela 8).

**Tabela 8** – Frequência do isolamento bacteriano (%) nos diferentes intervalos de valores de contagem de células somáticas das amostras de leite de ovelhas Santa Inês reagentes ao CMT.

CCS (cels/mL)	SCN N(%)	SCP n(%)	Gram - n(%)	<i>Streptococcus</i> spp. n(%)	Total
0-500.000	2(5,71%)	0	1(16,66%)	1(16,66%)	4(7,14%)
500.000- 1.000.000	6(17,14%)	0	0	3(50%)	9(16,07%)
>1.000.000	27(77,14%)	9(100%)	5(83,33%)	2(33,33%)	43(76,78%)
<b>Total</b>	35(100%)	9(100%)	6(100%)	6(100%)	56(100%)

Observa-se que de maneira geral os agentes isolados induziram uma intensa resposta inflamatória representada por contagens superiores a 1 milhão de células/mL. Estes resultados induzem a recomendação da utilização do limite da CCS a partir de  $1 \times 10^6$  cels/mL como indicativo de glândulas mamárias infectadas em ovelhas Santa Inês.

Green (1984), Fthenakis (1994) e Stefanakis et al. (1995), também recomendaram a análise bacteriológica das amostras de leite com contagem de células somáticas superior a  $1 \times 10^6$  células/mL, indicativas de mastite subclínica (FTHENAKIS 1988; FTHENAKIS, 1991; WATKINS et al., 1991). Valores superiores de CCS como limite para detecção de mastite subclínica foram descritos por Clements et al. (2003) e Mavrogenis et al. (1995) quando sugeriram que contagem superior a  $1,2 \times 10^6$  céls/mL e  $1,5 \times 10^6$  células/mL, respectivamente, podem ser consideradas como limite para o diagnóstico da enfermidade na espécie ovina, recomendando inclusive sua utilização como medida para prevenção do aparecimento de mastite clínica.

O percentual de amostras com contagem entre 500.000 e 1.000.000 céls/mL (16,07%) e abaixo de 500.000 céls/mL (7,14%) (Tabela 8) podem ser justificadas nos casos de infecção precoce pelo SCN, conforme relatado em estudo experimental (FTHENAKIS, 1988); pela

presença do agente em possíveis sítios de origem como a cisterna do teto de glândulas sadias (sem parênquima infectado) (BURRIEL, 1998) e a ocorrência da infecção por patógenos menores, não induzindo resposta inflamatória intensa (WATSON & BUSWELL, 1984, MENZIENS & RAMANOON, 2001).

Ao analisarmos o percentual de isolamento dos SCN nas amostras reagentes ao CMT, observamos que 77,4% das amostras desencadearam contagem superior a  $1 \times 10^6$  céls/mL e apenas 5,71% contagens inferiores a 500.000 céls/mL (Tabela 8). A indução da intensa resposta inflamatória desencadeada pelo SCN, ratifica a importância patológica deste agente na mastite subclínica em ovelhas Santa Inês. Valores de células somáticas superiores a 1 milhão, acarretadas pela infecção subclínica por SCN, também foram relatadas por Fthenakis (1994), Pengov (2001) e Ariznabarreta et al. (2002) em pequenos ruminantes.

Todas as amostras de *S. aureus* reagentes ao CMT acarretaram contagem de células somáticas superior a  $1 \times 10^6$  céls/mL, conforme pode ser observado na tabela 8.

Estes resultados concordam com os achados de PERSON-WALLER et al. (1997), ARIZNABARRETA et al. (2002) e SUAREZ et al. (2002), que incriminam o *S. aureus* como responsável por acarretar intensa resposta inflamatória, com contagens bastante elevadas de células somáticas em leite de ovinos. Stefanakis et al. (1995) sugerem que contagens entre um e dois milhões como sugestivas de SCN e acima de dois milhões de *S. aureus*. Este agente é responsável por uma série de danos tissulares, por ação de seus potentes fatores de virulência, acarretando um afluxo de células, principalmente polimorfonucleares para a glândula mamária (Pyyrälä, 1995).

Ao analisarmos os isolados de *Streptococcus* spp., foi verificado que 66,67% destes acarretaram contagens inferiores a  $1 \times 10^6$  céls/ml (tabela 8). Estes valores são concordantes com os de Elias et al. (2005) que observaram diferentes espécies de *Streptococcus* acarretando resposta celular como as observadas neste estudo, o mesmo também verificado por Vianni (1997), trabalhando com búfalas, que relatou valores médios de 810.000 céls/ml. Resultados de CCS superiores a um milhão, conforme observado em duas amostras (33,33%) (Tabela 8), poderia estar relacionado a espécie bacteriana envolvida, tendo em vista que Elias et al. (2005) também relataram estes valores em leite com isolamento de cepas de *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. uberis*.

A grande maioria das bactérias Gram-negativas (83,33%) ocasionou contagem superior a  $1 \times 10^6$  células/mL (Tabela 8). O aumento do número de células somáticas foi observado por Gonzalez et al. (1995), que relata ter sido pouco frequente o isolamento destas bactérias, no entanto a resposta celular foi bastante intensa e severa. Vaz (2007) justifica como uma das causas deste aumento celular o fato do complemento (c5a) ser intensamente quimiotático para neutrófilos, sendo responsável pelo maior número de células presentes na infecção por enterobactérias, pois o c5a tem sua quantidade aumentada em torno de cinco vezes na presença de mastite subclínica.

Nas amostras de leite de ovelhas reagentes ao CMT, constatou-se que as chances de detecção de glândulas infectadas são maiores em resultados de CCS a partir de  $1 \times 10^6$  células/mL, limite este onde se concentrou o maior número de isolados bacterianos.

Quanto às amostras não reagentes ao CMT, pode-se observar que 89,36% tiveram valores de CSS inferior a 500.000 céls/mL independente do microrganismo isolado, com exceção de cinco amostras de SCN, em que foram observados valores entre 500.000 céls/mL e 1.000.000 céls/mL (Tabela 9).

Os valores de CCS baixos associado ao crescimento bacteriano poderia estar relacionado à presença do agente na cisterna do teto de glândulas mamárias sadias, assim como nos casos em que a evolução da doença aconteça lentamente, sem a manifestação de um estágio agudo (FTHENAKIS, 1988 e ALBENZIO et al., 2002).

**Tabela 9** - Frequência do isolamento bacteriano nos diferentes intervalos de valores de contagem de células somáticas das amostras de leite de ovelhas Santa Inês não reagentes ao CMT.

CCS (cels/mL)	SCN n(%)	SCP n(%)	Gram - n(%)	<i>Streptococcus</i> spp. n(%)	Total
0-500.000	29(85,29%)	7(100%)	4(100%)	2(100%)	42(89,36%)
500.000- 1.000.000	5(14,71%)	0	0	0	5(10,64%)
>1.000.000	0	0	0	0	0
Total	34(100%)	7(100%)	4(100%)	2(100%)	47(100%)

## 5.5- Alteração da composição físico-química do leite e infecção intramamária

### 5.5.1- Acidez Dornic

O valor médio da acidez do leite de ovelhas Santa Inês sadias foram de 20,61<sup>0</sup>D, situando-se dentro da faixa de normalidade para a espécie ovina (ASSENAT, 1991). Os valores médios, desta variável, dos animais sadios quando comparados aos infectados por SCN, SCP, *Streptococcus* spp. e bactérias Gram negativas, revelaram diminuição significativa, com exceção do *Streptococcus* spp. ( $P>0,05$ ), que não acarretou alteração neste componente. Os menores valores foram evidenciados nas amostras de leite infectadas com SCP (15,50<sup>0</sup>D).

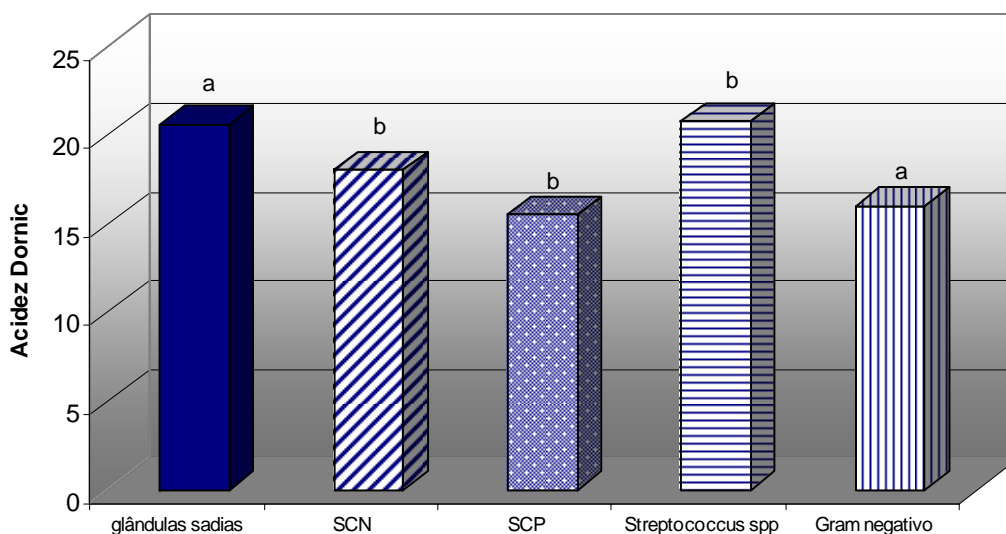
**Tabela 10** - Valores médios e desvios padrão da acidez Dornic (<sup>0</sup>D) do leite de ovelhas da raça Santa Inês oriundo de glândulas mamárias sadias, infectadas e infectadas por diferentes agentes bacterianos.

Glândula mamária/agente	Acidez ( <sup>0</sup> D)
Sadias	20,61 ± 3,87 a
Infectadas	17,75 ± 4,01 b
Infectada. SCN	18,06 ± 4,06 b
Infectada. SCP	15,50 ± 2,73 b
Infectada <i>Streptococcus</i> spp.	20,80 ± 5,81 a
Infectada Gram negativa	16,00 ± 1,22 b

As médias seguida da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente em relação ao grupo sadio ao nível de 5% de probabilidade no *Teste t*.

Resultados semelhantes foram observados por Vianni (1997) trabalhando com leite de búfalas, ao observar diminuição mais intensa nos valores desta variável em búfalas infectadas com *S. aureus*, quando comparadas às infectadas com cocos catalase negativo. No entanto Nicolau et al. (1996), trabalhando com leite de glândulas infectadas (SCP, SCN) e não infectadas não verificaram alterações significativas nesta variável na espécie bovina.

Estas alterações nos valores da acidez Dornic ocorrem como consequência da elevação de cloreto e sódio no leite, oriundos do sangue, pela alteração de permeabilidade capilar, existente no processo inflamatório.



**Figura 5** – Valores médios da acidez Dornic ( $^{\circ}$ D) do leite de glândulas mamárias sadias e infectadas por SCN, SCP, *Streptococcus* spp. e bactérias Gram negativas em ovelhas da raça Santa Inês.

#### 5.5.2- Teor de Cloretos

O leite proveniente das glândulas mamárias sadias revelaram valores médios de teor de cloretos de 72,47mEq/L, similares aos relatados por Nunes et al. (2007), trabalhando com ovelhas Santa Inês. Ao compararmos a glândula sadia frente às infectadas pelos diferentes agentes etiológicos observamos que os valores médios mais elevados do teor de cloretos no leite ( $p < 0,05$ ) foram evidenciados nas amostras em que se isolou SCP e bactérias Gram-negativas. As infecções das metades mamárias ocasionadas por *Streptococcus* spp. não alteraram estatisticamente o constituinte cloreto nesta investigação (Tabela 11) (Figura 6).

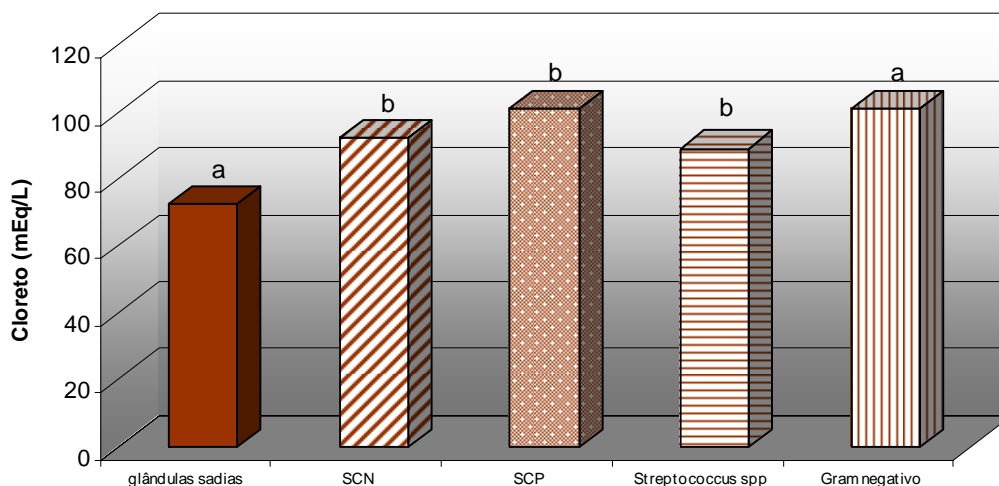
**Tabela 11** - Valores médios e desvios padrão do teor de cloreto (mEq/L) do leite de ovelhas da raça Santa Inês oriundo de glândulas mamárias sadias, infectadas e infectadas por diferentes agentes bacterianos.

Glândula mamária/agente	Cloreto (mEq/L)
Sadias	72,47 ± 17,22 a
Infectadas	95,08 ± 24,89 b
Infectada. SCN	92,49 ± 24,54 b
Infectada. SCP	100,78 ± 25,83 b
Infectada <i>Streptococcus</i> spp.	89,10 ± 29,64 a
Infectada Gram negativa	100,78 ± 29,00 b

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente em relação ao grupo sadio ao nível de 5% de probabilidade no *Teste t*.

Resultados semelhantes foram também relatados por Zafalon et al. (2005), que observaram maior alteração desta variável associada ao isolamento do SCP. NUNES et al. (2007) comparando glândulas mamárias sadias à infectadas na espécie ovina evidenciaram a influência da infecção intramamária na composição do leite ovino e detectaram valores estatisticamente mais altos ( $p < 0,05$ ) nos teores de cloreto das amostras de leite microbiologicamente positivas quando comparadas às negativas. Resultados semelhantes foram citados por Vianni (1997) na espécie bubalina, avaliando o cloreto qualitativamente.

O aumento da passagem de íons cloretos (CL-) para o leite de glândulas infectadas, ocorre como mecanismo de compensação no restabelecimento do equilíbrio osmótico do leite em relação ao sangue, uma vez que a lactose que desempenha papel importante neste equilíbrio geralmente encontra-se diminuída nos processos infecciosos da glândula mamária (FONSECA & SANTOS, 2001).



**Figura 6** - Valores médios do teor de cloretos (mEq/L) do leite de glândulas mamárias sadias e infectadas por SCN, SCP, *Streptococcus* spp. e bactérias Gram negativas em ovelhas da raça Santa Inês.

### 5.5.3- Densidade

O valor médio verificado para a densidade do leite de ovelhas sadias da raça Santa Inês foi de 1.037,32 (Tabela 12) (Figura 7), um pouco superior aos observados por Santos et al. (2007), trabalhando com infecção experimental da glândula mamária em ovelhas Santa Inês e similares aos de Brito (2003) em ovelhas da raça Lacaune.

**Tabela 12** - Valores médios e desvios padrão da densidade do leite de ovelhas da raça Santa Inês oriundo de glândulas mamárias sadias, infectadas e infectadas por diferentes agentes bacterianos.

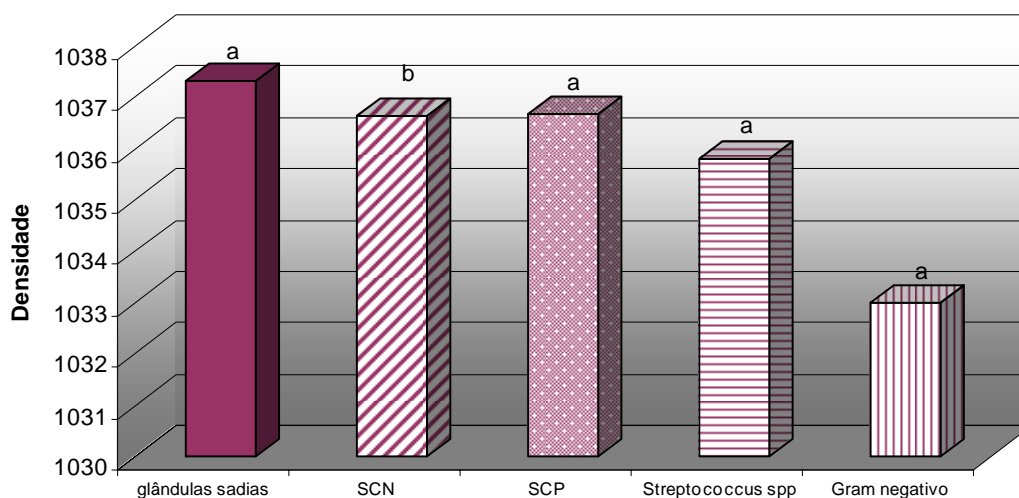
Glândula mamária/agente	Densidade
Sadias	1.037,32 ± 0,04 a
Infectadas	1.035,96 ± 0,04 b
Infectada. SCN	1.036,63 ± 0,04 a
Infectada. SCP	1.036,67± 0,04 a
Infectada <i>Streptococcus</i> spp.	1.035,80 ± 0,05 a
Infectada Gram negativa	1.032,50 ± 0,05 b

As médias seguida da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente em relação ao grupo sadio ao nível de 5% de probabilidade no *Teste t*.

Ao compararmos os resultados das glândulas sadias aos das infectadas pelos diferentes agentes etiológicos observados verificamos diferença significativa apenas na infecção por bactérias Gram-negativas, tendo em vista que apesar de ter ocorrido diminuição nos valores da densidade nas infecções acarretadas pelos os outros agentes isolados neste estudo, estas não foram significativas ( $P > 0,05$ ) (Tabela 12) (Figura 7). Para Schalm et al. (1971), a síntese do leite na infecção da glândula mamária diminui, conseqüentemente a quantidade dos principais componentes do leite decaem comprometendo desta forma a sua densidade.

Resultados semelhantes foram citados por Lima Júnior (1991), avaliando a densidade do leite de cabras, não verificando alterações entre glândulas sadias e infectadas por bactérias Gram-positivas, conforme também relatado por Nicolau et al. (1996) e Zafalon et al. (2005) em estudo da mastite subclínica com vacas de leite.





**Figura 7** - Valores médios da densidade do leite de glândulas mamárias sadias e infectadas por SCN, SCP, *Streptococcus* spp. e bactérias Gram negativas em ovelhas da raça Santa Inês

#### 5.5.4- Gordura

O percentual de gordura encontrado neste estudo para o leite de ovelhas sadias foi de 3,40% (Tabela 13), estando abaixo dos relatados por BRITO (2004). Esta variabilidade nos percentuais poderia ser atribuída a dieta fornecida aos animais, conforme citado por Peres (2001). Ribeiro et al. (2007) relata que em pequenos ruminantes aproximadamente 75% da gordura secretada permanece na fração alveolar principalmente em animais sem hábito de ordenha a exemplo dos animais com aptidão para corte.

**Tabela 13** - Valores médios e desvios padrão da Gordura (%) do leite de ovelhas da raça Santa Inês oriundo de glândulas mamárias sadias, infectadas e infectadas por diferentes agentes bacterianos.

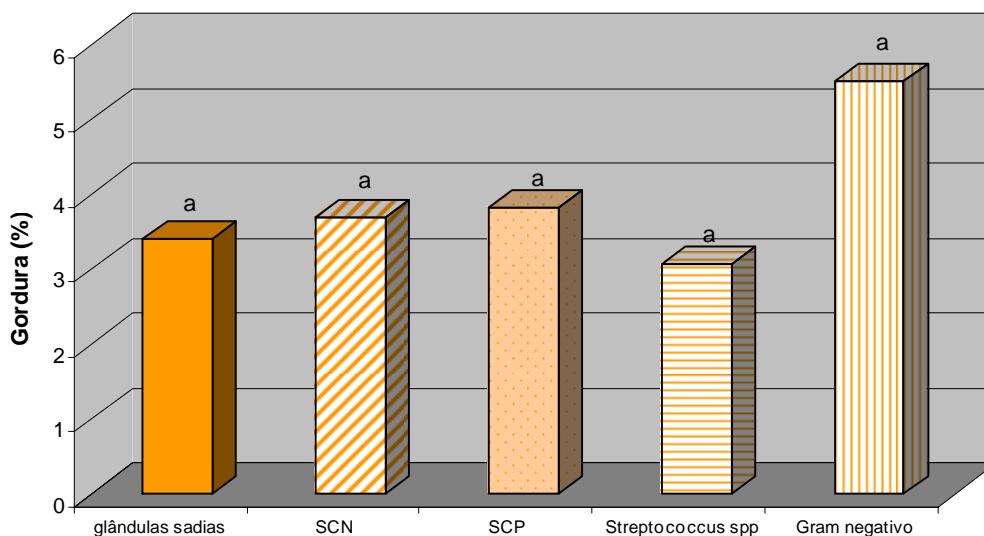
Glândula mamária/agente	Gordura (%)
Sadias	3,40 ± 2,26 a
Infectadas	3,99 ± 2,37 a
Infectada. SCN	3,69 ± 2,07 a
Infectada. SCP	3,82 ± 2,19 a
Infectada <i>Streptococcus</i> spp.	3,06 ± 2,50 a
Infectada Gram negativa	5,50 ± 2,81 b

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente em relação ao grupo sadio ao nível de 5% de probabilidade no Teste *t*.

Ao observarmos os valores do percentual de gordura do leite das glândulas sadias e infectadas pelos diferentes agentes isolados, verificamos não haver diferença significativa ( $P>0,05$ ), com exceção das Gram-negativas ( $P<0,05$ ) (Tabela 13) (Figura 8).

Kitchen (1981) relata que a maior parte das mudanças, que ocorrem no teor da gordura no leite como resultado da mastite são relativamente mínima e em muitos casos não acontece até que a infecção se torne severa.

Um pequeno aumento do percentual de gordura foi relatado por Winter et al. (2003) em infecção experimental da glândula mamária com SCN. Alterações no percentual de gordura não foram observadas por diferentes autores, que estudaram a influência da infecção intramamária sobre este componente do leite em ovinos, caprinos, bovinos e bubalinos (DUARTE, 1991; DELLA CRUZ et al., 1994; NICOLAU et al., 1996; VIANNI, 1997; NUNES et al., 2007).



**Figura 8** - Valores médios do percentual de gordura (%) do leite de glândulas mamárias sadias e infectadas por SCN, SCP, *Streptococcus* spp. e bactérias Gram negativas em ovelhas da raça Santa Inês.

### 5.5.5- pH

Os valores encontrados para o pH do leite de glândula mamárias sadias de ovelhas Santa Inês foi de 6,72, semelhantes aos relatados por Santos et al. (2007) (Tabela 14) (Figura 9). A elevação nos valores do pH ( $P<0,05$ ) observado neste estudo foi significativa ( $P<0,05$ ) na

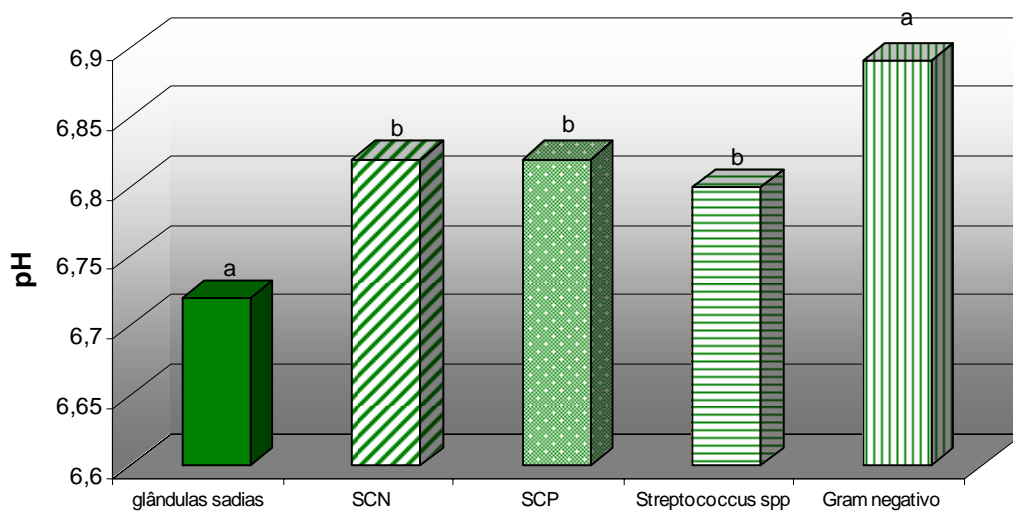
infecção causada pelos diferentes microrganismos isolados, exceto pelo *Streptococcus* spp., único agente em que não foi detectada diferença estatística ( $P>0,05$ ) (Tabela 13) (Figura 9). A elevação do pH no leite ocorre devido à alteração na permeabilidade capilar, provocada pela intensa reação inflamatória, como consequência há passagem de certos íons como o cloreto de sódio e o bicarbonato de sódio, acarretando elevação nos valores do pH (SCHALM, 1977; SCHULTZ, 1977).

Muitos trabalhos em diferentes espécies de ruminantes relataram aumento do pH no leite de animais com infecção intramamária (DUARTE, 1991; NICOLAU et al., 1996; NUNES et al., 2007). A elevação, apesar de não significativa, dos valores de pH do leite das glândulas infectadas com *Streptococcus* spp neste estudo., também foi relatada por Vianni (1997), que verificou menor intensidade de variação do pH em amostras de leite de búfalas infectadas com cocos catalase negativos, quando comparadas a infecção pelo *S. aureus*.

**Tabela 14** - Valores médios e desvios padrão do pH do leite de ovelhas da raça Santa Inês oriundo de glândulas mamárias sadias, infectadas e infectadas por diferentes agentes bacterianos.

Glândula mamária/agente	pH
Sadias	6,72 ± 0,19 a
Infectadas	6,82 ± 0,16 b
Infectada. SCN	6,82 ± 0,15 b
Infectada. SCP	6,82 ± 0,15 b
Infectada <i>Streptococcus</i> spp.	6,80 ± 0,21 a
Infectada Gram negativa	6,89 ± 0,11 b

As médias seguida da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente em relação ao grupo sadio ao nível de 5% de probabilidade no *Teste t*.



**Figura 9** - Valores médios do pH do leite de glândulas mamárias sadias e infectadas por SCN, SCP, *Streptococcus* spp. e bactérias Gram negativas em ovelhas da raça Santa Inês.

Neste estudo a infecção intramamária por bactérias do gênero Gram negativo acarretou alterações ( $p < 0,05$ ) em todos os constituintes físico-químicos avaliados. Os maiores valores médios de teor de cloreto, gordura e pH observados neste estudo foram detectados nas amostras de leite de glândulas infectadas por estas bactérias, assim como os menores valores médios de densidade.

### 5.6- Alteração da composição físico-química do leite e o *California Mastitis Test*

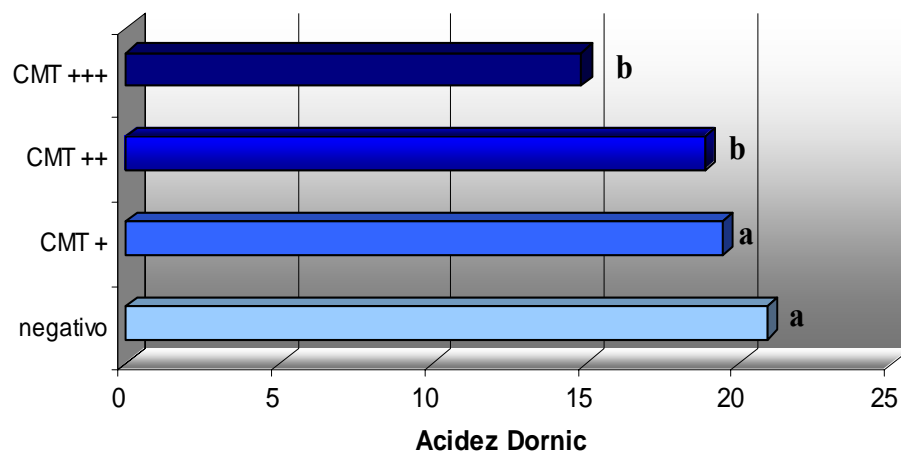
Ao compararmos os resultados do CMT das amostras de leite não reagentes e reagentes nesta prova em suas diferentes intensidades (1+, 2+, 3+), verificou-se que a partir de um resultado CMT 2+ pode-se verificar diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) nos valores da acidez Dornic assim como aumento significativo ( $P < 0,05$ ) nos valores médios do teor de cloretos (Tabela 15) (Figura 10 e 11). Estes achados podem ser justificados pelo aumento de permeabilidade capilar acarretada nos processos inflamatórios da glândula mamária, o que permite a passagem de componentes do sangue (sódio e cloretos) para o leite, como mecanismo de compensação no restabelecimento do equilíbrio osmótico do leite em relação ao sangue

(SCHALM, 1977). Os valores médios de acidez Dornic e teor de cloretos observados nas amostras de leite de ovelhas não reagentes ao CMT foram de 20,88<sup>o</sup>D e 73,95mEq/L, respectivamente, situando-se dentro da normalidade para esta espécie (ASSENAT, 1991; NUNES et al., 2007)

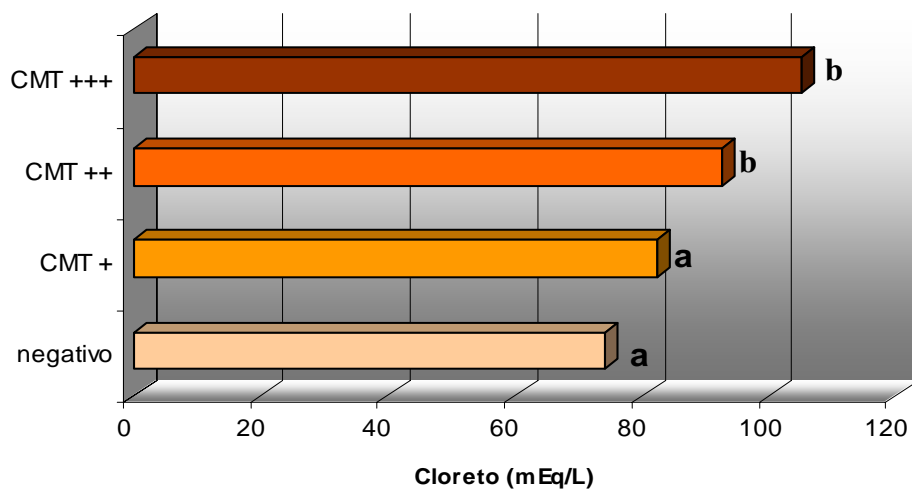
**Tabela 15** - Valores médios e desvio padrão ( $\bar{x} \pm s$ ) dos componentes físico-químicos (acidez, cloreto, densidade, gordura e pH) do leite de ovelhas da raça Santa Inês nos diferentes resultados do CMT.

CMT	Componentes físico-químicos				
	Acidez Dornic ( <sup>o</sup> D)	Cloreto (mEq/L)	Densidade	Gordura (%)	pH
Negativo	20,88 (3,66) a	73,95 (18,91) a	1037,45 (3,56) a	3,41 (2,31) a	6,72 (0,18) a
1+	19,46 (4,41) a	82,42 (23,41) a	1037,46 (3,55) a	3,43 (2,37) a	6,74 (0,14) a
2+	18,87 (3,82) b	92,67 (22,34) b	1036,73 (4,38) a	3,91 (2,48) a	6,79 (0,19) a
3+	14,86 (4,35) b	105,12 (23,78)b	1033,96 (4,14) b	3,66 (2,30) a	6,92 (0,13) b

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente em relação ao grupo sadio ao nível de 5% de probabilidade no Teste t .



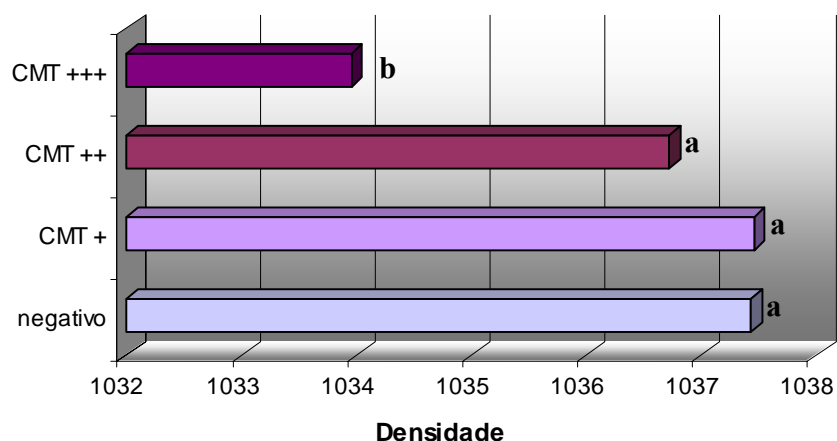
**Figura 10** – Valores médios da Acidez Dornic ( $^{\circ}$ D) do leite de ovelhas da raça Santa Inês nas diferentes reações do CMT.



**Figura 11** – Valores médios do teor de cloretos (mEq/L) do leite de ovelhas da raça Santa Inês nas diferentes reações do CMT.

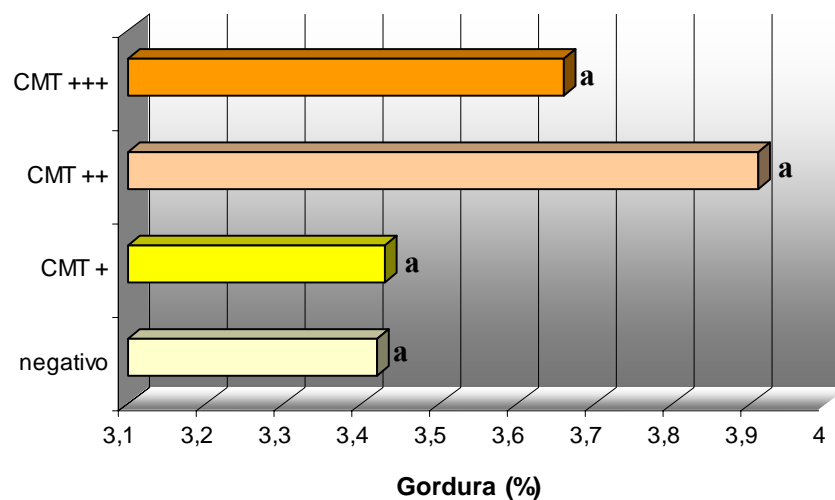
Os valores médios da densidade do leite observados nas amostras não reagentes ao CMT em ovelhas Santa Inês neste estudo, estão de acordo com Souza et al. (2005), que avaliou a

composição do leite de ovelhas da raça Corriedale. O teste de comparação dos valores médios da densidade do leite CMT negativo ao CMT positivo revelou diferenças entre as médias desta variável (Tabela 15) (Figura 12). Sendo observado que estes valores foram significativamente menores ( $p < 0,05$ ) apenas nas amostras CMT 3+. Na mastite, ocorre diminuição na síntese do leite, como conseqüência da instalação do processo inflamatório, acarretando decréscimo dos principais componentes do leite, comprometendo desta forma a densidade (SCHALM et al., 1971; KORHONEN & KAARTNEN, 1995).



**Figura 12** - Valores médios da densidade do leite de ovelhas da raça Santa Inês nas diferentes reações do CMT.

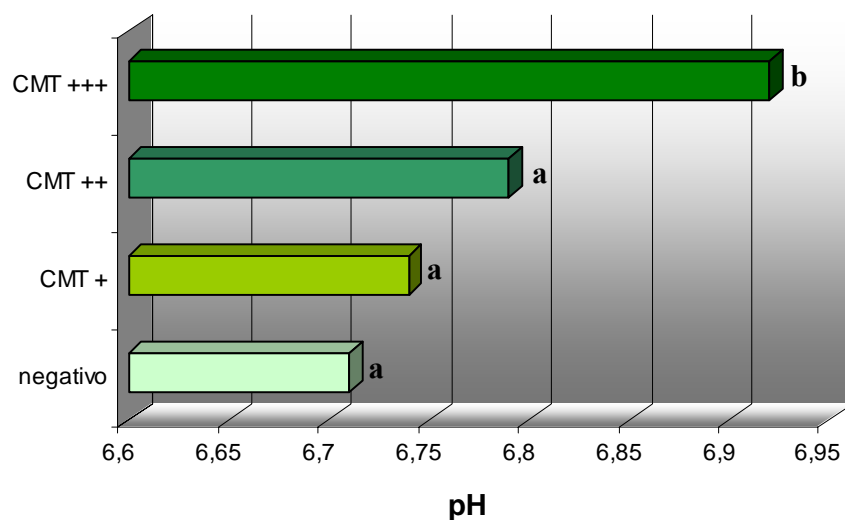
Os valores médios do percentual de gordura do leite observados nas amostras não reagentes ao CMT em ovelhas Santa Inês, estão de acordo com Oliveira (2006), para leite de ovelhas da mesma raça. Os resultados verificados para esta variável evidenciaram que não ocorreram diferenças significativas quando realizado o teste de comparação entre as amostras negativas ou positivas ao CMT (Tabela 15) (Figura 13). Para Kitchen (1981) as alterações da gordura são mínimas nos processos inflamatórios, podendo estar alterada nos processos mais graves.



**Figura 13** - Valores médios do percentual de gordura (%) do leite de ovelhas da raça Santa Inês nas diferentes reações do CMT.

Os valores de pH do leite, obtido das amostras negativas ao CMT, estão situados dentro da normalidade quando comparados com o pH médio evidenciado por Brito (2003) e Brito (2006) em leite de ovelhas leiteiras. Foi observada elevação gradativa nos valores médios do pH nas amostras de leite que reagiram no CMT1+, no entanto esta elevação ocorreu de forma significativa ( $P < 0,05$ ) somente nas amostras de leite com resultados de CMT 3+ (Tabela 15) (Figura 14).. O aumento nos valores do pH é indicativo de mastite subclínica (LIMA JÚNIOR, 1991; NICOLAU et al. 1996; VIANNI, 1997). Estes achados são justificados pelo aumento de permeabilidade, que permite a passagem de proteínas plasmáticas e eletrólitos, fazendo com que o pH se aproxime ao do sangue, o que ratifica a afirmação de que nas mastites subclínicas o pH do leite tende à alcalinidade (SCHALM, 1977; FONSECA & SANTOS, 2001).

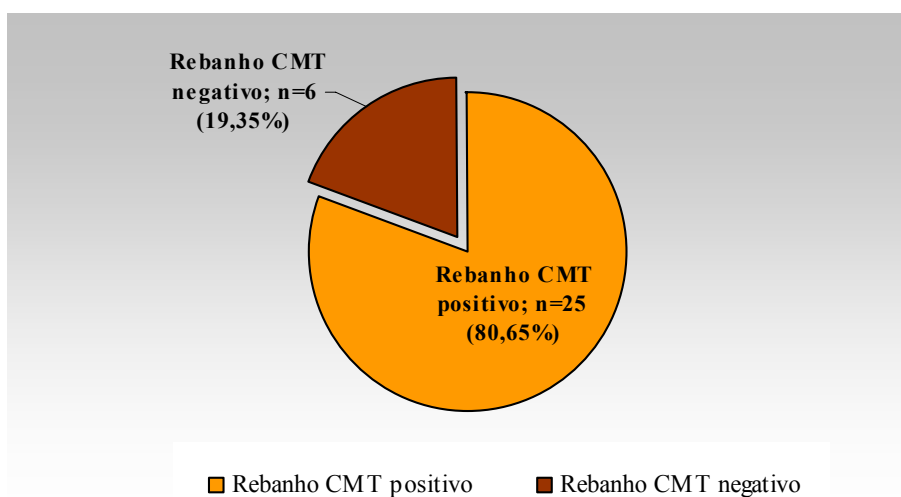




**Figura 14** - Valores médios do pH do leite de ovelhas da raça Santa Inês nas diferentes reações do CMT.

### 5.7- Análise Epidemiológica

Dos 31 rebanhos analisados, 25 (80,65%) tiveram animais com diagnóstico de CMT positivo e em apenas seis (19,35%) não foram diagnosticadas glândulas mamárias positivas ao teste.



**Figura 15** – Distribuição dos resultados do CMT nos rebanhos de ovelhas Santa Inês estudados.

Das propriedades estudadas, predominava em 76% dos rebanhos o sistema de criação semi-intensivo. Em ovelhas criadas a pasto a incidência é baixa, sendo os casos existentes relacionados por Pugh (2005), ao hábito destes animais ao decúbito noturno, expondo os tetos ao solo, já nos animais estabulados muitos são os casos desencadeados devido às lesões na teta (RADOSTITS et al, 2000). Sevi et al. (2001), sugerem que o espaço é um fator crítico na criação de ovelhas leiteiras e indicam que uma área menor que 7m<sup>3</sup>/animal pode afetar a performance e saúde dos animais.

Dos 135 animais analisados, 56 foram diagnosticados como positivos ao CMT, sendo 37 (66,07%) positivos em uma metade mamária e 19 (33,93%) nas duas metades. Estes achados ratificam as observações de De La Cruz et al. (1994) quando trabalharam com mastite subclínica na espécie ovina e encontraram predomínio de infecção unilateral.

Das glândulas estudadas, as positivas ao CMT (61,97%) foram de ovelhas com mais de uma lactação, 18,31% estavam na primeira lactação e em 19,72% não havia a informação da quantidade de lactações. Estes dados ratificam os achados de Albenzio et al. (2002), que observaram aumento dos casos de mastite infecciosa ovina com o aumento do número de lactações, entretanto os casos de mastite não infecciosa foram mais freqüentes em ovelhas jovens. Para Sthefanakis et al. (1995) a ocorrência da mastite subclínica é maior em ovelhas múltíparas que em primíparas.

Das amostras positivas no CMT, 56,34% das glândulas analisadas foram de ovelhas que pariram apenas uma cria, 30,99% duas crias e 12,67% não soube informar. Estes achados são corroborados pelos relatos de Oliveira (2000), que observou freqüência da mastite subclínica maior nos casos em que a ovelha produz somente um cordeiro; quando o parto é duplo ou triplo o consumo de leite aumenta, favorecendo o melhor funcionamento das glândulas mamárias. Isto porque a sucção inadequada dos tetos pelos cordeiros, induz a um ineficiente esgotamento do leite da glândula e a predisposição à infecção intramamária (MENZIENS & RAMANOON, 2001). Em contrapartida a forte sucção exercida pelos cordeiros também predisponha à doença, principalmente pela ocorrência de mastite ser favorecida por lesões nos tetos. De acordo com Oliveira (2006), em alguns casos a ocorrência da enfermidade pode estar aumentada, pois o borrego não consome todo o leite produzido, podendo predispor a infecção intra-mamária. Fernandes et al. (2006) relataram que cordeiros da raça Santa Inês não ingerem o leite com tanta intensidade na fase inicial de sua vida, predispondo à mastite.

Em 92,85% dos rebanhos analisados, os borregos ficavam sempre com as mães, sendo desmamados a partir de dois meses de idade em 3,57%, até os três meses em 14,28% e a partir dos três meses de idade em 82,14% dos rebanhos analisados. Coutinho et al. (2006) relataram que quando o cordeiro mama durante 60 a 120 dias, deve-se adotar medidas que evitem lesões nos tetos e úbere das ovelhas, para não predispor a contaminação por patógenos presentes na cavidade oral do cordeiro e no ambiente.

Nos rebanhos analisados os tratadores e ou proprietários foram questionados sobre a ocorrência de casos anteriores de mastite clínica na propriedade e em 45,55% dos casos não souberam informar, em 50,26% informaram que não haviam registros de casos e apenas 4,19% informaram já ter observado a ocorrência de mastite ovina previamente no rebanho. Nas propriedades que relataram haver a enfermidade, 86,36% afirmaram que a doença clínica ocorria na fase inicial da lactação e 66,66% informaram que os animais acometidos perdiam a mama.

Nos animais positivos ao CMT, 54,93% estavam na fase inicial de lactação (15-30 dias pós parto), 23,94% no meio (30-60 dias), 11,27% no final (>60 dias) e 9,86% não havia a informação. McDougall et al. (2002), estudando a influência da fase de lactação na ocorrência de mastite subclínica em ovelhas, verificaram que os animais estavam mais predispostos à infecção no início da lactação do que 40 dias pós-parto e Menziens & Ramanan (2001), afirmaram que o início e o final da lactação é período de maior susceptibilidade animal. Fthenakis (1996) considera que o final da lactação das ovelhas, momento em que se inicia o desmame dos cordeiros, é propício ao acometimento da glândula mamária ovina pela mastite subclínica. Embora Blagitz (2007) não tenha encontrado diferenças quanto ao acometimento das metades mamárias analisadas durante as fases de lactação. E Blagitz et al. (2007) também não tenham observado diferenças quanto ao CMT e exame bacteriológico que pudessem ser associados às fases de lactação, apesar da celularidade observada ter sido maior no início e final da lactação. Quanto ao uso de antibióticos intramamário, somente um dos rebanhos estudados adotava este procedimento. O tratamento local ou sistêmico em ovinos se fundamenta em informações disponíveis a partir dos trabalhos realizados em bovinos, sendo conveniente o isolamento bacteriano, com finalidade de identificar o agente etiológico da doença e proceder às orientações adequadas ao tratamento (MENZIENS, 2000; PUGH, 2005). A antibioticoterapia no período seco é uma das mais efetivas ferramentas em programas de controle da mastite em ovelhas, pois

melhora a qualidade microbiológica do leite com conseqüente aumento da produção (GONZALO et al., 2004; GONZALO et al., 2005).

### **5.7.1- Genotipagem de *S. aureus* pela técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)**

Foram caracterizadas 18 amostras de *S. aureus*, 12 delas isoladas neste estudo da mastite subclínica (sete resultantes de amostras reagentes ao CMT e cinco não reagentes). As outras seis amostras de *S. aureus* foram isoladas de casos clínicos, resultante de um estudo realizado paralelamente a este (OLIVEIRA, 2007), nos mesmos rebanhos estudados.

Após a análise da relação epidemiológica das 18 cepas de *S. aureus* pela análise da macrorestrição do DNA cromossômico, realizada pela técnica de eletroforese de campo pulsado (PFGE) foi visualizado o dendrograma gerado pelo software Bionumerics que permitiu distinguir dois clusters (I e II) (Figura 16). Paralelamente, um total de sete diferentes padrões genéticos (PA1-PA2; PB e PC1-PC4) resultaram em três linhagens de *S. aureus* (LA-LC). Os pulsotipos obtidos foram: PA1 (amostras 1, 2, 3, 4, 10 e 11); PA2 (amostra 15); PB (amostras 8 e 9); PC1 (amostras 5, 7, 13 e 14); PC2 (amostra 18); PC3 (amostras 6, 19 e 21) e PC4 (amostra 12), sendo as linhagens LC (PC1-PC4) e LA (PA1-PA2), respectivamente, as mais prevalentes e disseminadas, perfazendo 9/18 (50,0%) e 7/18 (38,89%) das amostras analisadas. Paralelamente, a linhagem LB (PB) foi a menos freqüentemente isolada (11,11%).

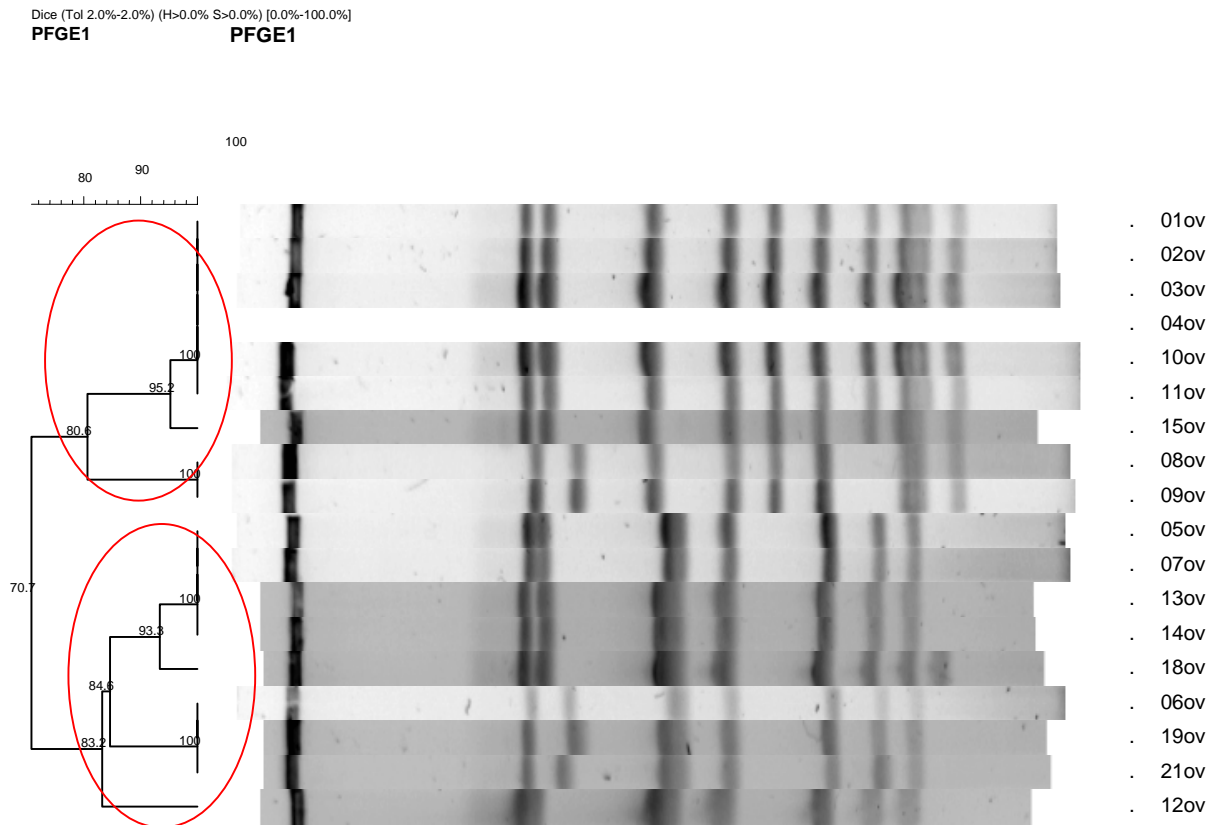
A distribuição dos padrões genéticos e respectivas linhagens obtidas pela eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) podem ser observadas na Tabela 16.

A distribuição dos padrões genéticos e respectivas linhagens obtidas pela PFGE dos isolados de *S. aureus* de acordo com o exame clínico (mastite subclínica/mastite clínica), demonstra que as linhagens A e C foram visualizadas nas cepas isoladas do leite das amostras não reagentes, reagentes ao CMT e casos de mastite clínica e, a linhagem B foi visualizada na cepas resultantes de casos clínico e reagentes ao CMT (Tabela 17).

O *S. aureus* foi isolado do leite de ovelhas da raça Santa Inês em sete (46,67%) dos municípios investigados, e em nove (29,03%) dos 31 rebanhos estudados. O percentual de isolados de *S. aureus* a partir do total de isolados bacterianos obtidos nas amostras de leite de

ovelhas, variou entre 7,1 e 44,4% por município (Tabela 16) Resultados superiores foram evidenciados por Cabral et al. (2004) que isolaram até 71,4% desta bactéria num mesmo

As linhagens LA e LC neste estudo foram as mais prevalentes 38,9% e 50% respectivamente, estando presente nas amostras isoladas de todos os municípios estudados. Cabral et al. (2004) obtiveram resultados semelhantes e concluíram que o *S. aureus* pode ser disseminado não só em um mesmo rebanho, como entre rebanhos e diferentes regiões, tendo verificado existência de nove linhagens de *S. aureus* isolados de leite de vacas. Silveira Filho (2007), trabalhando com cepas de *S. aureus* isoladas de casos de mastite em vacas identificou por meio da PFGE 10 linhagens (A a J) com 80% de similaridade entre as cepas. A identificação de clones num rebanho ou numa região pode ser empregada como base para o planejamento de métodos específicos para o controle da mastite causada pelo *S. aureus*.



Os números do lado direito representam os isolados examinados e os resultados circulado à esquerda e em vermelho representam os 2 cluster determinados.

**Figura 16** – Relação clonal de cepas de *S.aureus* solados de leite de ovelhas da raça Santa Inês em diferentes rebanhos.

**Tabela 16** - Distribuição dos padrões genéticos e respectivas linhagens obtidas pela eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) das 18 amostras de *S. aureus* isoladas de leite de ovelhas Santa Inês em diferentes municípios.

Municípios	Linhagens <i>S. aureus</i> (n=18)						
	LA		LB	LC			
	<i>PA1</i>	<i>PA2</i>	<i>PB</i>	<i>PC1</i>	<i>PC2</i>	<i>PC3</i>	<i>PC4</i>
<i>Iati</i>	4(44,4%; 22,2%)	—	—	—	—	—	—
<i>Brejão</i>	—	—	—	2(28,6%; 11,1%)	—	1(14,3%; 5,5%)	—
<i>Garanhuns</i>	1(9,1%; 5,5%)	—	2(18,2%; 11,1%)	—	1(9,1%; 5,5%)	—	—
<i>São João</i>	1(14,3%; 5,5%)	—	—	—	—	—	—
<i>Terezinha</i>	—	—	—	2(14,3%; 11,1%)	—	1(7,1%; 5,5%)	1(7,1%; 5,5%)
<i>Lajedo</i>	—	1(16,7%; 5,5%)	—	—	—	—	—
<i>Canhotinho</i>	—	—	—	—	—	1(9,1%; 5,5%)	—
$\Sigma$ (%)	6 (33,3%)	1 (5,55%)	2 (11,11%)	4 (22,22%)	1 (5,55%)	3 (16,67%)	1 (5,55%)

O primeiro número entre parênteses indica o percentual de cepas observadas no município; segundo número indica o percentual do total de *S.aureus* caracterizados.

**Tabela 17** - Distribuição dos padrões genéticos e respectivas linhagens obtidas pela eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) das 18 amostras de *S. aureus* isoladas de leite de ovelhas Santa Inês de acordo com o exame clínico.

Exame Clínico	Linhagens <i>S. aureus</i> (n=18)						
	LA		LB	LC			
	<i>PA1</i>	<i>PA2</i>	<i>PB</i>	<i>PC1</i>	<i>PC2</i>	<i>PC3</i>	<i>PC4</i>
<i>Mastite clínica</i>	2 (11,1%)	—	1 (5,5%)	1 (5,5%)	1 (5,5%)	—	1 (5,5%)
<i>Reagente ao CMT</i>	3 (16,7%)	1 (5,5%)	1 (5,5%)	—	—	2 (11,1%)	—
<i>Não reagente ao CMT</i>	1 (5,5%)	—	—	3 (16,7%)	—	1 (5,5%)	—
$\Sigma (n)$	6	1	2	4	1	3	1

O número entre parênteses corresponde o percentual de amostras em relação ao número total de *S aureus* caracterizados.



## CONCLUSÕES

Considerando os objetivos propostos e as condições sob as quais a pesquisa foi realizada, as conclusões obtidas foram:

O principal agente isolado de casos de mastite subclínica foi o *Staphylococcus coagulase* negativo seguido do *Staphylococcus aureus*;

Foram observados diferentes graus de susceptibilidade aos antimicrobianos nas cepas de SCN, Streptococcus e Gram-negativas, não evidenciando, entretanto, uma forte pressão seletiva entre isolados de *Staphylococcus coagulase* positivo;

Existiu relação entre o CMT e o isolamento bacteriano, sendo recomendada a colheita das amostras de leite a partir da reação 1+;

Os agentes etiológicos envolvidos no processo acarretaram elevação na CCS, sendo considerado o valor de  $1 \times 10^6$  células/mL o limite inferior indicativo de glândulas mamárias infectadas;

Os agentes etiológicos isolados desencadearam alterações nos valores da acidez Dornic, densidade, teor de cloretos e pH do leite;

Verificou-se similaridade genética entre as cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas nos rebanhos estudados;

A mastite subclínica foi diagnosticada na grande maioria dos rebanhos, representando um sério problema de ordem econômica nesta espécie animal, sendo necessário um trabalho de educação continuada junto aos produtores, com o intuito de fortalecer a adoção de medidas higiênico-sanitárias.

## REFERÊNCIAS

ALBENZIO, M.; TAIBI L.; MUSCIO, A.; SEVI, A. Prevalence and etiology of subclinical mastitis in intensively managed flocks and related changes in the yield and quality of ewe milk. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.43, p.219-226, 2002.

AL-MAJALI, A.M.; JAWABREH, S.. Period prevalence and etiology of subclinical mastitis in Awassi sheep in sourthern Jordan. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, n. 47, v. 3, p. 243-248, 2003.

ALMEIDA, M.Z.P.R.B.; MENDONÇA, C.L.; AFONSO, J.A.B.; OLIVEIRA, L.G.L.; ANDRADE, A.R.S. **Utilização do California Mastitis Test (CMT) no diagnóstico da mastite subclínica em ovelhas da raça Santa Inês**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 6, 2007. *Anais...* Curitiba, 2007a.

\_\_\_\_\_; OLIVEIRA, L.G.L.; AFONSO, J.A.B.; LÁZARO, N.S.; MENDONÇA, C.L. **Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite subclínica em ovelhas da raça Santa Inês no Agreste Meridional do Estado de Pernambuco**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 6, 2007. *Anais...* Curitiba, 2007b. p.

ANUALPEC 2002: Anuário de Pecuária Brasileira. São Paulo:FNP Consultoria e Comércio, p. 312, 2002.

ARIZNABARRETA, A.; GONZALO, C.; SAN PRIMITIVO F. Microbiological quality and cell count of ewe milk with special reference to *Staphylococci*. **Journal of Dairy Science**, Stanford, v. 85, p. 1370-1375, 2002.

ASSENAT, L. Composición e propiedades. In: LUQUET, F.M. **Leche y productos lácteos: vaca-oveja-cabra**. Zaragoza: Acribia, 1991. cap. 1, p. 277-313.

BATAVANI, R. A.; MORTAZ, E.; FALAHIAN, K.; DAWOODI, M. A. Study on frequency, etiology and some enzymatic activities of subclinical ovine mastitis in Urmia, Iran. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 50, p. 45-50, 2003.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK M. Antibiotic susceptibility testing by standartized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**. Philadelphia, v.45, p.493-496, 1966.

BERETTA, A. L. R. Z. **Epidemiologia molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina isoladas de pacientes do Hospital das Clínicas - Unicamp no período de 1991 a 2001**. 2004. 137 p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

BERGONIER, D.; BERTHELOT, X. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. **Livestock Production Science**. Amsterdam, v.79, p. 1-16, 2003.

BERRIATUA, E.; ZILUAGA, I.; VIRTO, M.; URIBARREN, P.; JUSTE, R.; LAEVENS, S.; VANDAMME, P.; GOVAN, J.R.W. Outbreak of Subclinical Mastitis in a flock of Dairy Sheep Associated with *Burkholderia cepacia* Complex Infection. **Journal Clinical of Microbiology**, Washington, v. 39, n. 3, p. 990-994, 2001.

BERTHELOT, X.; LAGRIFFOUL, G.; CONCORDET, D.; BARILLET, F.; BERGONIER, D. Physiological and pathological thresholds of somatic cell counts in ewe milk. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 62, n. 1-2, p. 1-5, 2006.

BISPO, F.; MÁRMORE, C.; ARCARO, J.R.P.; COSTA, E.O. 2007. Evidências epidemiológico-moleculares do diagnóstico do estágio de portador assintomático de *Staphylococcus aureus* em glândulas mamárias bovinas. In: Encontro de Pesquisadores em Mastites, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ, Unesp, p.90.

BLAGITZ, M. G. **Avaliação da relação do exame físico da glândula mamária de ovelhas da raça Santa Inês com o perfil citológico e bacteriológico do leite**. 2007. 195f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

\_\_\_\_\_; RICCIARD, M.; FREITAS, C.; KITAMURA, S. S.; GOMES, V.; MADUREIRA, K. M.; DELLA LIBERA, A.M.M.P. Efeito do desmame na contagem de células somáticas (CCS) e exame microbiológico do leite de ovelhas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71 (supl.), p. 741 – 749, 2004.

\_\_\_\_\_; BENITES, N.R.; MELILLE, P.A.; BETIOL, P.S.; SUCUPIRA, M.C.A. AZEDO, M.R.; GOMES, V.; DELLA LIBERA, A.M.M.P. Efeito da fase da lactação na glândula mamária de ovelhas da raça Santa Inês. Encontro de Pesquisadores em Mastites, 2007, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ, Unesp, SP, p.111.

BLANC, D. S.; STRUELENS, M. J.; DEPLANO, A. HAUSER, P. M.; PETIGNAT, C.; FRANCIOLI, P. Epidemiological Validation of Pulsed Field Gel Electrophoresis Patterns for Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39: p. 3442-3445, 2001.

BOOTH, M. C.; PENCE, L. M.; MARASRESHTI, P.; CALLEGAN, M. C.; GILMORE, M. S. Clonal associations among *Staphylococcus aureus* isolates from various sites of infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 1, p. 345-352, 2001.

BOR, A.; WINKLER, M.; GOOTWINE. Non-clinical intramammary infection in lactating ewes and its association with clinical mastitis. **British Veterinary Journal**, London, v. 145, p. 178-184, 1989.

BRAMLEY, A.J.; CULLOR, J.S.; ERSKINE, R.J.; FOX, I.K.; HARMON, R.J.; HOGAN, J.S.; NIKERSON, S.C.; OLIVER, S.P.; SMITH, K.L.; SORDILLO, L.M. **Current concepts of bovine mastitis**. Madison: National Mastitis Council, 1996, p. 1-3.

BRITO, J.R.F.; CALDEIRA, G.A.V.; VERNEQUE, R. DA S.; BRITO, M.A.V. P. Sensibilidade e especificidade do "California Mastitis Test" como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 2, p. 49 – 53, 1997.

BRITO, M.R.A. **Variação dos perfis metabólico, hematológico e lácteo em ovinos leiteiros na serra gaúcha**. 2004. 53 f. Tese (Mestrado em ciência veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

\_\_\_\_\_. **Caracterização físico-química do leite de ovelha da raça lacaune produzido na serra gaúcha**. 2003, 41f. Trabalho de conclusão de curso (Especialização) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

\_\_\_\_\_. Composição do sangue e do leite em ovinos leiteiros do sul do Brasil: variações na gestação e na lactação. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 942-948, 2006.

BURRIEL, A. L. Dynamics of intramammary infection in the sheep caused by coagulase-negative Staphylococci and its influence on udder tissue and milk composition. **The Veterinary Record**, London, v. 140, n. 16, p. 419-423, 1997.

\_\_\_\_\_.; SCOTT, M. A Comparison of Methods Used in Species Identification of Coagulase-negative Staphylococci Isolated from the milk of sheep. **The Veterinary Journal**, London, v. 155, p. 183-188, 1998.

BUSSAB, W.O.; MORETTIN, P.A. **Estatística básica**. 5.ed. São Paulo, Saraiva, 2003. 526p.

CABRAL, K.G.; LÄMMIRE, C.; ZSCHÖCK, M.; LANGONI, H.; SÁ, M.E.P.; VICTORIA, C.; SILVA, A.V. Pheno and genotyping of *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine milk samples from São Paulo state, Brazil, **Journal of Microbiology**, Canadá, v. 50, n.11, p. 901-909, 2004.

CARTER, G.R.; COLE JUNIOR J.R. **Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology**. 5.ed. New York: Academic Press, 1990. 620p.

CLEMENTS, A.C.A.; TAYLOR, D.J.; FITZPATRICK, J.L. Evaluation of diagnostic procedures for subclinical mastitis in meat-producing sheep. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.70, p.139-148, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI/NCCLS). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**: 26. M 100-S15. 2005.

CONTRERAS A., CORRALES J.C., SIERRA D., MARCO J. Prevalence and aetiology of non-clinical intramammary infection in Murciano-Granadina goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 17, p.71-78, 1995.

\_\_\_\_\_; LUENGO, C.; SANCHES, A.; CORRALES, J.C. The role of intramammary pathogens in dairy goats. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 79, p. 273-283, 2003.

\_\_\_\_\_; SIERRA, D.; CORRALES, J.C.; SANCHES, A.; MARCO J. Physiological threshold of somatic cell count and california mastitis test for diagnosis of caprine subclinical. **Small Ruminant Research**. Amsterdam, v. 21, p. 259-264, 1996.

\_\_\_\_\_; SIERRA, D.; SANCHES, A.; CORRALES, J.C.; MARCO, J.C.; PAAPE, M.J.; GONZALO, C. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 68, p. 145-153, 2007.

COSTA, E.O.; WATANABE, E.T. Tratamento de mastite. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITIS, 3, 199. Botucatu. **Anais...** Botucatu-SP: FMVZ/UNESP, 1999. p. 87-101.

COSTA, L.S.P.; LIMA, P.P.; CALLADO, A.K.; NASCIMENTO, S.A. do; CASTRO, R.S. Lentivírus de pequenos ruminantes em ovinos Santa Inês: Isolamento, identificação pela PCR e inquérito sorológico no Estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, p. 11-16, 2007.

COSTA, N.A.; MENDONÇA, C.L.; AFONSO, J.A.B.; SOUZA, M.I.; CALADO, A.L.; PIRES JR., J.B; COUTINHO, L.T.; SIMÃO, L.C.V.; CAVALCANTE, A.E.L. Ocorrência de mastite em ovelhas atendidas na Clínica de Bovinos, UFRPE, Campus Garanhuns. In CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 28, 2001. Salvador. **Anais...** Salvador, 2001. p.123.

COUTINHO D.A., COSTA J.N., RIBEIRO M.G.; TORRES J.A. Etiologia e sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de bactérias isoladas de ovelhas da raça Santa Inês com mastite subclínica. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. Salvador, v.7, n.2 p.139-151, 2006.

CROSSMAN, P. J.; HUTCHISON, I. Gangrenous mastitis associated with *Pseudomonas aeruginosa*. **The Veterinary Record, London**, v. 136, n. 21, p.548, 1995.

CRUZ, M.; SERRANO, E.; MONTORO, V.; MARCO, J.; ROMEO, M.; BASSELGA, R.; ALBIZU, I.; AMORENA, B. Etiology and prevalence of subclinical mastitis in the Manchega sheep at midlate lactation. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 14, p. 175-180, 1994.

CURI, P.R. **Metodologia e análise da pesquisa em ciências biológicas**. Botucatu: Tipomic, 1997. 263p.

CUTLIP, R.C.; LEHMKUHL, H.D.; BROGDEN, K.A. Mastitis associated with ovine progressive pneumonia virus infection in sheep. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 46, p. 326-328, 1985.

DAVIDSON, I. Observations on the pathogenic staphylococci in the dairy herd during a period of six years. **Research Veterinaire Science**, London. v.2, p.22-40, 1961.

DE LA CRUZ, M.; SERRANO, E.; MONTORO, V.; MARCO, J.; ROMEO, M.; BALSEGRA, R.; ALBIZU, I.; AMORENA, B. Etiology and prevalence of subclinical mastitis in the Manchega sheep at mid late lactation. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 14, p. 175-180, 1994.

DELLA LIBERA A.M.M.P.; ARAÚJO, W.P.; COSTA, E. O.; GARCIA, M.; TÁVORA, J.F.P.; BENATTI, L.A.T. Características físico-químicas e microbiológicas do leite de vacas sem alterações ao exame físico da glândula mamária e com alta contagem de células somáticas. **Revista Brasileira Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.1, n.2, p. 42 – 47, 2001.

\_\_\_\_\_; AZEDO M.R.; BLAGITZ M.G. Mastite em pequenos ruminantes In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 4, 2007, Botucatu. **Anais...** Botucatu - SP: FMVZ, UNESP, 2007, p.64-73.

DIFFAY B.C., MC KENZIE D., WOLF C.; PUGH D.G. Abordagem e exame de ovinos e caprinos. In: PUGH, D.G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca. p.1-19, 2005.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**. Washington, v. 13. n. 1. p. 16-34, 2000.

DOMINGUES, P.F.; LEITE, C.A. **Mastite em ovinos**. Disponível em: <<http://fmvz.unesp.br>>. Acesso em: 16 jan. 2005.

DOMINGUES, P.F.; LUCHEIS, S.B.; SERRÃO, L.S.; FERNANDES, S.; CONTENTE, A.P.A.; MARTINS, E.C.V.; LANGONI, H. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite subclínica em ovelhas da raça Santa Inês. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 22, n. 2, p. 146-152, 2006.

ELIAS, A.O.; VICTORIA, C.; Da SILVA, A.V.; LANGONI, H. Características físico-químicas e contagens de células somáticas de leite proveniente de vacas naturalmente infectadas por

*Streptococcus* spp. **Arquivo Ciência Veterinária Zoologia**, UNIPAR, Umuarama, v. 8, n. 2, p. 165-170, 2005.

EWING, W.H. **Identification of Enterobacteriaceae**. 4. ed. New York: Elsevier, 1986. 536p.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, 2004.

FARMER, J.J.; DAVIS, B.R.; HICKMAN, F.W. et al. Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 21, p.46-76, 1985.

FERNANDES, J.C.T.; CARDOSO, M.R.I. Mamite Ovina causada por *Staphylococcus aureus*. Primeira observação no Brasil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**. UFRGS, v. 13, p. 71-74, 1985.

FERNÁNDEZ RIERA, E.; LAS HERAS; DEL RÍO, A.; LÓPEZ PAREDES, I.; PORRERO CALONGE, M. C.; DOMÍNGUEZ RODRÍGUEZ, L.; FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL FERNÁNDEZ, J. F.; MORENO ROMO, M. A. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis ovinas. **Patología Animal**. 11: 381-384, 2000.

FERNANDEZ, E. P.; VELA, A. I.; HERAS, A. L.; DOMINGUEZ, L.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J. F.; MORENO M. A. Antimicrobial susceptibility of corynebacteria isolated from ewes's mastitis. **International Journal of Antimicrobial Agents**. Amsterdam, v.18, p.571-574, 2001.

FONSECA, F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2001.175 p.

FTHENAKIS, G. C. **Ovine mastitis with special reference to subclinical mastitis associated with coagulase-negative staphylococci**. PhD thesis. University of London, 1988.

\_\_\_\_\_; JONES, J.E. The effect of inoculation of coagulase-negative staphylococci into the ovine mammary gland. **Journal of Comparative Pathology**, Amsterdam, n. 102, v. 2, p. 211-219, 1990.

\_\_\_\_\_. Incidence and aetiology of subclinical mastitis in ewes of southern Greece. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 13, p.293-300, 1994.

\_\_\_\_\_. Incidence and aetiology of subclinical mastitis in ewes of southern Greece. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 78, p.2753-2759, 1995.

\_\_\_\_\_. Somatic cell counts in milk of Welsh-Mountain, Dorset-Horn and Chios ewes throughout lactation. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 20, p.155-162, 1996.

\_\_\_\_\_. Susceptibility to antibiotics of staphylococcal isolates from cases of ovine or bovine mastitis in Greece. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 28, p. 9-13, 1998.

\_\_\_\_\_.; EL-MASANAT, E. T.S.; Booth, S.J.M.; Jones, J.E.T. Somatic Cell Counts of Ewes Milk. **British Veterinary Journal**, London, v. 147, p. 575-581, 1991.

\_\_\_\_\_.; LEONTIDES, L.; SKOUFOS, J.; TAITZOGLON, I. A.; TZORA, A. Case report: high prevalence rate of ovine mastitis caused by coagulase-negative staphylococci and predisposed by increased gossypol consumption. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 52. p. 185-189, 2004.

\_\_\_\_\_.; SARATTSIS, PH.; TZORA, A.; LINDE, K. Naturally occurring subclinical ovine mastitis associated with *Listeria monocytogenes*. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 31, p. 23-27, 1998.

FUERTES, J.A.; GONZALO, C.; CARRIEDO, J.A.; SAN PRIMITIVO, F. Parameters of test day milk yield and milk components for dairy ewes. **Journal of Dairy Science**, Stanford, v. 81, p. 1300-1307, 1998.

GOMES, V.; DELLA LIBERA, A.M.M.P.; MADUREIRA, K.M.; ARAUJO, W.P. Effect of the stage of lactation on somatic cell counts in healthy goats (*Caprae hircus*) breed no Brazil. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 64, n. 1-2, p. 30-34, 2006.

GONÇALVES, D. **Caracterização molecular de isolados de *Staphylococcus aureus* e produção de marcadores genéticos para diagnóstico de mastite em bovinos leiteiros**. 2006. 118 p. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

GÕNI, P.; VERGARA, Y.; RUIZ, J.; VILA, J.; GÓMEZ-LUS, R.. Antibiotic resistance and epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* strains from ovine and rabbit mastitis. **International Journal of Antimicrobial Agents**. London, v. 23, p. 268-272, 2004.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M.C.; CÁRMENES, P. Evaluation of the California mastitis test as a discriminant method to detect subclinical mastitis in ewes. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 21, p.245-250, 1996.



GONZALO, C.; ARIZNABARRETA, A.; CARRIEDO, J. A.; PRIMITIVO, F. S. Mammary Pathogens and Their Relationship to Somatic Cell Count and Milk Yield Losses in Dairy Ewes. **Journal of Dairy Science**, Stanford, v.85, p.1460-1467, 2002.

\_\_\_\_\_.; BARO, J. A.; CARRIEDO, J. A.; SAN-PRIMITIVO, F. Use of the fossomatic method to determine somaticcell counts in sheep milk. **Journal of Dairy Science**, Stanford, v. 76, p. 115-119, 1993.

\_\_\_\_\_.; SAN-PRIMITIVO, F.; CÁRMENES, P. Relationship between Somatic Cell Count and Intramammary Infection of the Half Udder in Dairy Ewes. **Journal of Dairy Science**, Stanford, v. 78, p. 2753-2759, 1995.

\_\_\_\_\_.; CARRIEDO, J. A.; BARO, J. A.; SAN-PRIMITIVO, F. Factors influencing variation of test day milk yield, somatic cell count, fat and protein in dairy sheep. **Journal of Dairy Science**, Stanford, v. 77, p. 1537-1542, 1994.

GREEN, T.J. Use of somatic cell counts for detection of subclinical mastitis in ewes. **Veterinary Record**. London, v. 114, p. 43, 1984.

GROSS, S.J.; POLLAK, J.E.; ANDERSON, J.G.; TORELL, D.T. Incidence and importance of subclinical mastitis in sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 46, n. 1, 1978.

GRÜNERT, E. Sistema genital feminino In: DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H.D.; STÖBER M. **Rosenberger: exame clínico dos bovinos**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1993. p.299-308.

GUTIERREZ, L.M.; GARCIA LOPES, M.L.; OTERO, A.; GARCIA FERNÁNDEZ, M.C.; MORENO, B. Incidence of Staphylococci in ovine mastitic milk and antibiotic susceptibility of the strains. **Milchwissenschaft**, München, v. 45, n. 12,1990.

HARMON, R.J. Phisiology of mastitits and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 77, p. 2103-2112, 1994.

HARTMAN, M.; BOLSANELLO, R.X.; DOMINGUES, P.F.; LANGONI, H. 2007. Dinâmica dos patogenos encontrados na mastite ovina durante a lactação. In: Congresso Brasileiro de Veterinária, 34<sup>o</sup>, Santos-SP. *Anais...* Santos, p.277.

HARTSTEIN, A. I.; MORTHLAND, V. H.; ENG, S. Restriction enzymes analysis of plasmid DNA and bacteriophage typing of paired *S. aureus* blood culture isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 27, p.1874-1879, 1989.

HEIDRICH, H.J. RENK, W. **Enfermedades de las glandulas mamarias en los animals domesticos**. Barcelona: Labor. 1969. 502p.

HENDY, P.G.; PUGH, K.F.; HARRIS, A.M.; DAVIES, A.M. Prevention of post weaning mastitis in ewes. **The Veterinary Record**, London, v. 109, p. 56-57, 1981.

HERNANDES, G.S.; LUCHEIS, S.B. Monitoramento microbiológico da mastite ovina na região de Bauru – SP. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 2007, Botucatu. **Anais...** Botucatu - SP: FMVZ/UNESP, 2007. p.102.

HINCKLEY, L. S.; BENSON, R. H.; POST, J. E. et al. Antibiotic susceptibility profiles for mastitis treatment. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. Schaumburg, v. 187, p. 709-711, 1985.

HUESTON, W.D; HARTWING, N.R.; JUDY, J.K. Detection of ovine intramammary infection with the California Mastitis test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. Schaumburg, v. 188, n. 5, p. 522-524, 1986.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Pecuária Municipal**, 2006. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 15 jan. 2007.

KAPUR, V.; SISCHO, W. M.; GREEN, R. S. Molecular population genetic analyses of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.33, p. 376-380, 1995.

KEISLER, D.H.; ANDREWS, M.L.; MOFFATT, R.J. Subclinical mastitis in ewes and its effect on lamb performance. **Journal Animal Science**, Champaign, v.70, n.6, p.1677-81, 1992.

KIRK, J. H.; GLENN, J.S. Mastitis in ewes. **Compendium on Continuing Education for Veterinarians**, v.18, n.5, p.582-591, 1996.

\_\_\_\_\_; MAAS, J. P. Mastitis in a flock of milking sheep. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 22, p. 187-191, 1996.

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

KORHONEN, H.; KAARTINEN, L. Changes in the composition of milk induced by Mastitis. In: SANDHOLM, M.; MONHAKEN-BUZALSKI, T.; KAARTINEN, L.; PYÖRÄLÄ, S. **The Bovine Udder and Mastitis**. Helsinki, University of Helsinki, p. 76-82, 1995.

LAFI, S.Q.; AL-MAJALI, A.M.; ROUSAN, M.D.; ALAWNEH, J.M. Epidemiological studies of clinical and subclinical ovine mastitis in Awassi sheep in northern Jordan. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 33, p. 171-181, 1998.

LANARA – Laboratório Nacional de Referência Nacional. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II- Métodos físicos e químicos.** Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Brasília, 1981, 201p.

LANGONI H., MENDONÇA L.J.P., RIBEIRO F.C.; ARAÚJO W.N. 1999. Aspectos microbiológicos e perfis de sensibilidade de patógenos na mastite ovina. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 3., 1999, Botucatu. *Anais...* Botucatu - SP: FMVZ/UNESP,1999, p.135.

LAS HERAS, A.; DOMÍNGUEZ, L.; FÉRNANDEZ-GARAYZÁBAL, J.F. Prevalence and aetiology of subclinical mastitis in dairy ewes of the Madrid region. **Small Ruminants Research**, Amsterdam, v. 32, p. 21-29, 1999.

LAS HERAS, A.; LÓPEZ, I.; FERNANDEZ-GARAYZÁBAL, J.F. Outbreak of acute ovine mastitis associated with *Pseudomonas aeruginosa* infection. **The Veterinary Record**, London, v.145, p. 111-112, 1999.

LAS HERAS, A.; VELA, A.I.; DOMÍNGUEZ, L.; FERNANDEZ, E.; LEGAZ, E.; DOMÍNGUEZ, L.; FERNANDEZ-GARAYZÁBAL, J.F. Unusual Outbreak of Clinical Mastitis in Dairy Sheep caused by *Streptococcus equi* subsp. zooepidemicus. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v. 40, n.3, 145, p.1106-1108, 2002.

LAS HERAS, A.; FERNANDEZ, E.; CASAMAYOR, A.; DOMÍNGUEZ, L.; FERNANDEZ - GARAYZÁBAL, J.F. DNA macrorestriction analysis by pulsed-field gel electrophoresis of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from mastitis in dairy sheep. **The Veterinary Record**, London, v.151, p. 670-672, 2002.

LERONDELLE, C.; RICHARD, Y.; ISSARTIAL, J. Factors affecting somatic cell counts in goat milk. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 8, p. 129-139, 1992.

LIMA JUNIOR, A.D. **Fatores condicionantes da mastite subclínica caprina e os efeitos da doença sobre as características físico-químicas, celulares e microbiológicas do leite.** 1991. 117 f., Tese (Medicina Veterinária Preventiva), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

LIMA JÚNIOR, A. D.; NADER FILHO, A.; VIANNI, M. C. E. Susceptibilidade “*in vitro*” dos *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativos, isolados em casos de mastite caprina, à ação de antibióticos e quimioterápicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 45, p. 291-296, 1993.

LUENGO, C.; SANCHEZ, A.; CORRALES, J.C.; FERNANDEZ, C.; CONTRERAS, A. Influence of intramammary infection and non-infection factors on somatic cell counts in dairy goats. **Journal Dairy Research**, v. 71, p. 169-174.

LUQUET, F. M. **Leche y producto lácteos: vaca-oveja-cabra**. Zaragoza: Acribia, 1991. p.

MACCARTHY, F.D.; LINDSEY, J.B.; GORE, M.T.; NOTTER, D.R. Incidence and Control of subclinical mastitis in intensively managed ewes. **Journal Animal Science**, v. 66, p. 2715-2721, 1988.

MACFADDIN J.F. **Biochemical test for identification of medical bacteria**. 3. ed. Washington: Williams & Wilkins. 2000. 912p.

MAISI, P.; JUNTILA, J.; SEPPANEN, J. Detection of subclinical mastitis in ewes. **British Veterinary Journal**, London, v. 143, p. 402-409, 1987.

MARCO, J.C. Mastitis en la oveja Latxa: Epidemiologia, diagnóstico y control. Tese (Doutorado). Universidade de Zaragoza, Espanha, 1994.

MAVROGENIS, A.P.; KOUMAS, A.; KAKOYIANNIS, C.K.; TALLOTIS, C.H. Use of somatic cell counts for the detection of subclinical mastitis in sheep. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 17, p.79-84, 1995.

McDOUGAL, L. K.; STEWARD, C. D.; KILLGORE, G. E.; CHAITRAM, J. M.; MCALLISTER, S. K.; TENOVER, F. C. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a National Database. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v. 41, p. 5113-5120, 2003.

\_\_\_\_\_; MURDOUGH, P.; PANKEY, W.; DELANEY, C.; BARLOW, J.; SCRUTON, D. Relationships among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 40, p.245-254, 2001.

McDOUGALL, S; PANKEY, W.; DELANEY, C.; BARLOW, J.; MURDOUGH, P.; SCRUTON, D. Prevalence and incidence of subclinical mastitis in goats and dairy ewes in Vermont, USA. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 46, p.115-121, 2002.

McFARLAND, M., HOLCOMBE, D.; KING, D.; ALLEN, J.; REDELMAM, D. **Quantification of subclinical mastitis in sheep**. 2000. Disponível em: < <http://www.ag.unr.edu/AB/Extension/Cattleman/Cattleman2000/16.htm>>. Acesso em: 02 fev. 2005.

MEDEIROS, J.X. Agronegócio e o trabalho cooperativo. In: WORKSHOP SOBRE CAPRINOS E OVINOS TROPICAIS. 1998, Fortaleza. **Relatório**...Fortaleza: BNB, 1998, p.8.

MENZIES, P. I. **Mastitis of sheep – Overview of recent literature**. University of Guelph, 2000. Disponível em <http://www.vwex.edu/ces/animalscience/sheep/mastitis>. 2000.

\_\_\_\_\_; RAMANOON, S.Z. Mastitis of sheep and goats. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**. Philadelphia, v.17, n.2, p.333-358, 2001.

MONHAKEN-BUZALSKI, T.; SEUNA, E. Isolation and identification of pathogens from milk. In: SANDHOLM, M.; MONHAKEN-BUZALSKI, T.; KAARTINEN, L.; PYÖRÄLÄ, S. **The Bovine Udder and Mastitis**. Helsinki, University of Helsinki, p. 121-142, 1995.

MONTESINOS, I.; SALIDO, E.; DELGADO, T.; CUERVO, M.; SIERRA, A. Epidemiologic Genotyping of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis at a University Hospital and Comparison with Antibiotyping and Protein A and Coagulase Gene Polymorphisms. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p. 2119-2125, 2002.

MORK, T.; TOLLERSRUD, T.; KVITILE, B.; JORGENSEN, H. J.; WAAGE, S. Genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from ovine intramammary infections in Norway. **Veterinary Microbiology**. Cambridge, v. 106, p. 265-273, 2005.

MORONI, P.; CUCCURU, C. Relationship between mammary gland infections and some milk immune parameters in Sardinian breed ewes. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 41. p. 1-7, 2001.

NACCARI, F.; MARTINO, D.; GIOFRE, F.; PASSATINO, A.; DE MONTIS, P. Therapeutic efficacy of tilmicosin in ovine mammary infections. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 47. p. 1-9, 2003.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (N.C.C.L.S.). **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection**. Arlington: NMC. 34p, 1990.

NETTO, I. Bom preço e retorno rápido são vantagens dos ovinos. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 25 out 2000. Disponível em: <<http://www.estado.estadao.com.br/suplementos/agri>>. Acesso em: 16 jan. 2002.

NICOLAU, E.S.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L.A.; ROSSI JÚNIOR, O.D. Influência da mastite subclínica Estafilocócica sobre as características físico-químicas e celulares do leite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, v. 16, n. 1, p. 35-38, 1996.

NUNES, G.R.; BLAGITZ, M.G.; FREITAS, C.B.; SOUZA, F.N.; STRICAGNOLO, C.R.; SANCHES, B.G.S.; AZEDO, M.R.; SUCUPIRA, M.C.A.; DELLA LIBERA, A.M.M.P. 2007. Influência da mastite na composição do leite de ovinos lactantes. In: Congresso Brasileiro de Veterinária, 34<sup>o</sup>, Santos-SP. *Anais...* Santos, p.262.

OLIVE, M.; BEAN, P. Principles and application of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 1661-1669, 1999.

OLIVEIRA, .L.G.L. Estudo clínico-epidemiológico e bacteriológico da mastite em ovelhas da raça Santa Inês no agreste meridional do Estado de Pernambuco. 2007. 47f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.

OLIVEIRA, V.L.M. **Aspectos do leite e mastite em ovinos da raça Santa Inês em Sergipe**. 2006. 70p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Núcleo de Pesquisa e Pós-Graduação e Estudos em Recursos Naturais, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2006..

OLIVEIRA, J.J. A solução é apalpar o úbere da Santa Inês. **O Berro**, Uberlândia, nov/dez 2000. Disponível em: <[http://www.zebus.com.br/zootecnia3\\_40\\_berro.htm](http://www.zebus.com.br/zootecnia3_40_berro.htm)>. Acesso em: 20 out. 2002.

PAAPE, M. J.; WIGGANS, G.R.; BANERMAN, D.D.; THOMAS, D.L.; SANDERS, A.H.; CONTRERAS, A.; MORONI, P.; MILLER, R.H. Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.68, n. 1-2, p. 114-125, 2007.

PENGOV, A. The Role of Coagulase-Negative *Staphylococcus spp.* And Associated Somatic Cell Counts in the Ovine Mammary Gland. **Journal of Dairy Science**, Stanford, v.84, p.572-574, 2001.

PENGOV, A.; CERU, S. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from Bovine and Ovine mammary glands. **Journal of Dairy Science**, Stanford, v. 86, p. 3157-3163, 2003.

PERES, J.R. O leite como ferramenta do monitoramento nutricional. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; DÜRR, J.W.; FONTANELI, R.S. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre, 2001. p. 29-43.

PERIS, C.; MOLINA, P.; FERNANDEZ, N.; RODRIGUEZ, M.; TORRES, A. Variation in somatic cell count, California mastitis test and electrical conductivity among various fractions of ewe's milk. **Journal of Dairy Science**, Stanford, v.74, p.1553-1560, 1991.

PERSON-WALLER, K.; COLDITZ, I.G.; FLAPER, P.; FRANKLIN, N.A.; SEOW, H.F. Accumulation of leucocytes and cytokines in the lactating ovine udder during mastitis due to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Research in Veterinary Science**. Amsterdam, v.62, p. 63-66, 1997.

PFALLER, M. A.; HOLLIS, R. J.; SADER, H. S. Chromosomal restriction fragment analysis by pulsed field gel electrophoresis. In: ISEMBERG, H. D.; ed. **Clinical Microbiology Procedures Handbook**. Washington, American Society for Microbiology, 1993.

PHILPOT, N.W.; NICKERSON, S.C. **Mastitis: counter attack**. Naperville: Babson Bros, 1991, 150p.

PHILPOT, W. N. NICKERSON, S.C. **Vencendo a luta contra a mastite**. São Paulo: Westfalia Landtechnik do Brasil, 2002. 192p.

PRESCOT, S.C.; BREED, R.S. The determination of the number of the body cells in milk by a direct method. **Journal of Infectious Diseases**, v. 7, p. 632-640, 1910.

PUGH, D.G. Enfermidades da glândula mamária . In: ANDERSON, D.E.; HULL, B.L.; PUGH, D.G. Clínica de ovinos e caprinos. São Paulo: Roca, 2005.

PUGLIESE, C.; ACCIAIOLI, A.; RAPACCINI, S.; PARISI, G.;FRANCI, O. Evolution of chemical composition, somatic cell count and renneting properties of the milk of Massase ewes. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 35, p.71-80, 2000.

PYÖRÄLÄ, S. Staphylococcal and Streptococcal mastitis. In: SANDHOLM, M.; MONHAKEN-BUZALSKI, T.; KAARTINEN, L.; PYÖRÄLÄ, S. **The Bovine Udder and Mastitis**. Helsinki, University of Helsinki, p. 143-148, 1995.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.C.; LEONARD, F.C.; MAGUIRE, D. **Microbiologia Veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed. 1994. 512p.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C; BLOOD, D.C; HINCHCLIFF, K.W. **Veterinary medicine**. 9. ed. London: W.B. Saunders.2000. 1877p.

RAINARD, P.; CORRALES, J. C.; BARRIO, M. B.; COCHARA, T.; POUTREL, B. LEUCOTOXIC Activities of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Cows, Ewes, and Goats with Mastitis: Importance of LukM/LukF'-PV Leukotoxin. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. Washington, v.10. n.2. p. 272–277, 2003.

\_\_\_\_\_; DUCELLIE, M.; POUTREL, B. The contribution of mammary infections by coagulase-negative staphylococcus to the herd bulk milk somatic cell count. **Veterinary Research Communications**, v.14, p. 193-198, 1990.

RIBEIRO M.G., COSTA E.O., LANGONI H., RIBEIRO A.R.; ASSIS M.Z. Susceptibilidade e resistência múltipla a antimicrobianos em amostras de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 3,1999 , Botucatu. *Anais...* Botucatu - SP: FMVZ/UNESP, 1999. p.170.

\_\_\_\_\_, COSTA E.O., LEITE, D.S.; LANGONI H., GARINO JÚNIOR, F.; VICTÓRIA, C.; LISTONI, F.J.P. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. Belo Horizonte, v. 58, n. 5, 2006.

RIBEIRO, L.C.; PÉREZ, J.R.O.; CARVALHO, P.H.A.; SILVA, F.F.; MUNIZ, J.A.; OLIVEIRA JÚNIOR, G.M.; SOUZA, N.V. Produção, composição e rendimento em queijo do leite de ovelhas Santa Inês tratadas com ocitocina. Revista Brasileira de Zootecnia. Viçosa, v. 36, n. 2., p. 438-444, 2007.

SANDHOLM, M.; PYÖRÄLÄ, S. Coliform mastitis. In: SANDHOLM, M.; MONHAKEN-BUZALSKI, T.; KAARTINEN, L.; PYÖRÄLÄ, S. **The Bovine Udder and Mastitis**. Helsinki, University of Helsinki, p. 149-160, 1995.

SANTOS, R. A. Aspectos clínicos e das características físico-químicas do leite em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. 2004. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal rural de Pernambuco, Recife, 2004.

SANTOS, R. A.; MENDONÇA, C.L.; AFONSO, J.A.B.; SIMÃO, L.C.V. Aspectos clínicos e das características físico-químicas do leite em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro, v. 27, n. 1, p. 6-12, 2007.

SARATSI, Ph.; ALEXOPOULOS, C.; TZORA, A.; FTHENAKIS, G.C. The effect of experimentally induced subclinical mastitis on the milk yield of dairy ewes. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.32, n. 3, p.205-209, 1999.

SCHALM, O.W. Pathologic changes in the milk and udder of cows with mastitis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.170, n.10, p.1137-1140, 1977.



SCHALM, O.W.; CARROLL, E. J.; JAIN, N.C. **Bovine mastitis**. Philadelphia: Lea e Febiger. 1971. 360p.

SCHALM, O.W.; Noorlander D.O. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.130, p.199-204, 1957.

SCHULTZ, L.H. Somatic cells in milk – physiological aspects and relationship to amount and composition of milk. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 40, n. 2, p. 125-131, 1997.

\_\_\_\_\_. Somatic cell counting of milk in production testing programs as a mastitis control technique. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.170, n. 10, p.1244-6, 1977.

**SEARS, P. M.; McCARTHY, K. K. Management and treatment of Staphylococcal mastitis.** Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice. **Philadelphia, v.19. n.1. p.171 - 185, 2003. Disponível em**  
<<http://www.vetfood.theclinics.com/article/PIIS0749072002000798/fulltext>>. Acesso em: 20 jul. 2004.

SEVI, A; ANNICCHIARICO, G. Airspace Effects on the Yield and Quality of Ewe Milk. **Journal of Dairy Science**, Stanford, v.84, p.2632-2640, 2001.

SILVA, N. Diagnóstico de mamite em animais de importância econômica. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 3, 1999. Botucatu. *Anais...* Botucatu - SP: FMVZ/UNESP, 1999a. p. 51-55.

SILVA, E. R. **Estudo de algumas fontes de variação do conteúdo celular do leite de cabra.** 1997. 62 f. Tese (Mestrado em ciência veterinária) – Universidade Federal rural de Pernambuco, Recife, 1999b.

\_\_\_\_\_.; ARAÚJO, A.M.; ALVES, F.S.F.; PINHEIRO, R.R.; SAUKAS, T.N. Associação entre *California Mastitis Test* e a Contagem de células Somáticas na avaliação da saúde da glândula mamária caprina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 46-48, 2001.

\_\_\_\_\_.; SIQUEIRA, A. P.; MARTINS, J. C. D.; FERREIRA, W. P. B.; SILVA, N. da. Identification and in vitro antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis in the Northeast of Brazil. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.55, p.45-49, 2004.

SILVEIRA-FILHO, V. M. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in Pernambuco State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 49, n. 4, São Paulo, 2007.

SIMÃO, L. C. V. **Avaliação clínica e hematológica em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *Staphylococcus aureus***. 2004. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal rural de Pernambuco, Recife, 2004.

SMITH, K. L.; HOGAN, J. S. Environmental mastitis. *Large Animal Veterinarian*, v. 47, n. 33, p. 16-19, 1992.

SOUZA, A.C.K.O.; OSÓRIO, M.T.M.; OSÓRIO, J.C.S.; OLIVEIRA, N.M.V.; SOUZA M.; CORREA, G.F. Produção, composição química e características físicas do leite de ovinos da raça Corriedale. *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, v. 11, n. 1, p. 73-77, 2005.

STEFANAKIS, A.; BOSCO, C.; ALEXOPOULOS, C.; SAMARTZI, F. Frequency of subclinical mastitis and observations on somatic cell counts in ewes' milk in northern Greece. *Animal Science*, Penicuik, v. 61, p. 69-76, 1995.

SUAREZ, V.H.; BUSETI, M.R.; MIRANDA, A.O.; CALVINHO, L.F.; BEDOTTI, D.O.; CANAVESIO, V.R. Effect of Infection Status and Parity on Somatic Cell Count and California Mastitis Test in Pampita Dairy Ewes. *Journal of Veterinary Medicine*, Berlin, v. 49, p. 230-234, 2002.

SUBCOMMITTEE on Screening Tests – National Mastitis Council. Direct microscopic somatic cell count in milk. *Journal of Milk and Food Technology*, Ames, v.31, p.350-54, 1968.

TAMBIC, A.; POWER, E. G. M.; TAMBIC, T.; SNUR, I.; FRENCH, G. L. Epidemiological analysis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Zagreb Trauma Hospital using a randomly Amplified Polymorphic DNA- typing method. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, p. 3092-3097, 1997.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V. How to Select and Interpret Molecular Strain Typing Methods for Epidemiological Studies of Bacterial Infections: A Review for Healthcare Epidemiologists. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, Thorofare, v.18, p. 426-439, 1997.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R.; GOERING, R.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B.; PERSIN, D. H. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p. 2233-2239, 1995.

TORRES-HERNANDEZ, G.; HOHENBOBEN, W. Genetic and environmental effects on milk production, milk composition and mastitis incidence in crossbreed ewes. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 49, p. 410-417, 1979.

TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 2.ed., Santa Maria:UFSM, 2003, 192p.

VAN BELKUM, A., LEEUWEN, W. VAN; KAUFMANN, M. E.; COOKSON, B.; FOREY, F.; ETIENNE, J.; GOERING, R.; TENOVER, F.; STEWARD, C.; O'BRIEN, F.; GRUBB, W.; TASSIOS, P.; LEGAKIS, N.; MORVAN, A.; EL SOLH, N.; RYCK, R.; STRUELENS, M.; SALMENLINNA, S.; VUOPIO-VARKILA, J.; KOOISTRA, M.; TALENS, A.; WITTE, W.; VERBRUGH, H. Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of *Sma*I macrorestriction fragments: a multicenter study. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, 36:1653-1659, 1998.

VAUTOR, E.; Jay, C.; CHEVALIER, N.; VISOMBLIN, N.; VERNET, G.; PÉPIN, M. Characterization of 26 isolates of *Staphylococcus aureus*, predominantly from dairy sheep, using four different techniques of molecular epidemiology. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 4, p. 363-368, 2005.

VAZ, A. K. Células Somáticas e outros mecanismos de defesa da glândula mamária. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 2007, Botucatu. **Anais...** Botucatu - SP: FMVZ/UNESP. 2007. p.38-44.

VAZ, A. K. Mastite em ovinos. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v.16, n.93, p.75-78, 1996.

VAZ, A. K.. Some aspects of the immunity to *Pasteurella mastitis* in sheep. 1994. 00p. Tese (Doutorado), University of London, 1994.

VIANNI, M. C. E. Influência de agentes etiológicos **da Mastite Subclínica Bovina sobre sua influência sobre as características físico-químicas do leite**. 1986. 113 f. Tese (Tese em Ciência Veterinária) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 1986.

VIANNI, M. C. E.; NADER FILHO, A. Variação das características físico-químicas e celulares do leite de vacas com mastite subclínica. **Ciência Veterinária**, Jaboticabal, v. 4, n. 1, p. 8-9, 1990.

VIANNI, M. C. E. **Etiologia das Mastites Subclínicas Bubalinas e sua influência sobre as características do leite**. 1997. 162 f. Tese (Tese em Ciência Veterinária) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 1997.

VIEIRA, S. **Introdução à bioestatística**. Piracicaba: Campus. 1980. 120p.

VIEIRA-DA-MOTA, O.; FOLLY, M. M.; SAKYIAMA, C. C. H. Detection of different *S.aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis, using PCR and routine techniques. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, p. 27-31, 2001.

WATKINS, G.H.; BURRIEL, A.R.; JONES, J.E. A field investigation of subclinical mastitis in sheep in southern England. **British Veterinary Journal**, London, v.147, p.413-420, 1991.

WATSON, D.J.; BUSWELL, J.F. Modern aspects of sheep mastitis. **British Veterinary Journal**, London, v.140, n.6, p.529-534, 1984.

WINTER, A. Mastitis in ewes. **In practice**, London, n.3, p.160-163, 2001.

WINTER, P.; COLDITZ, I.G. Immunological response of the lactating ovine udder follow experimental challenge with *Staphylococcus epidermidis*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 89, n. 12, p. 57-65, 2002.

WINTER, P.; SCHILCHER, F.; BAGO, Z.; SCHODER, D.; EGERBACHER, M.; BAUMGARTNER, W.; WAGNER, M. Clinical and histopathological aspects of naturally occurring mastitis caused by *Listeria monocytogenes* in cattle and ewes. **Journal of Veterinary Medicine Series B - Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, Boston, v. 5. n. 4. p. 176-179, 2004.

ZAFALON, L.F.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L.A.; OLIVEIRA, J.V.; RESENDE, F.D. Alterações da composição e da produção de leite oriundo de quartos mamários de vacas com e se mastite subclínica de acordo com o estágio e o número de lactações. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v. 72, n.4, p. 419-426 , 2005.

ZENG, S.S.; ESCOBAR, E.N.; Popham, T. Daily variations in somatic cell count, composition, and production of Alpine goat milk. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 26, p. 253-260, 1997.