

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Identificação bacteriana a campo da mastite bovina
para orientar protocolos de tratamento**

Ana Carolina de Oliveira Rodrigues

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Agronomia. Área de concentração:
Ciência Animal e Pastagens**

**Piracicaba
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ana Carolina de Oliveira Rodrigues
Médica Veterinária

Identificação bacteriana a campo da mastite bovina
para orientar protocolos de tratamento

Orientador:
Prof. Dr. **PAULO FERNANDO
MACHADO**

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Agronomia. Área de concentração:
Ciência Animal e Pastagens**

Piracicaba
2008

Ao meu marido e minha família com
eterna satisfação.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas

Não conseguiria listar de forma fiel todos aqueles que contribuíram para realização desse trabalho. Fica aqui minha imensa gratidão a todas as mentes brilhantes que me conduziram durante esses três anos e meio.

Aos produtores

Agradeço especialmente aos produtores de leite da região sudoeste do Estado do Paraná pela colaboração e confiança.

Às instituições

Meu muito obrigado a FAPESP, Madasa, Intervet e Schering-Plough pelo suporte financeiro. A parceria empresa-universidade foi registrada na execução desse trabalho. Reconheço também o amparo do laboratório Clínica do Leite/ESALQ/USP, que me acolheu no retorno ao Brasil para desenvolvimento do doutorado, e do laboratório de Milk Quality/University of Wisconsin-Madison, que sempre tem me recebido para o incremento de minhas pesquisas.

You cannot hope to build a better world without improving the individuals. To that end each of us must work for his own improvement, and, at the same time, share a general responsibility for all humanity; being our particular duty to aid those to whom we think we can be most useful.

Marie Curie (1867-1934)

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO | 7 |
| ABSTRACT | 8 |
| LISTA DE FIGURAS | 9 |
| LISTA DE TABELAS | 11 |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | 12 |
| LISTA DE SÍMBOLOS | 13 |
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 DESENVOLVIMENTO..... | 18 |
| 2.1 Revisão bibliográfica..... | 18 |
| 2.1.1 Testes rápidos para determinação da contagem de células somáticas..... | 18 |
| 2.1.2 Bactérias que causam mastite, tratamento e cura | 20 |
| 2.1.3 Métodos práticos de identificação bacteriológica | 24 |
| 2.2 Material e Métodos | 26 |
| 2.2.1 Somaticell | 26 |
| 2.2.1.1 Amostras frescas..... | 26 |
| 2.2.1.2 Eficiência..... | 28 |
| 2.2.1.3 Amostras conservadas | 31 |
| 2.2.2 Cultura e tratamento da mastite clínica | 32 |
| 2.2.2.1 População | 32 |
| 2.2.2.2 Mastite clínica | 34 |
| 2.2.2.3 Cultura | 35 |
| 2.2.2.4 Protocolo tratamento..... | 37 |
| 2.2.2.5 Definições e estatística | 40 |
| 2.3 Resultados e Discussão..... | 42 |
| 2.3.1 Somaticell | 42 |
| 2.3.1.1 Amostras frescas..... | 42 |
| 2.3.1.2 Eficiência | 43 |
| 2.3.1.3 Amostras conservadas | 49 |
| 2.3.2 Cultura e tratamento da mastite clínica | 51 |
| 2.3.2.1 População | 51 |
| 2.3.2.2 Mastite clínica | 54 |
| 2.3.2.3 Meios de cultura | 61 |
| 2.3.2.4 Tratamento..... | 73 |
| 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 80 |
| REFERÊNCIAS | 82 |
| APÊNDICE | 89 |
| ANEXO | 91 |

RESUMO

A presente tese estudou o diagnóstico e tratamento da mastite bovina pela avaliação do uso de um teste prático de CCS, pela utilização de cultura bacteriológica a campo e pela definição de protocolos de tratamento. Para rápida determinação da CCS, o teste Somaticell[®] foi usado em amostras de leite tendo o resultado comparado à contagem eletrônica e avaliado por tipo de amostra e pessoa. O Somaticell determinou corretamente a CCS de amostras frescas de leite de quartos mamários. A correlação registrada entre o Somaticell e a CCS eletrônica foi 0,92 e o coeficiente de concordância 0,82. O teste mostrou adequada validade para determinar infecções intramamárias (sensibilidade 91,3%; especificidade 96,0%) e apresentou contagens mais elevadas em amostras contendo patógenos. Pequena variação foi verificada nos resultados do teste quando realizado em duplicata. Entretanto na análise geral dos dados, a variação observada não foi significativa nem afetou a quantidade de amostras com mastite subclínica. Amostras de leite conservadas a 4 °C por até 5 horas não influenciaram os resultados do Somaticell, mas amostras congeladas ou adicionadas do conservante bronopol não devem ser usadas. Quanto ao diagnóstico da mastite clínica, as infecções causadas por bactérias Gram positivas foram em maioria isoladas de casos clínicos com alteração visual do leite e edema de úbere, de vacas reincidentes e com CCS mensal média maior de 200.000 céls/mL. Por outro lado, as mastites causadas por bactérias Gram negativas apresentaram em maioria casos clínicos com comprometimento sistêmico em vacas de alta produção. Enquanto isso, as amostras mastíticas com ausência de crescimento na cultura laboratorial apresentaram grau da mastite e perfil do animal variado. A cultura bacteriológica realizada na propriedade leiteira com o conjunto dos meios Sangue Base Azida, MacConkey e Vogel-Johnson, mostrou adequada recuperação dos patógenos causadores de mastite clínica. Do total de 203 cultivos realizados na fazenda e em laboratório 79,3% mostraram concordância. A taxa de concordância das culturas foi afetada pelo número de unidades formadoras de colônia presente na amostra de leite. A sensibilidade e especificidade registradas para a cultura a campo foram 83,0 e 76,5%, respectivamente, as quais foram positivamente influenciadas pelo isolamento de bactérias Gram positivas, e negativamente pelo isolamento de bactérias Gram negativas e resultados com ausência de crescimento. O cultivo feito na fazenda mostrou vantagens em usar amostras de leite frescas, porém a leitura precoce do crescimento bacteriano e a metodologia simples reduzem sua acurácia. Para o tratamento das mastites clínicas com base no resultado da cultura a campo, foi encontrada taxa geral de cura bacteriológica de 69,7%. A CCS da maioria dos tetos que apresentaram mastite se manteve elevada até 21 dias pós-detecção da doença. Mastites causadas por bactérias Gram negativas mostraram taxas de cura mais altas. Já as mastites causadas por *Staphylococcus aureus* tiveram as menores taxas de cura apesar da utilização de tratamento antibiótico estendido. As mastites de grau 1 e 2, com isolamento de bactérias Gram negativas e ausência de crescimento na cultura bacteriológica, não apresentaram diferença em cura sendo ou não tratadas com antibiótico intramamário.

Palavras-chave: Leite; Contagem de células somáticas; Bactéria; Cultura bacteriológica; Terapia

ABSTRACT

The present thesis investigated the diagnosis and treatment of bovine mastitis by using a simple test for somatic cell count, on-farm bacteriological culture and guided treatment protocols. To rapidly determine SCC, Somaticell[®] test was used on milk samples having the results compared to electronic count and evaluated by sample type and reader. The Somaticell test correctly determined the SCC in fresh milk samples of mammary quarters. The correlation between Somaticell and electronic SCC was 0.92, being kappa coefficient equals to 0.82. This test presented good reliability to determine intramammary infections using a threshold of 205.000 cells/mL (sensitivity = 91.3% and specificity = 96.0%) and showed greater SCC in samples containing major mastitis pathogens. Minor intra-individual variation was detected when performing the test. Probably, the homogenization procedure of the test is the most likely explanation for the observed variation. However, the final analysis indicated that this variation was not significant and did not affect the amount of samples classified as having subclinical mastitis. Milk samples preserved at 4 °C up to 5 hours did not change test results. Nevertheless, frozen or bronopol preserved samples were not suitable for this test. Clinical mastitis data indicated that infections caused by Gram positive bacteria were mainly seen on clinical cases with visual milk abnormalities and udder edema of clinical recurrent animals showing monthly average SCC greater than 200,000 cells/mL. In contrast, clinical mastitis caused by Gram negative bacteria was frequently associated with systemic signs in high producing cows. In addition, mastitic samples without bacterial growth in the laboratory did not present a defined pattern in relation to mastitis grade and animal characteristic. The on-farm bacteriological culture using Azide Blood Agar Base, MacConkey Agar and Vogel-Johnson Agar, showed adequate recovery of mastitis causing pathogens. In 79.3% of the cultures (n = 203) the on-farm results agreed with the standard laboratory culture. Interestingly, the concordance rate was affected by the number of colony forming units in the milk sample. The sensitivity and specificity of on-farm culture were 83.0 and 76.5%, respectively. These results were positively influenced by growth of Gram positive bacteria and negatively influenced by growth of Gram negative bacteria and samples with no growth. The use of fresh milk samples in on-farm culture seemed advantageous for bacterial recovery, although premature plate reading of bacterial growth and simplicity of this methodology might reduce its accuracy. Mastitis treatment guided by on-farm culture showed an overall bacteriological cure rate of 69.7%. In the majority of quarters, SCC remained elevated within 21 days after detection of clinical mastitis. Gram negative bacteria presented greater cure rates. On the contrary, *Staphylococcus aureus* mastitis displayed the lowest cure rate even by using extended antibiotic treatment. Intramammary antibiotic treatment did not show effect on cure rates of grade 1 and 2 clinical mastitis caused by Gram negative bacteria or with negative growth in the on-farm culture.

Keywords: Milk; Somatic cell count; Bacteria; Bacteriological culture; Therapy

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Procedimentos de realização do teste Somaticell. A ordem numérica crescente indica a sequência de realização do teste | 27 |
| Figura 2 - Intervalo dos valores de CCS do teste Somaticell | 30 |
| Figura 3 - Esquema simplificado do cálculo da validade de um teste em relação à presença da doença. Adaptado de GORDIS, 2004..... | 31 |
| Figura 4 - Município das propriedades do Estado do Paraná que participaram do projeto..... | 33 |
| Figura 5 - Utensílios usados na fazenda. A: Kit de coleta das amostras de leite. B: Material para cultura a campo. C: Teste Somaticell | 36 |
| Figura 6 - Equipamentos utilizados para realizar a cultura na fazenda. A: Placas de cultura e amostras de leite armazenadas na geladeira. B: Estufa bacteriológica. C: Estrutura do laboratório..... | 36 |
| Figura 7 - Comparação entre os resultados do teste Somaticell realizado com amostras de leite frescas e amostras conservadas a 4 °C por 5 horas..... | 43 |
| Figura 8 - Comparação entre os resultados de CCS do teste Somaticell e do equipamento Fossomatic | 44 |
| Figura 9 - Porcentagem dos resultados do teste Somaticell por pessoa e réplica classificados pela presença de infecção intramamária..... | 49 |
| Figura 10 - Comparação entre os resultados do teste Somaticell realizado com amostras de leite frescas e amostras conservadas..... | 50 |
| Figura 11 - Resultado da cultura laboratorial conforme o grau da mastite clínica..... | 58 |
| Figura 12 - Cultura a campo em Agar Sangue Base Azida. A: Crescimento positivo nas duas metades da placa. B: Crescimento negativo à esquerda e positivo à direita | 64 |
| Figura 13 - Cultura a campo em Agar Sangue Base Azida. Hemólises do tipo β e α | 64 |
| Figura 14 - Cultura a campo em Agar MacConkey. A: Crescimento positivo de colônias lac+ nas duas metades da placa. B: Crescimento positivo de colônias lac- à esquerda e negativo à direita..... | 64 |
| Figura 15 - Cultura a campo em Agar Vogel-Johnson. A: Crescimento negativo à esquerda e positivo tipo <i>S. aureus</i> à direita. B: Crescimento negativo à esquerda e positivo tipo <i>S. aureus</i> à direita | 65 |

- Figura 16 - Cultura a campo em Agar Vogel-Johnson. A: Crescimento negativo à esquerda e positivo não *S. aureus* à direita. B: Crescimento positivo não *S. aureus* nas duas metades da placa..... 65
- Figura 17 - Cultura a campo em Agar Vogel-Johnson. A: Crescimento típico de *S. aureus* (colônias de 2-3 mm, negras, brilhantes, circundadas por zona amarelo-ouro). B: Crescimento de colônias grandes, negras, brilhantes, circundadas por zona amarela clara 65
- Figura 18 - Relação entre a concordância das culturas bacteriológicas e a unidade formadora de colônia da amostra de leite 72
- Figura 19 - Relação de cura bacteriológicas e redução da CCS com reincidência clínica da mastite durante a lactação. 78

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Resultado da cultura microbiológica das amostras de leite..... | 46 |
| Tabela 2 - Relação dos resultados do teste Somaticell quando realizado em duplicata por pessoa | 48 |
| Tabela 3 - Características gerais e índices zootécnicos do conjunto das propriedades que participaram do projeto..... | 52 |
| Tabela 4 - Características e manejo relacionados à qualidade do leite do conjunto das propriedades que participaram do projeto | 53 |
| Tabela 5 - Resultado da cultura laboratorial dos casos de mastite clínica por grupo..... | 57 |
| Tabela 6 - Resultado da cultura realizada na fazenda conforme as combinações de crescimento bacteriano encontradas nos meios | 62 |
| Tabela 7 - Distribuição dos resultados das culturas bacteriológicas | 66 |
| Tabela 8 - Testes para determinar a validade da cultura bacteriológica realizada na fazenda | 69 |
| Tabela 9 - Distribuição dos resultados de mastite clínica por cultura, tratamento e cura | 74 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------|--|
| CAMP | teste do fator de Christie-Atkins-Munch-Peterson |
| CCS | contagem de células somáticas |
| CMT | California Mastitis Test |
| EPM | erro padrão da média |
| IM | intramuscular |
| IMM | intramamário |
| kg | kilograma |
| lac | lactose |
| logCCS | contagem de células somáticas convertida ao logaritmo na base 10 |
| mL | mililitro |
| mm | milímetro |
| n | número de unidades experimentais |
| OR | odds ratio |
| <i>P</i> | nível de significância |
| r | coeficiente de correlação |
| SAS | Statistical Analysis System |
| T | distribuição <i>t</i> de Student |
| ufc | unidade formadora de colônia |
| μL | microlitro |
| °C | grau Celsius |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|---|------------------|
| ® | marca registrada |
| % | porcentagem |
| β | letra grega beta |
| α | letra grega alfa |

1 INTRODUÇÃO

A mastite, inflamação da glândula mamária

inflamatório subclínico permanece por muito tempo nessa forma, às vezes sem nunca evoluir para a forma clínica, e também em outros casos a mastite subclínica pode apresentar cura antes de chegar a exibir sinais clínicos. Assim, o constante monitoramento da mastite, tanto da forma clínica como da subclínica, ajuda a melhor entender a evolução da doença e obter conclusões sobre as decisões tomadas em relação ao controle da mastite.

Pelo fato da mastite clínica ser facilmente detectada na propriedade leiteira há interesse em testes práticos para identificação da mastite subclínica. Os testes usados para esse fim, na maioria utilizam métodos indiretos para estimar a mastite subclínica e são baseados na reação das células somáticas com soluções reagentes. Os resultados desses testes são classificados em escores conforme a intensidade da reação formada. Dessa forma, são denominados testes qualitativos e costumam apresentar grande variação do nível de células somáticas por classe de escore. O teste mais conhecido e usado para diagnóstico a campo da mastite subclínica é o California Mastitis Test. A possibilidade de ter a disposição um teste prático e barato como o CMT, para ser usado na propriedade leiteira, mas que forneça valores numéricos da quantidade de células somáticas presente na amostra, seria vantajosa para eliminar a variação das classes de resultado. Conforme a eficácia desse teste ele poderia até ser usado em experimentos científicos como método quantitativo para determinação da CCS a campo.

Apesar de existirem vários métodos para a identificação da mastite, a cultura microbiológica da amostra de leite é considerada a análise padrão para definir a presença de infecção intramamária. A cultura pode distinguir o tipo de patógeno que está causando a mastite. Na maioria das vezes a mastite é causada por bactérias que apresentam diferentes características de virulência. O perfil das bactérias interfere não somente no desenvolvimento da infecção como no sucesso do tratamento. Rotineiramente, a cultura é realizada em laboratório e o resultado das análises fica pronto entre três e cinco dias. Além disso, também é preciso computar o período de envio da amostra ao laboratório, visto que a maior parte das propriedades leiteiras não se encontra próxima a centros de diagnóstico. Dessa forma, para a mastite clínica dificilmente o resultado da cultura microbiológica será usado para tratar o caso em si, pois quando o resultado retorna à fazenda o animal já foi tratado. Conforme as práticas convencionais de manejo, logo após a detecção da mastite clínica o animal recebe tratamento de acordo com os medicamentos utilizados na fazenda. Infelizmente nessa situação as decisões de tratamento costumam ter como base experiências e opiniões pessoais em vez de dados científicos e protocolos previamente

definidos. Adicionalmente, o uso de antibiótico de maneira indiscriminada para o tratamento da mastite pode levar à resistência bacteriana e presença de resíduos de antibiótico no leite.

Uma alternativa para associar o resultado da cultura microbiológica ao tratamento da mastite clínica seria realizar a cultura do leite mastítico na propriedade assim que o caso fosse detectado. A cultura realizada na fazenda precisa apresentar manuseio prático e resultado rápido para justificar sua utilização. O uso de meios de cultura seletivos e/ou indicativos para determinado grupo de bactérias e/ou espécie bacteriana é uma opção para facilitar a identificação dos patógenos da mastite. Por exemplo, os meios de cultura que diferenciam o crescimento de bactérias Gram positivas e Gram negativas tornam-se uma escolha interessante, já que a classificação de Gram também apresenta certa relação com a evolução da mastite que auxilia no direcionamento do tratamento.

Convencionalmente, as mastites causadas por patógenos Gram positivos exibem longa ou variada duração e sinais clínicos moderados, que na maioria das vezes necessitam do emprego de tratamento antimicrobiano intramamário para o estabelecimento da cura. Por outro lado, as infecções intramamárias provocadas por patógenos Gram negativos apresentam curta duração e sinais clínicos acentuados, que tendem a ser resolvidas com êxito pela manutenção do bom estado físico do animal. Portanto, o uso de metodologia prática e rápida para identificação do grupo de patógenos causador da mastite ajudaria a adequar o tratamento ao caso. Os protocolos de tratamento seriam formulados a partir da associação entre o resultado da cultura, o estado clínico do animal, o histórico do animal em relação à doença e a eficácia dos medicamentos. Além de estabelecer protocolos mais dirigidos e possivelmente alcançar prognósticos melhores, também há a vantagem de restringir o uso de antibióticos intramamários proporcionando a diminuição dos gastos com tratamento, dos prejuízos oriundos do descarte de leite e dos riscos de resíduos de antibiótico no leite.

1.1 Hipóteses

As principais hipóteses do presente trabalho são: 1) o teste rápido para determinação da CCS do leite, denominado Somaticell, apresenta correlação adequada em relação à contagem eletrônica de células somáticas; 2) os sintomas da mastite clínica são relacionados ao microrganismo que causa a infecção; 3) a cultura bacteriológica realizada na propriedade leiteira exhibe resultados similares à cultura laboratorial padrão; 4) o tratamento da mastite clínica orientado pela cultura bacteriológica pode resultar em melhores taxas de cura e, possivelmente, reduzir o uso de antibiótico.

1.2 Objetivos

Determinar um período de tempo para a realização do teste de CCS-Somaticell utilizando amostras frescas de leite, avaliar a eficiência do teste em definir a CCS no leite de vacas em lactação e verificar os resultados do teste com amostras de leite conservadas.

Estudar as características da mastite clínica em relação ao patógeno, comparar os resultados da cultura bacteriológica realizada na fazenda e em laboratório, estabelecer um protocolo de tratamento orientado pela cultura e avaliar o prognóstico de tal protocolo.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

Métodos de identificação rápidos e acurados das infecções intramamárias são úteis para o controle da mastite. Vários métodos têm sido usados para esse fim, as metodologias mais tradicionais como a cultura microbiológica e a determinação da CCS por equipamento eletrônico requerem o envio da amostra de leite para um laboratório. Essas análises acabaram se distanciando da propriedade leiteira e recebendo críticas por serem lentas para fornecer suporte às decisões diárias de manejo. Para reverter essa situação, métodos indiretos de identificação da mastite foram desenvolvidos para aplicação a campo. O California Mastitis Test pode ser considerado um dos primeiros métodos indiretos para determinação da CCS, que continua a ser usado nas fazendas de leite até o presente. Entretanto, novos testes portáteis têm sido lançados que são capazes de estimar os níveis de CCS com maior precisão. Além disso, recentemente o uso de cultura bacteriológica a campo, para orientar protocolos de tratamento da mastite clínica, foi descrito. A cultura microbiológica da amostra de leite mastítico é frequentemente considerada o padrão ouro para definição de infecção intramamária. Porém, para o produtor de leite a cultura dos casos clínicos de mastite tem a utilidade diminuída, devido ao tempo gasto entre o envio das amostras ao laboratório e o retorno dos resultados à propriedade.

2.1.1 Testes rápidos para determinação da contagem de células somáticas

Conforme suposições, cada glândula mamária de uma vaca em lactação sofre vários processos subclínicos, principalmente, após os períodos de ordenha quando bactérias podem ter acesso ao interior da glândula (HARMON, 1994). Nesses casos, a população de células somáticas que normalmente reside na glândula mamária tenta suprimir a infecção e, também, atrai novas células para o interior da glândula. De acordo com a virulência do agente infeccioso e o grau da inflamação, é possível que a CCS tenha um aumento pequeno e a glândula mamária consiga resolver essa infecção temporária sem o desenvolvimento de sinais clínicos da doença.

O interesse em monitorar a CCS em nível de rebanho e dos animais individualmente mostra necessidades distintas. A determinação da CCS no leite do tanque de expansão é vinculada, principalmente, à idéia de qualidade do leite em termos de consumo e processamento. Já a análise do leite dos animais faz parte do controle da mastite em termos de prevalência da

doença subclínica, evolução das infecções novas e crônicas, e estimativas de perda da produção de leite.

A quantidade de células somáticas presente em uma amostra de leite pode ser medida por testes diretos e indiretos. Os métodos diretos, em geral, utilizam corantes que tingem as células somáticas as deixando diferenciadas para contagem de cada célula em si ou de estruturas celulares. Prescott e Breed (1910) padronizaram a técnica de contagem das células em microscópio que ainda hoje é usada como método de referência. Para análises em larga escala, equipamentos eletrônicos que contam as células por citometria de fluxo foram desenvolvidos e têm sido usados mundialmente em testes de rotina e pesquisa. Apesar desses métodos diretos apresentarem alta precisão nas contagens, eles são compostos por técnicas mais complexas que necessitam de um profissional treinado e despendem maior custo. Dessa forma, os métodos indiretos despertam o interesse da indústria leiteira pela praticidade de uso, rapidez do resultado e baixo custo.

Vários testes indiretos já foram criados e testados (READ JR. et al., 1969), os mais conhecidos são: California Mastitis Test, Wisconsin Mastitis Test, e Modified Whiteside Test. As reações produzidas nesses testes envolvem as células somáticas e são classificadas em escores conforme a intensidade. Os problemas encontrados na metodologia desses testes estão relacionados à: classificação visual da intensidade da reação formada que pode ser subjetiva, alta variabilidade da CCS por classe de resultado do teste, e falta de precisão em detectar variações da CCS próximas a pontos de corte baixos que gera maior taxa de resultados falsos positivos. Para solucionar esses problemas testes indiretos que geram um valor numérico à CCS e testes diretos portáteis foram desenvolvidos.

O teste Somaticell[®] (Madasa, São Paulo, Brasil) e o PortaSCC[®] (PortaScience, Portland, USA) são testes qualitativos em essência mas possuem uma conversão para valores quantitativos. O Somaticell é uma versão modificada do Wisconsin Mastitis Test (THOMPSON; POSTLE 1964), no qual 2 mL de reagente e 2 mL de leite são misturados em um tubo plástico, que possui uma tampa com um orifício calibrado para escoamento da solução formada. Após passar o tempo de escoamento, o tubo é colocado de cabeça para cima e a leitura da CCS é feita pela escala marcada na parede do tubo. O Somaticell leva três minutos para ser realizado e possui uma faixa de resultado de 69.000 a 1.970.000 céls/mL. O PortaSCC foi adaptado de um produto usado para monitorar a contagem de leucócitos em pacientes com câncer. O teste consiste em uma fita

absorvente que é inoculada com uma gota de reagente e uma de leite, e incubada à temperatura ambiente por alguns minutos. Após a incubação, a fita é lida em um leitor portátil que converte a intensidade da cor formada pela reação em um valor numérico. O PortaSCC leva 45 minutos para ser realizado e possui uma faixa de resultado de 1.000 a 3.500.000 céls/mL.

Os testes diretos portáteis comercializados atualmente são o DCC[®] (Direct Cell Counter, DeLaval) e o C-reader system[®] (Digital Bio Technology Co., Seoul, Korea). Ambos os testes são constituídos por um leitor óptico de células, que funciona à bateria, e faz a leitura das células coradas em uma placa acrílica descartável. O DCC necessita de 10 µL de leite, leva um minuto para ser realizado e possui uma faixa de resultado de 10.000 a 4.000.000 céls/mL. O C-reader system necessita de 20 µL de leite, leva um minuto para ser realizado e possui uma faixa de resultado de 50.000 a 4.000.000 céls/mL.

2.1.2 Bactérias que causam mastite, tratamento e cura

Staphylococcus aureus

A infecção por *S. aureus* tem principalmente caráter subclínico e crônico. Essa espécie bacteriana tende a induzir uma resposta imune mais branda com limitada expressão de citocinas, que contribui para sua habilidade de estabelecer infecções intramamárias crônicas (BANNERMAN et al. 2004). Além disso, o *S. aureus* possui grande capacidade de invasão, que permite sua instalação em partes profundas da glândula mamária (HENSEN et al., 2000). Muitas vezes há formação de tecido fibroso no foco da infecção, que acaba protegendo a bactéria contra a ação dos antimicrobianos. Conforme Benites et al. (2002), as infecções intramamárias causadas por Estafilococos Coagulase Positivo foram associadas à resposta inflamatória crônica em 42,9% dos casos, à resposta inflamatória crônica e processo de reparação em 35,7%, à resposta inflamatória aguda e processo de reparação em 14,3%, e somente processo de reparação em 7,1%. Por esses motivos a taxa de cura durante a lactação tende a ser bastante reduzida.

Fatores relacionados às características do indivíduo, da infecção e do tratamento têm grande influência na taxa de cura (BARKEMA et al., 2006). Em relação ao animal, as taxas de cura tendem a diminuir conforme aumenta a idade da vaca, a CCS e o número de quartos mamários infectados por vaca. A respeito da infecção, infecções antigas, causadas por cepas resistentes à penicilina e que apresentam maior quantidade de ufc da bactéria em cultivo levam a taxas de cura reduzidas. O fator mais importante sobre o tratamento para aumentar cura é a

duração. Tratamentos de maior duração foram associados com maiores chances de cura, porém é necessário avaliar os custos e retornos econômicos de tal tratamento para justificar seu uso. Assim, para maximizar cura utilizando informações coletadas no rebanho, o tratamento durante a lactação deveria ser realizado em animais jovens com infecção recente tendo apenas um quarto afetado.

Streptococcus agalactiae

A infecção por *S. agalactiae* frequentemente se apresenta na forma subclínica com acentuado aumento da contagem de células somáticas. Entretanto, a infecção causada por essa bactéria apresenta boa resposta ao tratamento antibiótico intramamário durante a lactação. Em uma comparação entre a eficácia do tratamento antibiótico e o não tratamento da mastite clínica, vacas infectadas por *S. agalactiae* apresentaram maior taxa de cura quando tratadas, do que vacas infectadas por outros tipos de patógeno (WILSON et al., 1999).

Vacas com mastite por *S. agalactiae* desempenham o papel de reservatório da bactéria no rebanho e a ordenha é considerada o momento de maior transmissão da bactéria. Essa espécie bacteriana reside somente no úbere de vacas infectadas e elimina elevado número de bactérias no leite, podendo influenciar a contagem bacteriana total do leite do tanque. (SANTOS; FONSECA, 2007)

Devido ao estreito habitat do *S. agalactiae* e a maior taxa de cura seguida de tratamento, algumas fazendas escolhem por erradicar o patógeno do rebanho. O programa de controle de *S. agalactiae* é baseado em cultura microbiológica e tratamento antibiótico de todos os quartos infectados pelo patógeno. Vacas não responsivas a segunda fase de tratamento devem ser separadas do rebanho ou descartadas. Em um estudo com 12 rebanhos positivos para *S. agalactiae*, após 30 dias de controle do patógeno, a prevalência média de infecção teve uma redução de 41,6% para 9,3% (ERSKINE; EBERHART, 1990).

Estafilococos coagulase negativa

Esse grupo de bactérias vive na pele do teto e podem infectar a glândula mamária. As infecções causadas por Estafilococos coagulase negativa desenvolvem pequeno aumento da contagem de células somáticas. Casos clínicos são frequentemente observados (COSTA et al., 1995) e tanto a taxa de cura espontânea quanto a resposta ao tratamento antibiótico apresentam

respostas positivas. As vacas adultas e as novilhas apresentam alta prevalência de mastite causada por esse tipo de agente após o parto, com rápido declínio dos casos após a segunda semana de lactação. (SANTOS; FONSECA, 2007)

Estreptococos não agalactiae

As infecções causadas por Estreptococos não agalactiae têm natureza variada devido as distintas características de dois constituintes bastante conhecidos desse grupo, *S. uberis* e *S. dysgalactiae*. Diferentes linhagens de *S. uberis* apresentam não somente padrão epidemiológico ambiental como também padrão contagioso. O *S. dysgalactiae* também mostra padrões alternados e o aumento de sua prevalência nos rebanhos leva à necessidade de mais trabalhos sobre essa espécie bacteriana. (SANTOS; FONSECA, 2007)

Na rotina de isolamento microbiológico os *Enterococcus spp.* são muitas vezes classificados como parte do grupo dos Estreptococos ambientais (ou não agalactiae). As bactérias do gênero *Enterococcus spp.* são mais resistentes aos antimicrobianos e a sobreviver em ambientes pouco favoráveis, o que pode afetar a prevalência e a taxa de cura dos Estreptococos. (SANTOS et al., 2007)

Porém, os Estreptococos não agalactiae costumam exibir taxa de cura espontânea em torno de 50%, e os casos clínicos que recebem tratamento intramamário por adequado período de tempo reduzem pela metade a taxa de reincidência. Morin et al. (1998) verificaram que em rebanhos, nos quais a mastite era frequentemente causada por esse grupo de bactérias, a taxa de cura bacteriológica no dia 14 pós-mastite foi significativamente maior quando o antibiótico foi utilizado para o tratamento juntamente com a terapia suporte em vez de somente a terapia suporte.

Bactérias Gram negativas

As bactérias Gram negativas conhecidas como causadoras de mastite clínica são principalmente *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.* (LANGONI et al., 1998). Os casos clínicos desse grupo de bactérias em geral se apresentam de forma aguda. A destruição da bactéria pelo sistema imune causa a exposição de fatores estimulantes da inflamação que desencadeiam os típicos sinais clínicos da infecção (BANNERMAN et al. 2004). A quantidade de estímulo ao

sistema imune determina a severidade da infecção e em cerca de 40% dos casos severos o animal pode apresentar bacteremia (WENZ et al., 2001).

A incidência de patógenos de origem ambiental parece estar diretamente vinculada aos casos clínicos da fazenda. Dois rebanhos da Califórnia com baixas contagens de células somáticas de tanque, que realizavam controle para patógenos contagiosos, apresentaram constante problema de mastite clínica. Coliformes e *Streptococcus nonagalactiae* foram responsáveis por 60% do total de casos de mastite clínica, sendo os coliformes 1,6 vezes mais prevalentes que os *Streptococcus nonagalactiae* (HESS et al., 2003).

Devido às características clínicas da mastite por bactérias Gram negativas o tratamento mais indicado é baseado no auxílio das defesas próprias do animal. Fluidoterapia, anti-inflamatório e antibiótico devem ser utilizados conforme a gravidade do caso clínico.

Outras bactérias

Outra bactéria causadora da mastite que costuma ser isolada de casos clínicos é o *Corynebacterium spp.* (COSTA et al., 1995). O canal do teto parece ser um dos locais principais de ocorrência desse agente, ainda que a infecção possa se localizar na cisterna da glândula. Com relação à patogenicidade, o *Corynebacterium spp.* é considerado um patógeno de significância limitada mostrando casos subclínicos e leves, mas é altamente contagioso o que aumenta sua frequência de isolamento nas mastites. (SANTOS; FONSECA, 2007)

Arcanobacterium pyogenes é conhecido por causar mastites severas com extensa destruição do tecido mamário. Esse microrganismo é encontrado nas membranas mucosas dos animais, mas age como patógeno oportunista causando infecções piogênicas. Nas mastites o *A. pyogenes* apresenta baixa resposta ao tratamento antibiótico.

Em 2003, Hess et al. e Roberson idealizaram a elaboração de protocolos de tratamento para mastite clínica orientados por severidade clínica e cultura bacteriológica. A base de tal procedimento foi fundamentada na idéia de utilizar o tratamento antibiótico nos animais que apresentassem patógenos responsivos, tendo o intuito de melhorar cura bacteriológica e evitar o uso desnecessário de antibiótico. Os autores verificaram que muitas das culturas de casos de mastite clínica leves e moderados apresentavam ausência de crescimento e isolamento de bactérias Gram negativas, e dessa forma não deveriam receber a administração de antibiótico. Por

outro lado, as mastites com isolamentos de bactérias Gram positivas (*S. aureus*, *S. agalactiae*, *Streptococcus nonagalactiae*) deveriam ser tratadas com o uso de antibiótico preferencialmente intramamário. Dessa forma, os pesquisadores notaram que aproximadamente 50% dos casos de mastite (aproximadamente 50%) não se tran

O tempo para realização do teste foi de aproximadamente 5 minutos e não foi necessário o uso de treinamento ou material especializado. Entretanto, esse método possui algumas falhas para a identificação bacteriana. A toluidina azul se liga a partes aniônicas da superfície bacteriana independente da viabilidade da célula assim, os resultados obtidos por esse método possivelmente nem sempre correspondem aos obtidos pela cultura laboratorial padrão. Também a presença de células somáticas, partículas de fibrina e outras substâncias do leite mastítico podem alterar o processo de filtração. E, para detecção bacteriana, esse método precisa de um limite mínimo de 10^6 ufc/mL. Assim, a estratégia descrita pelos autores requer maior aprimoramento para ser utilizada na identificação dos patógenos da mastite clínica.

Outro rápido teste para determinação de bactérias causadoras de mastite foi fabricado por Pharmacia & Upjohn Animal Health (Kalamazoo, USA) com o nome de Hy-Mast[®]. O material para o teste era composto por um frasco plástico com uma tampa acoplada a uma raquete embebida em dois diferentes meios de cultura seletivos. A amostra de leite era coletada assepticamente no frasco de plástico e este era invertido para possibilitar o contato do leite com os dois meios de cultura. Posteriormente, o frasco era incubado por 24 horas a 37 °C. O crescimento bacteriano em um dos lados da raquete indicava a presença de bactérias Gram positivas (*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*) enquanto que o crescimento no outro lado determinava a presença de microorganismos Gram negativos. Estudos comparando a eficiência de Hy-Mast com a cultura laboratorial padrão, demonstraram satisfatórios resultados desse rápido método de identificação bacteriana baseado na classificação de Gram (KRISTULA, 1999; TORRES et al., 2000). Apesar de Hy-Mast demonstrar boa eficácia para ser utilizado como um método de cultivo a campo, sua produção foi encerrada e esse produto já não se encontra disponível no mercado.

O Laboratório de Saúde do Úbere da Universidade de Minnesota desenvolveu um sistema de cultivo bacteriano para amostras de leite baseado em meios de cultura seletivos e indicativos para identificação das bactérias. O método é chamado Minnesota Easy Culture System II e utiliza dois (Bi-plate system) ou três (Tri-plate system) meios de cultura conjugados em uma placa de Petri para classificação de grupos ou gêneros bacterianos. Os meios de cultura que compõem esse sistema de identificação são: Agar Fator para o crescimento de bactérias Gram positivas, Agar MacConkey para o crescimento de bactérias Gram negativas, e Agar MTKT para o crescimento de *Streptococcus spp.* (GODDEN et al., 2007). Após a coleta da amostra de leite mastítico de

maneira asséptica, o leite deve ser inoculado nos meios utilizando um swab estéril seguindo incubação a 37 °C por 24 horas. O crescimento presente nos meios deve ser lido de acordo com um manual do sistema de cultura. O Minnesota Easy Culture System II além de apresentar adequada acurácia (HOCHHALTER et al., 2006; JONES et al., 2006) para ser usado como método de cultivo bacteriano a campo, também tem a vantagem de caracterizar certos gêneros bacterianos, o que facilita a escolha de tratamento para os casos de mastite.

A indústria usualmente utiliza um produto da companhia 3M Microbiology (Saint Paul, USA) para identificação e enumeração de bactérias em amostras de alimentos. O produto nomeado Petrifilm[®] consiste em uma fina placa de meio de cultura seletivo e indicativo para diferentes grupos ou espécies bacterianas. Cada placa de tamanho de 7,5 cm x 10 cm x 0,2 cm possui uma capa de plástico transparente, que deve ser erguida para a inoculação de 1 mL da amostra a ser testada. Após a inoculação da amostra, a placa deve ser incubada por 24 horas a 36 °C. O crescimento bacteriano é notado pela formação de colônias em forma de pontos coloridos na superfície da placa. Estudos mostraram a eficiência do Petrifilm em identificar patógenos causadores da mastite (SILVA et al., 2004; SILVA et al., 2005). O sucesso do uso de Petrifilm para identificação bacteriana, parece estar relacionado à utilização de maior volume de inóculo e de meios de cultura seletivos. As placas de Petrifilm parecem ser uma boa opção para o cultivo bacteriológico a campo. Elas fornecem a vantagem de menor manuseio para a identificação bacteriana, melhor aproveitamento de espaço para incubação e redução dos materiais de descarte.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Somaticell

2.2.1.1 Amostras frescas

Um total de 20 amostras de leite foi coletado de vacas mestiças Holandês-Jersey em lactação, com produção média de 14,2 kg de leite por dia, criadas a pasto em um rebanho composto por 57 animais em lactação com contagem bacteriana total média de 27.000 ufc/mL e CCS média de 416.000 células/mL.

No momento da ordenha, as vacas tiveram os tetos analisados no teste de Tamis, desinfetados com solução de cloro e secos com papel toalha descartável. Após esse procedimento, para cada vaca que não demonstrou reação ao teste de Tamis, o leite de cada teto

foi coletado para realização do teste CMT. Dez tetos que tiveram reação negativa ao CMT e 10 tetos que tiveram reação positiva ao CMT, um teto por vaca, foram ordenhados a mão para coleta de uma amostra de leite de 50 mL em tubo plástico.

Imediatamente após a coleta da amostra, o leite foi utilizado para realização do teste Somaticell. Em resumo, o teste é formado por um tubo plástico de uso único que apresenta uma escala de células somáticas, um canudo agitador, uma tampa de vedação com um furo calibrado e um reagente a base de detergente. Dois mililitros da amostra de leite homogeneizada são adicionados ao tubo, seguindo a adição de 2 mL de reagente. O canudo é usado para agitar a solução durante aproximadamente 20 segundos com 30 movimentos de sobe e desce. A tampa veda o tubo, o qual é colocado de cabeça para baixo por 30 segundos para escoar a solução. O tubo é retornado à posição normal e, após 5 segundos, o líquido remanescente no interior do tubo marca a quantidade corresponde de células somáticas em milhares (Figura 1).

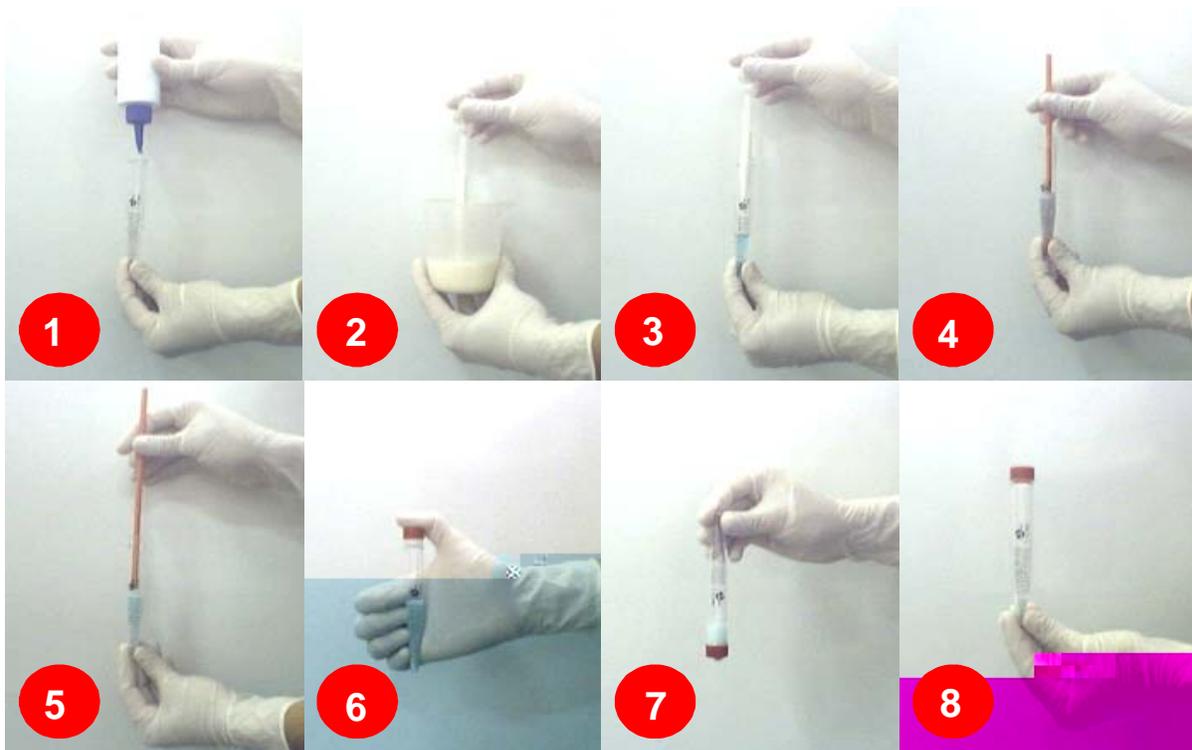


Figura 1 - Procedimentos de realização do teste Somaticell. A ordem numérica crescente indica a sequência de realização do teste

O resultado do teste e a identificação da amostra foram anotados em uma planilha e a amostra foi conservada em caixa térmica com gelo reciclável até a chegada ao laboratório. No laboratório as amostras foram acondicionadas a 4 °C em uma câmara fria de temperatura

controlada por 5 horas. Após esse período, o teste Somaticell foi realizado novamente em cada amostra segundo os procedimentos descritos acima.

Somente uma pessoa foi responsável por efetuar todos os testes Somaticell, para se evitar possíveis interferências nos resultados devido a oscilações na execução do teste principalmente de tempo e homogeneização da solução. O resultado do teste com a amostra na condição fresca foi comparado ao resultado com a amostra na condição conservada pelo teste T pareado. A correlação entre os dois resultados foi determinada pelo teste de Pearson. As análises descritivas e estatísticas foram efetuadas no software SAS 9.1 para Windows (SAS INSTITUTE, 2002-2003) com nível de significância de 5%. Para análise estatística dos dados, os resultados de CCS obtidos no teste Somaticell foram convertidos para o valor logaritmo na base 10.

2.2.1.2 Eficiência

Amostras de leite (n = 325) foram coletadas de um quarto mamário por vaca em dois rebanhos leiteiros de gado Holandês na região de Madison, Wisconsin, EUA. Cada amostra de leite foi coletada de um teto de uma vaca para evitar o efeito de interdependência dos quartos mamários entre os valores de CCS e, assim, simplificar a análise estatística dos dados (BARKEMA et al., 1997a).

Como regra geral, os animais utilizados no estudo não deveriam demonstrar sintomas de doença nem ter recebido tratamento antibiótico dentro dos últimos 15 dias. A coleta de 300 amostras realizada no primeiro rebanho ocorreu de forma aleatória e as outras 25 amostras, coletadas no segundo rebanho, foram selecionadas de vacas com alta CCS, acima de 400.000 céls/mL, no último teste mensal. A coleta das amostras no primeiro rebanho foi realizada em 6 dias, 50 amostras por dia, enquanto que no segundo rebanho foi efetuada em um único dia.

Cerca de 70 mL de leite foram coletados de maneira asséptica de cada teto. A coleta foi realizada em frasco plástico estéril, após a preparação do animal para ordenha e a desinfecção do orifício do teto com algodão embebido em álcool 70%. As amostras de leite foram coletadas pela equipe do laboratório e conservadas em caixa térmica com gelo reciclável até a chegada ao laboratório.

No laboratório cada amostra foi homogeneizada e dividida em três: 15 mL para o teste Somaticell, 45 mL para CCS em equipamento automatizado e 10 mL para cultura microbiológica. O teste Somaticell foi realizado nas amostras de leite segundo os procedimentos descritos na

seção 2.2.1.1 desse trabalho. O tempo entre a coleta da amostra e a realização do teste Somaticell não ultrapassou o limite de 5 horas, tempo estabelecido na seção 2.2.1.1 desse trabalho como inerte ao resultado do teste. Somente uma pessoa foi responsável por efetuar os 325 testes. Adicionalmente, 3 pessoas foram escolhidas para refazer o teste Somaticell em duplicata em 100 amostras de leite coletadas no primeiro rebanho. Para execução do Somaticell foram estabelecidas as seguintes condições: a pessoa deveria ler as instruções do manual do teste para realizá-lo, não foi permitida comunicação entre as três pessoas, as amostras foram fornecidas de forma aleatória sem identificação, o primeiro e segundo teste não foram realizados em sequência e a anotação dos resultados foi feita individualmente.

A contagem eletrônica das células somáticas foi executada por citometria de fluxo pelo equipamento Fossomatic (FOSS NIRSystems Inc., EUA). A cultura microbiológica foi feita em duplicata seguindo os procedimentos estabelecidos pelo National Mastitis Council (2004). Em resumo, 0,01 mL (10 µL) da amostra de leite foi inoculado em meia placa de Agar Sangue de Carneiro a 5% e em meia placa de Agar MacConkey. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. A morfologia e o padrão de hemólise dos crescimentos microbianos foram determinados, e os microrganismos diferenciados utilizando uma série de métodos microbiológicos de rotina (QUINN et al., 1994) iniciada pela coloração de Gram, prova da catalase para cocos Gram positivos e prova da oxidase para bacilos Gram negativos. Em particular, o *Staphylococcus aureus* foi diferenciado dos demais estafilococos pela utilização de manitol e teste de coagulase em tubo. Os Estreptococos e Enterococos foram separados com o uso do teste CAMP, reação em esculina e crescimento em alta concentração de sal. Os microrganismos Gram negativos oxidase negativa foram testados na prova de motilidade, indol, lisina e citrato, e inoculados em Agar Tríplice Açúcar e Ferro para completa diferenciação. Os outros microrganismos foram identificados com base principalmente no perfil de crescimento, morfologia, hemólise e coloração de Gram.

A utilização de cultura microbiológica em duplicata favorece o isolamento microbiano por aumentar a sensibilidade da cultura, mas também pode elevar o número de resultados falsos positivos principalmente causados por microrganismos contaminantes (DINGWELL et al., 2007). Dessa forma, um número mínimo de unidades formadoras de colônias e um limite de microrganismos presentes na cultura foram estabelecidos com base em um guia de grau de confiança para o diagnóstico de infecção intramamárias (NATIONAL MASTITIS COUNCIL,

1987). De forma geral, para se considerar um crescimento microbiológico como positivo, o microrganismo deveria ser isolado nas duas culturas, apresentar unidade formadora de colônia igual ou maior que três e não ser acompanhado pelo crescimento de mais que um outro microrganismo. Culturas contendo crescimento com número igual ou maior que três tipos de colônias heterogêneas foram consideradas contaminadas. Culturas com ausência de crescimento, crescimento inferior a três ufc, ou crescimento em somente uma das culturas foram consideradas negativas. Uma exceção a essa última condição foi usada para o crescimento de microrganismos considerados de maior importância como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e Coliformes. Quando esses microrganismos apresentaram crescimento puro com menos que três unidades formadoras de colônias ou crescimento em somente uma das culturas, foram consideradas positivas.

Para comparação entre os resultados da CCS eletrônica e do teste Somaticell, a contagem eletrônica mínima e máxima foram igualadas ao intervalo de contagem do Somaticell (Figura 2). Assim, toda CCS eletrônica que apresentou valor abaixo de 69.000 céls/mL foi registrada como sendo 69.000 e toda CCS eletrônica que apresentou valor acima de 1.970.000 céls/mL foi registrada como 1.970.000.

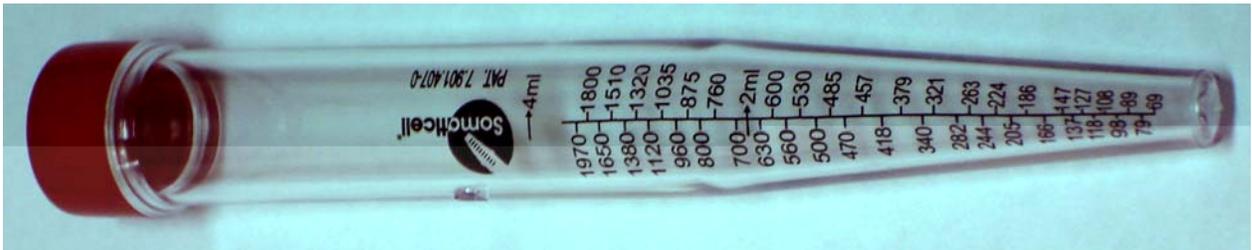


Figura 2 - Intervalo dos valores de CCS do teste Somaticell

Para análise dos dados microbiológicos, as bactérias foram classificadas em patógenos maiores (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli*) e patógenos menores (Estafilococos Coagulase Negativa, *Corynebacterium spp.*, Levedura). Quando a cultura apresentou um microrganismo maior em conjunto com um microrganismo menor, foi classificada como patógeno maior.

A correlação entre os resultados da CCS eletrônica e do teste Somaticell foi determinada pelo teste de Pearson. A CCS eletrônica foi usada como padrão ouro para definir a presença de infecção intramamária utilizando um ponto de corte de 205.000 céls/mL. A partir desse padrão

foi calculada a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do teste Somaticell (Figura 3). O coeficiente kappa de Cohen foi medido para avaliar a concordância real entre os testes na definição de infecção intramamária excluindo a porção da concordância esperada pelo acaso. A relação entre a CCS e a presença de bactérias na amostra de leite foi determinada para os dois testes usando um modelo linear misto. Rebanho foi incluído no modelo estatístico como variável de efeito fixo.

| | | Doença (confirmada por um padrão ouro) | | |
|-------|----------|---|--------------------------------|--|
| | | Presente | Ausente | |
| Teste | Positivo | Verdadeiro positivo (VP) | Falso Positivo (FP) | Valor preditivo positivo $VP/(VP+FP)$ |
| | Negativo | Falso Negativo (FN) | Verdadeiro Negativo (VN) | Valor preditivo negativo $VN/(VN+FN)$ |
| | | Sensibilidade $VP/(VP+FN)$ | Especificidade $VN/(VN+FP)$ | |

Figura 3 - Esquema simplificado do cálculo da validade de um teste em relação à presença da doença. Adaptado de GORDIS, 2004

Para os dados do teste Somaticell realizado por diferentes pessoas, a correlação dos resultados foi determinada para cada pessoa pelo teste de Pearson. O resultado do teste feito pela primeira vez foi comparado ao resultado feito pela segunda vez por meio do teste T pareado e um modelo linear misto foi usado para verificar a relação da CCS com a amostra e a pessoa. A associação entre as pessoas para determinar infecção intramamária, utilizando o valor de 205.000 céls/mL do teste Somaticell, foi calculada pelo teste de Chi-quadrado para cada amostra. As análises descritivas e estatísticas foram efetuadas no software SAS 9.1 para Windows (SAS INSTITUTE, 2002-2003) com nível de significância de 5%. Para análise estatística dos dados, os resultados de CCS foram convertidos para o valor logaritmo na base 10.

2.2.1.3 Amostras conservadas

Um total de 45 amostras de leite foi coletado de 45 vacas em lactação, pertencentes ao mesmo rebanho utilizado na seção 2.2.1.1 desse trabalho. Os mesmos procedimentos e testes foram usados para preparar os tetos para coleta da amostra de leite e para escolher as amostras a serem coletadas. Dessa forma, 15 tetos que tiveram reação negativa ao CMT e 30 tetos que

tiveram reação positiva ao CMT, um teto por vaca, foram ordenhados a mão para coleta de uma amostra de leite de 100 mL em tubo plástico.

Imediatamente após a coleta da amostra, 2 mL de leite foram utilizados para realização do teste Somaticell. O resultado do teste e a identificação da amostra foram anotados em uma planilha e a amostra foi conservada em caixa térmica com gelo reciclável até a chegada ao laboratório. No laboratório 45 mL de cada amostra foram colocados em 2 frascos plásticos, um frasco foi congelado a aproximadamente $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o outro foi adicionado de uma pastilha do conservante bronopol (Broad Spectrum Microtabs II, D&F Control Systems Inc., EUA) e mantido à temperatura ambiente, $21\text{-}23\text{ }^{\circ}\text{C}$. O conservante bronopol foi escolhido por ser estabelecido como o preservativo bactericida de melhor ação para a manutenção das células somáticas para análise (BERTRAND, 1996). As amostras de leite foram armazenadas por 3 dias sob cada um dos métodos de conservação.

Após esse período, as amostras congeladas foram descongeladas à temperatura ambiente e o teste Somaticell foi realizado novamente, segundo os procedimentos descritos na seção 2.2.1.1 desse trabalho, em todas as amostras que haviam sido conservadas. Somente uma pessoa foi responsável por efetuar todos os testes Somaticell.

O resultado do teste com a amostra na condição fresca foi comparado ao resultado com a amostra nas duas condições conservadas pelo teste T pareado. A correlação entre os resultados foi determinada pelo teste de Pearson. As análises descritivas e estatísticas foram efetuadas no software SAS 9.1 para Windows (SAS INSTITUTE, 2002-2003) com nível de significância de 5%. Para análise estatística dos dados, os resultados de CCS obtidos no teste Somaticell foram convertidos para o valor logaritmo na base 10.

2.2.2 Cultura e tratamento da mastite clínica

2.2.2.1 População

Uma propriedade leiteira e dois laticínios, da região sudoeste do Estado do Paraná, foram solicitados a participar de um projeto sobre identificação e tratamento de mastite clínica. A propriedade leiteira, localizada no município de Cascavel, além de possuir um rebanho de aproximadamente 400 vacas em lactação tinha estrutura para servir de local de base para a execução do projeto. Um dos laticínios pertencente ao município de Toledo e o outro ao

município de Céu Azul entraram em contato com os produtores que os forneciam leite para agendar uma reunião de apresentação do projeto. Foram realizadas duas reuniões, uma em cada laticínio, para esclarecer os objetivos e a metodologia do projeto, assim como as responsabilidades de cada parte envolvida. Cerca de 30 produtores participaram da reunião e ficaram livres para escolher sobre a inclusão no projeto.

Em um período de 15 dias, os produtores que tiveram interesse em fazer parte do projeto entraram em contato para agendar uma visita, na qual instruções mais detalhadas sobre a condução do projeto foram explicadas. Além da propriedade de Cascavel, quatro propriedades do município de Toledo e nove localizadas no município de Céu Azul, Matelândia e Vera Cruz do Oeste (Figura 4) foram visitadas. Os produtores foram solicitados a identificar as vacas com mastite clínica, coletar as amostras de leite, anotar as informações do caso de mastite na planilha e tratar as vacas. A pesquisadora deveria treinar os produtores a coletar amostras de leite de maneira asséptica, buscar as amostras coletadas por eles, realizar a cultura na fazenda, indicar o tratamento das vacas, enviar as amostras para o laboratório e fornecer os laudos das culturas.

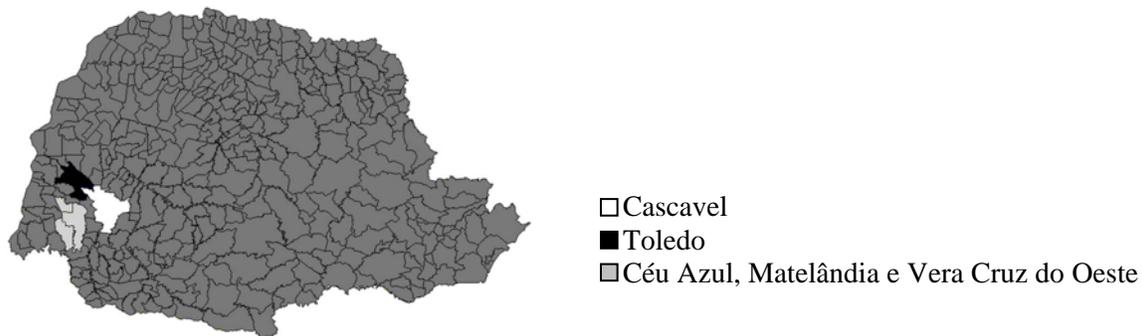


Figura 4 - Município das propriedades do Estado do Paraná que participaram do projeto

Em algumas propriedades o manejo dos animais era realizado pelo próprio proprietário e em outras por funcionários contratados. Apesar disso, ambos tinham boas noções sobre as vacas e higiene, pois já estavam a pelo menos 15 anos na atividade leiteira. Para caracterizar as propriedades, um questionário de duas folhas foi aplicado presencialmente. O questionário continha perguntas gerais sobre o manejo e índices zootécnicos da propriedade e também perguntas específicas sobre o manejo de ordenha e tratamento das vacas (Anexo A).

2.2.2.2 Mastite clínica

A identificação da mastite clínica foi realizada pelo ordenhador a cada ordenha por meio do teste de Tamis. Os ordenhadores mostraram experiência a respeito do teste, a maioria deles já realizava o teste de Tamis como rotina e, os que não o faziam no momento, já haviam feito no passado. Como critério para participação no projeto, as propriedades que não estavam usando o teste deveriam retomar o seu uso a cada ordenha. Para padronizar a doença, ficou definido que qualquer alteração visual no leite em relação à cor, aspecto ou fluidez deveria ser considerada mastite clínica. As vacas que haviam recebido tratamento antibiótico dentro de 10 dias antes do caso de mastite clínica não foram consideradas elegíveis a participar do projeto.

Cada teto com mastite clínica teve o leite coletado assepticamente em dois tubos de 15 mL. O ordenhador foi treinado para realizar a coleta do leite e recebeu um kit de coleta contendo luva descartável, algodão embebido em álcool 70% e tubos plásticos estéreis (Figura 5A). Após a preparação do animal para ordenha e a desinfecção do orifício do teto com algodão, as amostras de leite foram coletadas consecutivamente e resfriadas em geladeira. Os dois tubos de cada amostra foram identificados com o número da vaca, o teto doente e a letra A ou B.

Os produtores possuíam uma planilha de informação que deveria ser preenchida para cada caso de mastite clínica. As informações solicitadas foram: nome da vaca, data do parto, número de crias, produção mensal de leite, queda estimada da produção de leite após a mastite, número de vezes que a vaca já teve mastite clínica na lactação, média da CCS na lactação, CCS mensal do penúltimo e último mês antes da mastite, escore do esfíncter do teto que apresentou mastite e grau da mastite que acometeu a vaca. A queda na produção de leite após a mastite foi calculada em porcentagem de acordo com o que a vaca estava produzindo antes da mastite clínica e passou a produzir após. Para anotação do escore de esfíncter do teto, os produtores receberam fotos padronizadas conforme a classificação de calosidade do esfíncter proposta por Neijenhuis et al. (2000) em uma escala de 1 a 4 (Anexo B). O grau da mastite clínica foi definido como: 1) presença de alteração visual no leite, 2) presença de alteração visual no leite e edema de úbere, 3) presença de alteração visual no leite, edema de úbere e sintomas sistêmicos da doença (temperatura maior de 39,5 °C, inapetência, desidratação, depressão). Apesar do produtor de leite ter coletado amostras de todo caso de mastite clínica, as mastites de grau 3 não tiveram o tratamento com antibiótico atrasado para esperar o resultado da cultura a campo. Elas foram tratadas imediatamente após a coleta da amostra de leite.

2.2.2.3 Cultura

As propriedades sempre coletavam as amostras na ordenha da manhã e após a coleta avisavam por telefone a pesquisadora responsável, a qual recolhia as amostras. A pesquisadora ficou sediada na propriedade de Cascavel a uma distância de aproximadamente 60 km de cada laticínio. Diariamente, na parte da manhã ela se deslocava para região dos laticínios para recolher as amostras coletadas. Durante o percurso as amostras foram conservadas em caixa térmica com gelo reciclável até o retorno a Cascavel. As amostras coletadas na propriedade sede foram armazenadas diretamente na geladeira do laboratório provisório montado no local. O laboratório possuía bancada, estufa bacteriológica, geladeira e pia (Figura 6A-C). Assim como as amostras de leite, as placas de cultura foram armazenadas na geladeira do laboratório. O plaqueamento das amostras foi realizado diariamente até o horário do meio dia.

Para o cultivo das amostras na fazenda três meios foram selecionados (Figura 5B): o Agar Sangue Base Azida (cor vermelha), o Agar MacConkey (cor rosa) e o Agar Vogel-Johnson (cor laranja). Os meios foram adquiridos da marca OXOID na forma liofilizada (Apêndice A), os quais foram preparados conforme recomendações do fabricante e vertidos em placas de Petri estéreis descartáveis de tamanho 90x15 mm. O Agar Sangue Base Azida, após diluição em água destilada e esterilização em autoclave a 121 °C por 15 minutos, foi resfriado em banho-maria até atingir a temperatura de 50 °C e, para cada 1 litro de meio, foi adicionado 50 mL de sangue de carneiro desfibrinado estéril (Laboratório Ebefarma). A azida sódica tem efeito bacteriostático sobre a maioria dos microrganismos Gram negativos, mas permite o crescimento de microrganismos Gram positivos principalmente *Streptococcus* e *Staphylococcus*. Na concentração que a azida está presente no meio de cultura, ela não tem nenhum efeito sobre a hemólise e, portanto, o meio adicionado de sangue pode ser usado para a detecção simultânea de reações hemolíticas.

O Agar MacConkey somente foi diluído em água destilada e esterilizado em autoclave. Sua fórmula, composta por sais biliares e cristal de violeta, permite o crescimento de microrganismos Gram negativos enquanto que os Gram positivos são completamente inibidos.

O Agar Vogel-Johnson, após diluição em água destilada e esterilização em autoclave, foi resfriado em banho-maria até atingir a temperatura de 50 °C e, para cada 1 litro de meio, foi adicionado 5,7 mL de solução estéril de telurito de potássio a 3,5% (OXOID SR30). O telurito, o cloreto de lítio e a alta concentração de glicina fazem com que os microrganismos contaminantes

sejam quase que completamente inibidos durante as primeiras 24 horas de incubação, praticamente todos os microrganismos que crescem nesse período são coagulase positiva. Microrganismos que crescem como colônias negras, convexas, brilhantes e circundadas por zona amarela, após incubação a 35-37 °C por 24 horas, podem ser considerados presuntivos de *Staphylococcus aureus*. Isso porque o *S. aureus* é capaz de reduzir o telurito a telúrio metálico resultando no crescimento de colônias negras e fermentar o manitol acidificando o meio ao redor da colônia que forma um halo amarelo. Quando vários métodos de isolamento de *S. aureus*

Desse modo, o meio Sangue Base Azida, o MacConkey e o Vogel-Johnson permitiram a detecção de microrganismos Gram positivos, Gram negativos e *S. aureus*, respectivamente, nas amostras de leite. A amostra de leite identificada com a letra A, de cada caso de mastite clínica, foi inoculada com o auxílio de um swab estéril em meia placa de Petri de cada um dos meios. O procedimento foi realizado nas proximidades de um bico de Bunsen e o volume do inóculo foi calculado em aproximadamente 0,1 mL (GODDEN et al., 2007). As placas foram incubadas em posição invertida por 24 horas a 37°C e as amostras congeladas a -30 °C para posterior envio ao laboratório. A aparência do leite amostrado foi registrada como: cor branca com poucos grumos de pequeno tamanho, alteração da cor com vários grumos volumosos, ou aspecto purulento.

Após o período de incubação, foi realizada a leitura do crescimento presente nas placas. Para anotar as características do crescimento, uma planilha foi usada contendo os seguintes campos: tipos de colônia, coloração das colônias, número de colônias, presença de hemólise no meio Sangue Base Azida, fermentação da lactose no meio MacConkey e fermentação do manitol no meio Vogel-Johnson. De acordo com a presença de crescimento nos 3 meios foi determinado o tipo de tratamento que o animal deveria receber. Assim, um dia após a detecção da mastite clínica de grau 1 e 2, a pesquisadora entrava em contato com o produtor de leite para passar o tratamento do animal. Conforme Wagner et al. (2007) o atraso do tratamento em 24 horas não mostrou diferença significativa na taxa de reincidência de mastite por 120 dias pós-tratamento em comparação com animais tratados imediatamente após a detecção da mastite clínica. Apesar do resultado de 24 horas de incubação ter sido usado para o tratamento dos animais, as placas de cultura permaneceram na incubadora por mais 48 horas para o registro de qualquer alteração do resultado inicial. Todo material usado para cultura na fazenda foi descartado por incineração.

2.2.2.4 Protocolo tratamento

Todos os tratamentos de mastite foram realizados com cefquinome (Cobactan[®], Intervet), cefalosporina de quarta geração, administrado em diferentes doses e vias conforme orientações técnicas e do fabricante (Anexo C). As cefalosporinas de quarta geração foram fruto de intensas pesquisas com o objetivo de desenvolver cefalosporinas que fossem resistentes à inativação por beta-lactamases, que conservassem a ação contra as bactérias Gram negativas, incluindo a ação contra *Pseudomonas*, e que tivessem elevada potência contra Gram positivos, especialmente contra os estafilococos. Conforme o estudo de Limbert et al. (1991), o amplo espectro do

cefquinome, devido a sua alta estabilidade frente às beta-lactamases, incluiu *S. aureus* susceptíveis e resistentes à meticilina, Estreptococos, Enterococos, os membros mais importantes da família das Enterobactérias (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.*, e *Serratia marcescens*) e a maioria das cepas de *Pseudomona aeruginosa*.

Os casos de mastite clínica de grau 3, que não esperaram pelo resultado da cultura a campo para receber tratamento com antibiótico, receberam uma dose de aproximadamente 25 mL de cefquinome intramuscular (IM) a cada 24 horas por dois dias e uma aplicação intramamária (IMM) de uma bisnaga de cefquinome por três ordenhas consecutivas. Adicionalmente, o uso de anti-inflamatório, anti-térmico e soro foi livre conforme a necessidade do animal. Por causa da terapia com antibiótico o descarte do leite ocorreu por cinco ordenhas seguidas após a última aplicação do cefquinome.

Quando a cultura a campo originou crescimento de microrganismos Gram positivos, a mastite foi tratada de forma tradicional. Uma bisnaga de cefquinome IMM foi aplicada por ordenha durante três ordenhas consecutivas. O descarte do leite foi realizado por cinco ordenhas seguidas após a última aplicação do cefquinome.

Na detecção de microrganismos Gram negativos ou cultura sem crescimento, metade dos animais foi tratada de forma tradicional (três bisnagas no teto) e a outra metade não recebeu antibiótico. A escolha para uso do antibiótico foi aleatória, sendo o primeiro resultado da cultura designado para o tratamento com antibiótico, o segundo não indicado, o terceiro tratado com antibiótico e assim por diante. Quando o cefquinome foi aplicado, ocorreu descarte do leite por cinco ordenhas seguidas após a última aplicação do antibiótico. Foi permitida a aplicação de anti-inflamatório nos animais com mastite de grau 2 que não receberam cefquinome. Para esses animais, se a mastite não mostrasse melhora dos sintomas clínicos em 36 horas, o tratamento com antibiótico era iniciado pois nenhum animal deveria sofrer de dor por negligência.

Nos casos que a cultura a campo teve crescimento de *S. aureus*, a mastite foi tratada com a aplicação de uma bisnaga de cefquinome IMM por três ordenhas consecutivas em dois blocos de administração. Dessa forma, o teto recebeu três aplicações, ficou uma ordenha sem receber antibiótico e depois recebeu outras três aplicações. Ao total foram seis aplicações de cefquinome tendo no meio do tratamento uma ordenha sem administração do medicamento, na qual o efeito residual do antibiótico foi aproveitado. O descarte do leite foi realizado por sete ordenhas

seguidas após a última aplicação do cefquinome. A escolha de usar tratamento prolongado nos casos de mastite por *S. aureus* foi fundamentada em vários trabalhos que mostram taxas maiores de cura bacteriológica na utilização de antibiótico por mais do que 3 dias (BARKEMA et al., 2006; SOL et al., 2000).

Qualquer animal que não tivesse melhora, após a completa realização do tratamento com cefquinome, deveria receber tratamento com outro antibiótico preferencialmente de classe diferente das cefalosporinas. As culturas que mostraram crescimento no meio Sangue Base Azida com número igual ou maior que três tipos de colônias heterogêneas foram consideradas contaminadas. Também, nos casos que ocorreu crescimento de tipos variados de colônias em dois dos meios de cultura simultaneamente, a amostra foi considerada contaminada. As mastites com resultado de contaminação na cultura da fazenda foram tratadas de forma tradicional.

Para determinar cura, amostras de leite foram coletadas em duplicata de maneira asséptica aos 14 e 21 dias após a detecção da mastite clínica. A coleta foi realizada pelos ordenhadores de cada propriedade utilizando o mesmo kit de coleta usado anteriormente. A pesquisadora responsável realizou o controle da coleta das amostras, entrou em contato com os produtores para a coleta ser efetuada na ordenha da manhã seguinte e recolheu as amostras de leite resfriadas após a coleta. No laboratório da fazenda, a amostra A de cada par de amostras foi homogeneizada e cerca de 2 mL foi retirado com pipeta plástica estéril para realizar o teste Somaticell (Figura 5C). O teste foi executado conforme as recomendações do fabricante para determinação da CCS da amostra (seção 2.2.1.1 desse trabalho). As amostras de leite foram congeladas a -30 °C para posterior envio ao laboratório.

As amostras de leite congeladas, tanto as amostras coletadas no dia da mastite clínica como após, foram enviadas semanalmente para um laboratório de análises microbiológicas em Cascavel, Paraná. A cultura microbiológica foi realizada para cada amostra coletada em duplicata seguindo os procedimentos estabelecidos pelo National Mastitis Council (2004), descritos na página 29-30 da seção de Material e Métodos. Para confirmação dos resultados negativos na cultura do laboratório, amostras que tiveram ausência de crescimento no plaqueamento direto de 0,01 mL de leite, foram enriquecidas em caldo Infusão Cérebro Coração por 4 horas a 37°C e posteriormente recultivadas conforme o procedimento padrão escolhido. Semanalmente o laboratório emitiu os laudos das culturas que especificavam o tipo da cultura (direta ou pós-enriquecimento), o resultado da identificação microbiológica e a unidade formadora de colônias.

2.2.2.5 Definições e estatística

A determinação do resultado da cultura laboratorial foi feita pela comparação do crescimento obtido em cada par de amostras. Essa comparação levou em conta um número mínimo de unidades formadoras de colônias e um limite de microrganismos presentes na cultura, estabelecidos por um guia de grau de confiança para o diagnóstico de infecção intramamária (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1987). A definição de um resultado positivo, negativo e contaminado foram descritas na página 29-30 da seção de Material e Métodos.

Os resultados da cultura no laboratório foram classificados em: Gram positivos (*S. aureus*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, Estafilococos Coagulase Negativa, *Arcanobacterium pyogenes*, *Corynebacterium spp.*, *Bacillus spp.*), Gram negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*), Negativos e Contaminados. No caso de isolamento misto de um patógeno Gram positivo e um Gram negativo, o resultado da cultura foi classificado pelo grupo do patógeno com maior ufc ($n = 1$). Os isolamentos de levedura e alga ($n = 2$) da cultura laboratorial e as amostras consideradas contaminadas nos dois métodos de cultura ($n = 7$) foram descartados das análises. Em algumas análises de comparação entre as duas formas de cultura, os *S. aureus* foram separados do grupo dos microrganismos Gram positivos. Para avaliar se a concordância entre as culturas dependia de variáveis externas, foi criada uma variável binomial denominada afinidade, que recebeu o valor "sim" quando as culturas apresentaram o mesmo resultado e "não" quando foram discordantes.

O intervalo de 14 dias foi considerado como critério para definição de um novo caso de mastite clínica (RUEGG, 2003). Vacas que tiveram mastite no mesmo teto em intervalo menor de 14 dias foram denominadas intermitentes e não fizeram parte das análises ($n = 13$). O histórico de mastite clínica das vacas foi usado para classificá-las em relação à reincidência clínica. Três classes foram formadas: animal sem nenhum caso de mastite clínica na lactação, animal com um ou dois casos, e animal com mais de 2 casos. A CCS de 200.000 céls/mL foi usada como limite para determinar infecção subclínica. Por definição animais com infecção subclínica crônica tiveram CCS maior que o limite por dois meses consecutivos antes do episódio da mastite clínica. Para análise estatística dos dados, a CCS foi convertida para o valor logaritmo na base 10.

Para as análises gerais de tratamento e cura, as vacas que receberam tratamento antibiótico adicional foram descartadas. As mastites de grau 3 e os tratamentos de *S. aureus* foram estudados separadamente. Cura bacteriológica foi a ausência de isolamento da bactéria

causadora da mastite nas amostras de leite coletadas 14 e 21 dias pós-mastite. Quando o patógeno não foi isolado nem no dia 14 nem no 21, o caso foi considerado como cura bacteriológica total. Para as mastites que tiveram cultura com resultado negativo na amostra mastítica, somente foi considerada cura quando as amostras de leite coletadas pós-mastite permaneceram com ausência de crescimento. Em relação a redução da CCS do teto pós-mastite clínica, tetos que apresentaram a CCS abaixo de 205.000 céls/mL aos 14 e 21 dias pós-mastite foram considerados como tendo sucesso na redução da CCS. Quando a CCS foi menor que 205.000 céls/mL em ambos os dias pós-mastite, o caso foi considerado como redução da CCS total.

Dias em leite, número de crias, queda da produção de leite pós-mastite clínica, e número de tetos com mastite clínica por vaca foram transformados em variáveis nominais. Os dados de dias em leite receberam três níveis: de 1 a 100 dias, de 101 a 200 dias, e maior de 200 dias. Para número de crias, animais primíparos foram separados de múltíparos e os múltíparos divididos em animais de segunda cria e terceira cria ou mais. A redução da produção de leite pós-mastite clínica foi categorizada em: ausência de redução, redução de 1 a 25%, e redução maior que 25%. A variável denominada número de tetos que apresentou mastite clínica no mesmo dia por vaca foi dividida em somente um teto doente e mais de um teto doente.

Na análise dos dados nominais, o teste de Chi-quadrado foi utilizado. Nos casos em que a frequência dos dados, nas células da tabela de contingência, foi menor que cinco o teste exato de Fisher substituiu o Chi-quadrado. O teste de McNemar foi usado para comparar as proporções dos resultados pareados das duas formas de cultura, no qual cada observação da cultura a campo teve uma observação correspondente na cultura do laboratório. O coeficiente kappa de Cohen foi medido para avaliar a concordância real entre as culturas na definição de infecção intramamária excluindo a porção da concordância esperada pelo acaso.

A presença de infecção intramamária foi definida pelo resultado da cultura realizada no laboratório, o qual foi fixado como padrão ouro para avaliação da cultura usada na fazenda. A partir desse padrão foram calculadas a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, e valor preditivo negativo da cultura a campo (Figura 3). A acurácia do diagnóstico bacteriológico feito na fazenda foi definida como a proporção dos resultados que corretamente indicaram os isolamentos positivos e negativos em comparação com o padrão ouro [acurácia = $(VP+VN)/(VP+FP+VN+FN)$]. Adicionalmente, a taxa de resultados falsos positivos (probabilidade de um isolamento positivo em uma amostra sabidamente negativa) e a taxa de

resultados falsos negativos (probabilidade de um resultado negativo em uma amostra sabidamente positiva) foram determinadas (taxa de falso positivo = 1 - especificidade; taxa de falso negativo = 1 - sensibilidade).

As variáveis contínuas, produção de leite e CCS, foram analisadas em modelo linear misto (proc MIXED) para verificar relações com as variáveis nominais. As respostas binomiais, concordância entre as culturas, cura e redução da CCS, foram examinadas por modelo linear misto generalizado (proc GLIMMIX). As variáveis foram removidas do modelo por eliminação do tipo "backward" baseado no critério de Wald para $P > 0,20$. Nos modelos estatísticos a unidade "vaca" foi incluída como variável de efeito aleatório.

As análises descritivas e estatísticas foram efetuadas no software SAS 9.1 para Windows (SAS INSTITUTE, 2002-2003) com nível de significância de 5%. Probabilidades entre 0,05 e 0,10 foram discutidas como tendências.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Somaticell

2.3.1.1 Amostras frescas

A CCS média das amostras de leite a fresco foi 560.000 céls/mL (mediana = 452.000) e a CCS média dessas amostras conservadas foi 448.000 céls/mL (mediana = 444.000). Seis resultados foram idênticos na condição a fresco e conservada, 9 foram maiores a fresco e 5 foram maiores na condição conservada.

A comparação dos resultados do teste Somaticell realizado com amostras de leite a fresco e com as mesmas amostras conservadas a 4 °C por 5 horas mostrou alta correlação ($r = 0,99$; $P < 0,001$; Figura 7). Não foi observada diferença significativa entre o resultado do teste quando realizado com a mesma amostra fresca ou conservada ($P = 0,161$). A diferença média entre o logaritmo dos resultados foi -0,01.

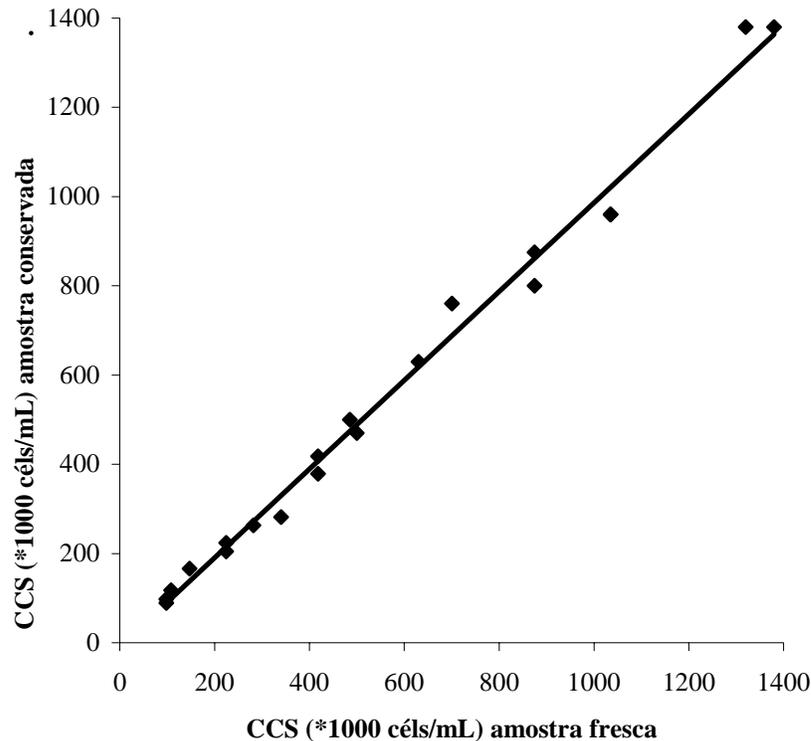


Figura 7 - Comparação entre os resultados do teste Somaticell realizado com amostras de leite frescas e amostras conservadas a 4 °C por 5 horas

2.3.1.2 Eficiência

Duas amostras de leite não tiveram volume suficiente para realizar os testes ficando assim um total de 323 amostras. Duzentos e trinta e nove resultados da CCS eletrônica foram abaixo de 69.000 céls/mL e 17 foram acima de 1.970.000 céls/mL. Para comparação da CCS entre os dois testes, esses resultados foram registrados como o limite inferior e limite superior do teste Somaticell, respectivamente. A CCS média das amostras de leite analisadas pelo teste Somaticell foi 214.000 céls/mL (mediana = 79.000) enquanto que a CCS média dessas amostras analisadas pelo equipamento Fossomatic foi 216.000 céls/mL (mediana = 69.000). A maioria das amostras apresentou CCS reduzida sendo o resultado de maior repetição, 122 vezes, o valor de 69.000 céls/mL para ambos os testes. Os resultados da CCS dos dois testes determinaram uma correlação significativa ($P < 0,001$) de 0,92 (Figura 8). A mesma correlação foi observada entre o contador eletrônico portátil DCC e a CCS medida em equipamento automatizado usando 800 amostras de leite (RUEGG et al., 2005). Outro equipamento eletrônico portátil para determinação da CCS, C-reader system, também mostrou elevada correlação (0,95) com a CCS realizada por equipamento

automatizado usando amostras de leite cru e amostras padrões de CCS (MOON et al., 2007). O empecilho desses dois equipamentos eletrônicos portáteis seria o custo de aquisição do aparelho de leitura e das placas descartáveis usadas para determinar a CCS de cada amostra de leite.

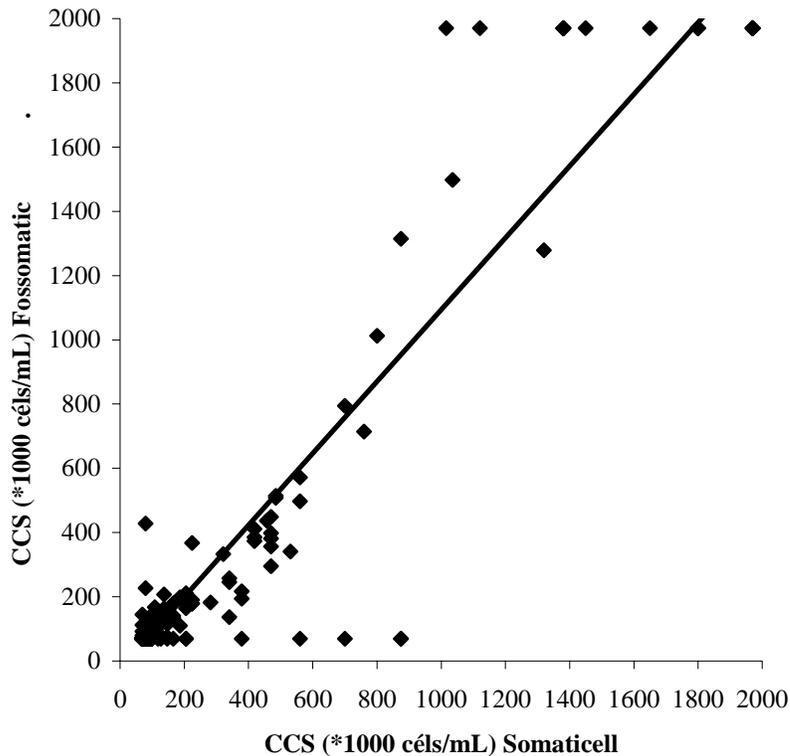


Figura 8 - Comparação entre os resultados de CCS do teste Somaticell e do equipamento Fossomatic

A sensibilidade do teste Somaticell, probabilidade do resultado do teste estar acima de 205.000 céls/mL quando a amostra de leite apresentou mastite subclínica (CCS eletrônica acima de 205.000 céls/mL), foi de 91,3%, enquanto que a especificidade, probabilidade do teste estar abaixo de 205.000 céls/mL quando a amostra não apresentou mastite subclínica, foi de 96,0%. Brito et al. (1997) verificaram que a especificidade do CMT em relação à CCS eletrônica, para um ponto de corte de 200.000 céls/mL, foi constante em torno de 95%; valor esse similar ao teste Somaticell. Entretanto, a sensibilidade do CMT mostrou valores decrescentes conforme as classes do teste foram agrupadas (79% para escore negativo versus traço, uma cruz, duas cruces, e três cruces; 61% para escore negativo e traço versus uma cruz, duas cruces, e três cruces; 34% para escore negativo, traço, e uma cruz versus duas cruces e três cruces). Apesar do CMT apresentar uma escala de classes crescente conforme a população de células somáticas do leite, seria

necessário utilizá-lo como escore negativo versus outros escores para usufruir da melhor sensibilidade do teste.

Além de calcular a validade do teste Somaticell em identificar as amostras com e sem doença, também foi determinado os valores preditivos do teste. A probabilidade de uma amostra acima de 205.000 céls/mL ter mastite subclínica (valor preditivo positivo) foi 79,2% e a probabilidade de uma amostra abaixo desse valor não ter mastite subclínica (valor preditivo negativo) foi 98,5%. O valor preditivo de um teste é influenciado pela prevalência da doença na população, doenças de maior prevalência aumentam a probabilidade de serem detectadas pelo teste diagnóstico (GORDIS, 2004). Como a população utilizada nesse estudo apresentou baixa prevalência de mastite subclínica, 83,6% das CCS eletrônicas foram abaixo de 205.000 céls/mL, o valor preditivo positivo apresentou valor mais baixo. Conforme Ruegg (2003), em rebanhos com baixa prevalência de mastite subclínica um bom artifício para melhorar o valor preditivo positivo de um teste diagnóstico seria aumentar o ponto de corte do teste para definição de infecção intramamária. Na população desse estudo seria necessário um aumento no ponto de corte para 600.000 céls/mL para que o valor preditivo positivo fosse elevado em aproximadamente 10%.

A concordância observada entre os dois testes pelo número de vezes que ambos identificaram uma amostra como infectada e não infectada foi 95,3%. O coeficiente kappa de Cohen mostrou concordância entre os testes de 0,82 quando a porção da concordância esperada pelo acaso foi excluída. Segundo os pesquisadores Landis e Koch (1977) o kappa coeficiente pode ser interpretado na seguinte escala: valores menores que 0,0 mostram não concordância, entre 0,0 e 0,20 concordância muito baixa, entre 0,21 e 0,40 concordância baixa, entre 0,41 e 0,60 concordância moderada, entre 0,61 e 0,80 concordância completa e entre 0,81 e 1,00 concordância quase perfeita. Assim, pode-se dizer que o Somaticell conseguiu selecionar as amostras infectadas tão bem quanto a CCS eletrônica, já que o valor de kappa encontrado pertence ao melhor nível de concordância. Resultados similares ao encontrado para o Somaticell foram observados para o contador eletrônico portátil DCC (RUEGG et al., 2005). Na determinação de mastite subclínica usando um ponto de corte de 250.000 céls/mL, o DCC apresentou 95,6% de concordância com a CCS eletrônica sendo kappa igual a 0,90.

Os resultados da cultura microbiológica foram classificado em: patógeno maior (5,9%), patógeno menor (8,1%), negativo (83,2%) e contaminado (2,8%) (Tabela 1). Uma amostra não

(CMT positivo e isolamento negativo), e "mastite infecciosa" (CMT e isolamento positivos). Os autores também realizaram a CCS das amostras de leite e verificaram que apesar do CMT das glândulas "cl clinicamente sadias" e "portadoras ou infectadas" terem mostrado resultado negativo a CCS foi diferente entre os dois grupos. Dessa forma, o CMT não foi capaz de identificar a diferença entre a CCS dos dois grupos, devido à proximidade das contagens que originou valores de celularidade insuficientes para alterar a viscosidade da reação do CMT. Nesse caso, o teste Somaticell poderia ajudar a diferenciar os grupos, já que o teste fornece um valor número para a CCS e não classes que contemplam faixas variadas de CCS que até se sobrepõem como é o caso do CMT (READ JR et al., 1969).

A vantagem de exibir um valor numérico para a CCS também foi verificada por LAW, 2004. Esse autor propôs o uso de um refletômetro para ler a intensidade da cor gerada pelo teste PortaSCC com o intuito de agregar valores numéricos ao teste originalmente qualitativo. As análises do PortaSCC realizadas pela interpretação da cor do teste haviam mostrado correlação com a CCS eletrônica de 0,63, e sensibilidade e especificidade de 76 e 94%, respectivamente, usando um pon Tw 15spens(am(ente,)JT8S eletre0rT.1996 Tw -2-2650d9dfTdl9.4050539 Tw 2.027189 0 T

mostrando que ao anular o efeito de pessoa na execução do teste as contagens sofrem menos variação (SARIKAYA, BRUCKMAIER, 2006).

Tabela 2 - Relação dos resultados do teste Somaticell quando realizado em duplicata por pessoa

| Pessoa | Teste 1 | | Teste 2 | | Correlação entre teste 1 e 2 | <i>P</i> da Correlação (¹) | LogCCS (²) da diferença entre teste 1 e 2 | <i>P</i> da Diferença (³) |
|--------|---------------------|---------|---------|---------|------------------------------------|---|---|--|
| | CCS (*1000 céls/mL) | | | | | | | |
| | Média | Mediana | Média | Mediana | | | | |
| 1 | 194 | 79 | 179 | 69 | 0,82 | < 0,001 | -0,02 | 0,041 |
| 2 | 153 | 69 | 144 | 79 | 0,95 | < 0,001 | -0,01 | 0,239 |
| 3 | 170 | 79 | 144 | 79 | 0,96 | < 0,001 | -0,01 | 0,153 |

(¹) Teste de Pearson ($P \leq 0,05$)

(²) Contagem de células somáticas convertida ao logaritmo na base 10

(³) Teste T pareado ($P \leq 0,05$)

Quando os resultados do teste Somaticell foram analisados em conjunto, não foi verificada diferença na CCS do teste nem por pessoa ($P = 0,268$) nem por réplica ($P = 0,500$). Além disso, a interação pessoa mais réplica também não mostrou ser significativa ($P = 0,715$). Desse modo, a diferença observada na CCS do teste para a pessoa 1 não foi capaz de alterar a comparação final dos resultados entre pessoas e réplicas. A média do logaritmo da CCS por pessoa foi 5,03, 4,98, e 5,00 para pessoa 1, 2 e 3, respectivamente, e para as réplicas a média do logaritmo da CCS foi 5,01 e 4,99 para réplica 1 e 2, respectivamente.

Utilizando um ponto de corte de 205.000 céls/mL para determinar amostras com mastite subclínica, os resultados da CCS do teste Somaticell de cada pessoa foram classificados em amostras com e sem mastite (Figura 9). A pessoa 2 e 3 tiveram a mesma porcentagem de resultados classificados como amostras contendo mastite subclínica e amostras saudáveis. A pessoa 1 classificou 7,9% e 6,8% mais amostras contendo mastite subclínica no teste 1 e 2, respectivamente, em comparação as outras pessoas. Em análise desses dados estratificados por réplica, não foi notada diferença significativa entre pessoa e classificação da amostra ($P = 0,182$ e $P = 0,234$ para o teste 1 e 2, respectivamente). Apesar da pessoa 1 ter apontado mais amostras como contendo infecção intramamária, essa diferença não influenciou a classificação geral das amostras.

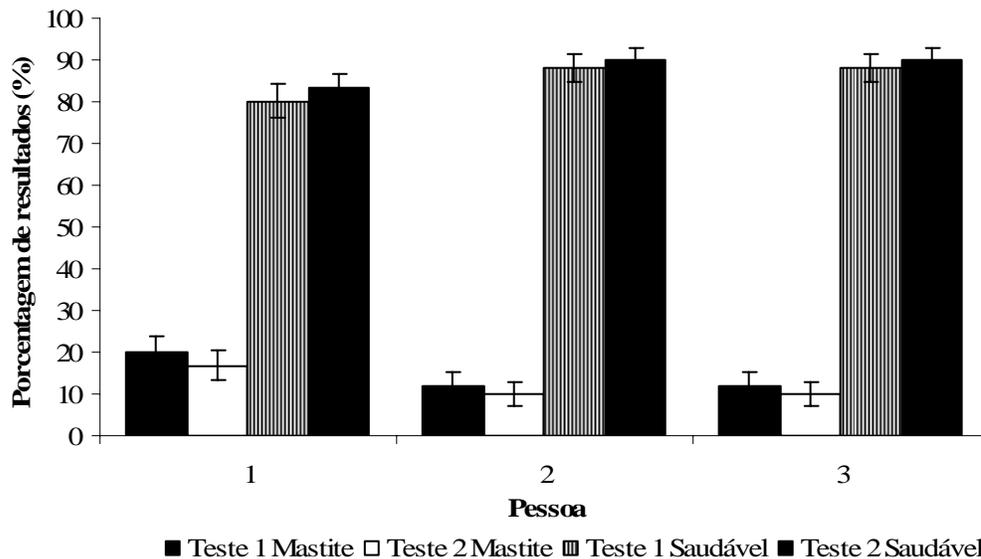


Figura 9 - Porcentagem dos resultados do teste Somaticell por pessoa e réplica classificados pela presença de infecção intramamária

2.3.1.3 Amostras conservadas

As amostras congeladas foram usadas como controle. De acordo com Barkema et al. (1997b), amostras de leite que sofreram congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ apresentaram queda na CCS em comparação com as mesmas amostras na condição fresca. Por outro lado, Meyer (2003) não verificou diferença na CCS entre amostras congeladas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ e refrigeradas após três dias de armazenamento. No presente trabalho, a CCS média das amostras de leite a fresco foi 635.000 céls/mL (mediana = 560.000), enquanto que a CCS média dessas amostras conservadas com a adição de bronopol e conservadas por congelamento foi 126.000 céls/mL (mediana = 98.000) e 229.000 céls/mL (mediana = 98.000), respectivamente.

As amostras conservadas não mantiveram a CCS em relação à amostra fresca, o coeficiente de correlação entre a amostra fresca e a conservada com bronopol foi de 0,49 ($P < 0,001$) e entre a amostra fresca e a congelada foi de 0,71 ($P < 0,001$) (Figura 10). Além disso, ocorreu diferença acentuada entre os resultados de CCS da amostra original e das amostras conservadas, sendo a diferença do logaritmo da CCS $-0,59$ ($P < 0,001$) para conservação com bronopol e $-0,45$ ($P < 0,001$) para conservação congelada. A queda maior da CCS observada nas amostras conservadas com bronopol pode ter sido provocada por alguma incompatibilidade química entre o conservante e o reagente do teste Somaticell, pois ao misturar a amostra conservada ao reagente a solução se tornava imediatamente fluida.

2.3.2 Cultura e tratamento da mastite clínica

2.3.2.1 População

Dos 33 produtores de leite que estavam presentes na reunião sobre o projeto, quatorze (42%) decidiram participar. Vários dos produtores que não entraram no projeto, utilizavam mão-de-obra familiar e possuíam poucos animais em lactação. Dessa forma, esses produtores apresentavam baixa taxa de mastite clínica e não acharam interessante participar de um projeto relacionado a esse assunto. Exceto pela propriedade de Cascavel que fornecia leite para uma cooperativa agroindustrial e tinha um veterinário particular, as outras propriedades foram agrupadas conforme o laticínio ao qual elas forneciam leite. Essas propriedades vendiam leite para dois laticínios regionais, um na cidade de Toledo e outro em Céu Azul-PR, que tinham um veterinário próprio, o qual prestava assistência técnica. Assim, as propriedades possuíam muitas características e manejos semelhantes devido à influência da assistência fornecida e dos padrões de qualidade do laticínio.

A Tabela 3 resume algumas informações das propriedades leiteiras conforme o agrupamento realizado. A propriedade de Cascavel, grupo 1, tinha maior controle sobre o ambiente e a dieta dos animais, o rebanho era mais jovem, apresentava melhor nível de produção de leite por vaca e superior qualidade do leite. Ao contrário, as propriedades do laticínio de Céu Azul tinham a maioria dos animais criados a pasto, vacas mais velhas em lactação, menor produção de leite por animal e qualidade do leite inferior. Apesar da menor produção por animal, o volume de leite captado no grupo 3 era similar ao volume do grupo 1, isso porque o grupo 3 tinha uma maior população de vacas em lactação. As propriedades do grupo 2, por sua vez, apresentaram características e índices intermediários em relação aos outros dois grupos.

Tabela 3 - Características gerais e índices zootécnicos do conjunto das propriedades que participaram do projeto

| Quesito | Grupo | | |
|--|-----------|------------------------------|--|
| | 1 | 2 | 3 |
| Laticínio receptor de leite | Cascavel | Toledo | Céu Azul |
| Número de propriedades, n | 1 | 4 | 9 |
| Município do Estado do Paraná | Cascavel | Toledo | Céu Azul, Matelândia, Vera Cruz do Oeste |
| Sistema de produção, % | Confinado | Confinado 66,7 Pasto 33,3 | Confinado 36,4 Pasto 63,6 |
| Total de vacas em lactação, n (média) ⁽¹⁾ | 378 | 296 (74) | 509 (56) |
| Porcentagem de vacas em primeira lactação, % | 55,5 | 35,1 | 24,2 |
| Produção de leite total, kg/dia | 12.000 | 7.930 | 11.715 |
| Produção de leite por vaca, kg/dia (erro padrão da média) ⁽¹⁾ | 31,7 | 25,1 (± 10,3) | 19,1 (± 5,8) |
| Contagem bacteriana total, ufc/mL (mediana) ⁽¹⁾ | 6.000 | 38.000 (10.000) | 420.000 (300.000) |
| Contagem de células somáticas, céls/mL (mediana) ⁽¹⁾ | 240.000 | 556.000 (549.000) | 792.000 (785.000) |

⁽¹⁾ Dados calculados para o Grupo 2 e 3

O manejo de ordenha e o controle da mastite realizado nas propriedades mostrou algumas diferenças entre os grupos (Tabela 4). O grupo 1 adotava todas as práticas recomendadas para adequada higiene de ordenha, controle de patógenos, monitoramento e tratamento da mastite. Mesmo utilizando cem por cento de mão-de-obra assalariada e tendo vários funcionários envolvidos no manejo dos animais, o grupo 1 desempenhava as atividades com consistência já que os parâmetros de qualidade do leite eram melhores que nos outros grupos. No grupo 2, uma parte das propriedades não utilizava algumas práticas necessárias para reduzir a contaminação dos tetos na ordenha e também falhava na detecção da mastite clínica e na formação do histórico de tratamento dos animais. O grupo 3 tinha propriedades sem tanque de refrigeração para o leite e maior quantidade de vacas sendo ordenhadas por balde ao pé. Como no grupo 2 nem todas as propriedades do grupo 3 usavam um manejo de ordenha completo e realizavam controle da mastite clínica. Além disso, o grupo 3 mostrou certa carência no monitoramento da mastite subclínica e no tratamento de mastite. Possivelmente, o nível de adoção dos quesitos listados na Tabela 4 pelo grupo 3 reflete a qualidade do leite desse grupo mostrada na Tabela 3.

Tabela 4 - Características e manejo relacionados à qualidade do leite do conjunto das propriedades que participaram do 25 Tc 01(ento)JTJETEMC /P <</MCID10 >>BDC BT/TT0 1 Tf0 Tc 0 Tw 10.95911 0 0 10

am gua, ‰

coampapel. ‰

de 400.000 céls/mL. Além disso, práticas ligadas à gestão do rebanho como a utilização de protocolo escrito, para rotina de ordenha e tratamento dos casos clínicos de mastite, foram menos adotadas por rebanhos com alta CCS (Rodrigues et al., 2005). É evidente que o manejo aplicado na propriedade leiteira afeta os animais e, conseqüentemente, a qualidade do leite produzido pois interfere na exposição bacteriana e prevalência da mastite.

Como no presente trabalho, a carência na adoção de boas práticas para produção de leite já foi identificada em outros trabalhos (AMARAL, 2008; BRITO et al., 2004). Algumas práticas tão simples e baratas para o monitoramento da mastite, como o uso do CMT e do teste da caneca de fundo preto, ainda não foram adotadas em cem por cento. Além disso, a utilização de tratamento antibiótico no momento da secagem dos animais e a desinfecção dos tetos pós-ordenha, que foram recomendações estabelecidas há muito tempo como forma de controle dos patógenos contagiosos, ainda não foram completamente integradas ao manejo das propriedades leiteiras. Segundo Amaral (2008), que entrevistou ordenhadores e proprietários de 74 fazendas de leite, o conhecimento sobre manejo de ordenha demonstrado pela população pesquisada foi satisfatório, mas conceitos sobre qualidade de leite e mastite foram ignorados pela maioria. Eles demonstraram conhecer o que deve ser feito para produção de leite com qualidade, entretanto não sabem indicar a razão de tais práticas, o que acaba sendo prejudicial para incorporá-las à rotina de trabalho.

2.3.2.2 Mastite clínica

O número de vacas que apresentou mastite clínica foi similar entre os grupo, sendo 57 para o grupo 1, 50 para o 2, e 57 para o três. Durante os três meses de projeto, a taxa da mastite por grupo foi 0,15, 0,17 e 0,11 para o grupo 1, 2 e 3, respectivamente. O grupo 2 e 3 apresentaram diferença quanto a taxa de mastite ($P = 0,022$). Barkema et al. (1998) não verificaram diferença na taxa de mastite clínica em rebanhos com níveis variados de CCS no leite do tanque, mas o limite superior de CCS da população estudada foi 400.000 céls/mL. Rodrigues et al. (2005) registraram que rebanhos com CCS entre 250.000 e 400.000 céls/mL apresentaram menor taxa de mastite clínica que rebanhos com mais de 400.000 céls/mL no leite do tanque. Algumas vacas tiveram mastite em mais de um teto no mesmo dia ($n = 17$) ou tiveram mais de um caso de mastite durante o período do projeto ($n = 19$). A severidade da mastite clínica não foi associada ao número de tetos que apresentou mastite no mesmo dia por vaca. Entre as vacas que

adquiriram mastite mais que uma vez durante o projeto, treze (68,4%) repetiram a doença no mesmo teto. A taxa de mastite por vaca foi 1,3 casos.

A maioria dos 212 casos de mastite detectados somente mostraram alteração visual no leite (grau 1, 52,3%), casos de grau 2 e 3 foram 41,0 e 6,7% do total. Uma associação foi verificada entre o grau da mastite e a aparência do leite amostrado ($P < 0,001$). Mastites clínicas de grau 1 tiveram a amostra de leite com cor branca e poucos grumos de pequeno tamanho mais frequentemente. E, ao passo que a gravidade dos sintomas da mastite foi intensificada, o número de amostras com aspecto purulento também aumentou, tendo o grau 3 de mastite 53,8% das amostras com aspecto purulento. Quanto a redução da produção de leite devido à mastite, a maioria das mastite de grau 2 e 3, 53,4 e 75,0% respectivamente, mostrou o nível mais acentuado de queda ($P = 0,031$). Já as mastites de grau 1 tiveram maior número de casos sem mudança na produção de leite. As variáveis relacionadas aos sintomas do animal em resposta à mastite, como a aparência do leite e a queda na produção, foram diretamente associadas ao grau da mastite. Entretanto, outras variáveis ligadas ao animal, como dias em leite, produção, CCS, e reincidência clínica, não mostraram associação com o grau da mastite.

A cultura realizada no laboratório em duplicata somente registrou 6,0% de resultados discordantes entre a amostra A e B de cada cultivo. Amostras com ausência de crescimento no plaqueamento direto que foram enriquecidas para posterior recultivo ($n = 101$), originaram ao total 15 isolamentos positivos. Desse total, oito foram aceitos como resultado positivo, pois tiveram crescimento de microrganismos considerados de maior importância, e sete foram classificados como resultado negativo, já que mostraram crescimento de microrganismos de menor importância. Os microrganismos responsáveis pelos casos de mastite clínica foram listados na Tabela 5. O grupo dos Estreptococos não agalactiae mostrou maior prevalência, com proporção de 22,2% das culturas, sendo seguido pelos *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus aureus* e Estafilococos Coagulase Negativa. Resultados com ausência de crescimento somaram 41,5% do total das culturas.

Conforme o trabalho de revisão de Santos et al. (2007) os gêneros do grupo dos cocos gram-positivos catalase-negativos encontrados com maior frequência causando infecções em animais são os *Streptococcus spp.* e *Enterococcus spp.*. Entre os Estreptococos não agalactiae podem ser listados o *S. dysgalactiae*, *S. bovis* e *S. uberis* como as espécies mais prevalentes na maioria dos rebanhos. Tanto os *Streptococcus spp.* como os *Enterococcus spp.* apresentam

distribuição ampla podendo ser encontrados no solo, água, plantas, alimentos e animais. Bactérias do gênero *Enterococcus spp.* são caracteristicamente mais resistentes aos antimicrobianos e a sobreviver em ambientes pouco favoráveis, especialmente quando comparadas às espécies do gênero *Streptococcus spp.*

Outros trabalhos que fizeram levantamentos da etiologia da mastite clínica apresentaram resultados diferentes dos encontrados no presente trabalho. Costa et al. (1995) estudando 877 amostras de mastite clínica observaram que os *Staphylococcus spp.* eram as bactérias com maior frequência de isolamento (34,1%) sendo seguidas pelos *Streptococcus spp.* (28,5%) e *Corynebacterium spp.* (21,8%). Esses autores tiveram somente 1,8% de isolamentos de bactérias Gram negativas, porém isolaram algas em 6,4% das amostras. Outro fato interessante foi a quantidade de amostras que apresentaram microrganismos em associação (19,1%). Ao contrário, Langoni et al. (1998) estudando 850 casos de mastite clínica verificaram que as Enterobactérias eram os microrganismos com maior frequência de isolamento (25,6%) sendo seguidos pelos *Staphylococcus spp.* (18,8%) e *Streptococcus spp.* (16,4%). No trabalho de Langoni et al. (1998) foi realizada a distinção das espécies bacterianas dentro de cada gênero. A *E. coli*, o *S. aureus* e o *S. agalactiae* foram as espécies mais prevalentes nos seus respectivos grupos. Já no presente trabalho, esse padrão de isolamento por grupo bacteriano não foi observado. Tanto *E. coli* e *Klebsiella spp.* como *S. aureus* e Estafilococos Coagulase Negativa mostraram quantidade similar de isolamento nos seus grupos. Porém, as bactérias

Tabela 5 - Resultado da cultura laboratorial dos casos de mastite clínica por grupo

| Isolamento | Total | Grupo | | |
|--|-------|-------|-------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 12 | 4 | 5 | 3 |
| Estafilococos Coagulase Negativa | 11 | 2 | 6 | 3 |
| Estafilococos Coagulase Negativa + <i>Corynebacterium spp.</i> | 3 | .. | 1 | 2 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | 5 | 2 | 1 | 2 |
| Estreptococos não agalactiae | 47 | 19 | 14 | 14 |
| <i>Enterococcus spp.</i> | 14 | 4 | 5 | 5 |
| <i>Enterococcus spp.</i> + <i>Enterobacter spp.</i> | 1 | 1 | .. | .. |
| <i>Arcanobacterium pyogenes</i> | 4 | .. | 1 | 3 |
| <i>Corynebacterium spp.</i> | 3 | .. | 1 | 2 |
| <i>Bacillus spp.</i> | 5 | 2 | 2 | 1 |
| Gram positivos ⁽¹⁾ | 51,0% | 48,6% | 54,7% | 50,7% |
| <i>Escherichia coli</i> | 5 | 4 | 1 | .. |
| <i>Klebsiella spp.</i> | 4 | 4 | .. | .. |
| <i>Enterobacter spp.</i> | 3 | 1 | 1 | 1 |
| <i>Citrobacter spp.</i> | 2 | 1 | 1 | .. |
| <i>Pseudomonas spp.</i> | 1 | .. | 1 | .. |
| Gram negativos ⁽¹⁾ | 7,3% | 14,3% | 4,7% | 1,5% |
| Negativo | 86 | 26 | 27 | 33 |
| Ausência de crescimento ⁽¹⁾ | 41,7% | 37,1% | 40,6% | 47,8% |
| <i>Prothoteca spp.</i> | 1 | .. | .. | 1 |
| Levedura | 1 | .. | .. | 1 |
| Contaminada | 4 | 2 | 1 | 1 |
| Total | 212 | 72 | 68 | 72 |

⁽¹⁾ Porcentagens calculadas para o total exceto os dados de *Prothoteca spp.*, Levedura e Contaminada.

Østerås et al. (2006) analisando resultados de culturas microbiológicas verificaram um efeito significativo no isolamento de *S. aureus*, Estafilococos Coagulase Negativa e *Streptococcus dysgalactiae* por animal. Segundo esses autores, 30,8, 21,7 e 12,2% das culturas positivas para esses patógenos, respectivamente, ocorreram em mais de um teto do mesmo animal. Esse efeito não foi observado no presente trabalho, pois poucos animais apresentaram mais de um caso de mastite clínica no mesmo dia ou mais de um caso durante o período do projeto (n = 36) e desse total, aproximadamente metade mostrou isolamento microbiológico diferente. Os 16 casos que tiveram o mesmo resultado na cultura laboratorial exibiram ausência de crescimento (10), Estreptococos não agalactiae (3), *Enterococcus spp.* (2), e *S. aureus* (1).

O resultado da cultura microbiológica não foi associado ao escore do esfíncter do teto, posicionamento do teto no úbere, número de crias, e aparência do leite mastítico. Por outro lado, mostrou associação com severidade da mastite (Figura 11, $P = 0,040$) e dias em leite ($P = 0,005$). As mastites clínicas que somente originaram alteração visual do leite, grau 1, tiveram maior

frequência de isolamentos negativos do que o esperado. Já as mastites de grau 2, marcadas por alteração visual no leite e edema de úbere, foram em maioria causadas por patógenos Gram positivos. Todavia, as mastites caracterizadas pelo conjunto, alteração visual no leite, edema de úbere e sintomas sistêmicos da doença, tiveram 53,8% das culturas com ausência de crescimento e maior número de culturas com resultado de Gram negativo. Em relação aos dias em leite, as mastites clínicas que ocorreram entre 1 a 100 dias de lactação tiveram maior proporção de isolamentos de bactérias Gram negativas, entre 101 a 200 dias maior número de culturas com ausência de crescimento, e com mais de 200 dias os isolamentos de bactérias Gram positivas prevaleceram.

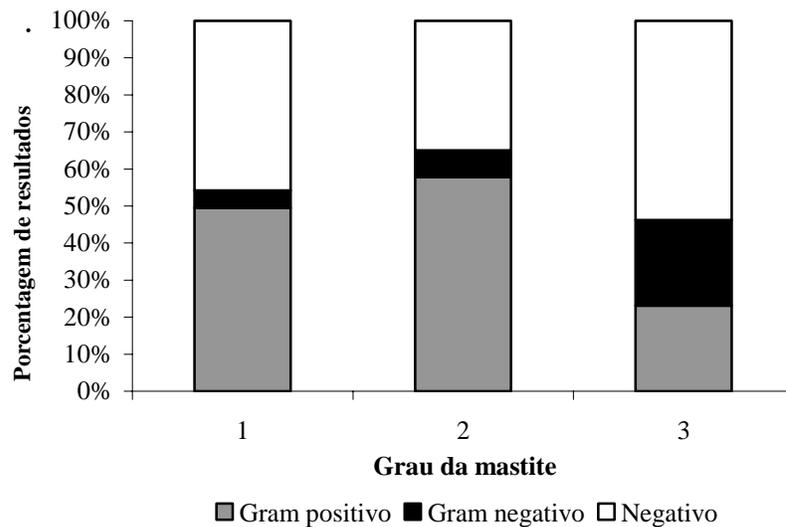


Figura 11 - Resultado da cultura laboratorial conforme o grau da mastite clínica

Dias em leite também mostrou relação com produção de leite e casos de reincidência de mastite clínica, vacas em final de lactação produziram menos que vacas em início e meio de lactação ($P < 0,001$) e a reincidência aumentou conforme se estenderam os dias em lactação ($P < 0,001$). Dessa forma, para análise da relação entre o resultado da cultura e as variáveis listadas acima, dias em leite foi controlado. Os animais com mais de 100 dias em lactação que produziram maior quantidade de leite, em média 40 kg, foram mais propensos a ter mastite por bactérias Gram negativas do que Gram positivas. Também, depois de 100 dias em leite, vacas com histórico de recidivas de mastite clínica tiveram mais isolamentos de bactérias Gram positivas do que Gram negativas. Os casos de cultura com ausência de crescimento mostraram

produção de leite e reincidência em nível intermediário em relação às culturas com resultado de Gram positivos e negativos.

Uma relação interessante foi vista entre CCS, isolamento bacteriano da mastite clínica e queda da produção de leite. A maioria das vacas com média de CCS na lactação maior de 200.000 céls/mL também apresentaram elevada CCS no mês anterior à mastite, cerca de 83,0%. O resultado da cultura da mastite clínica mostrou que os animais com CCS média de 1.446.000 céls/mL (mediana = 555.000) tiveram mais isolamentos de bactérias Gram positivas em relação aos animais com CCS média de 556.000 céls/mL (mediana = 152.000) que tiveram mais isolamentos de Gram negativos e ausência de crescimento na cultura ($P = 0,021$). Adicionalmente, essas vacas com elevada CCS e mastite clínica causada por patógenos Gram positivos registraram queda moderada da produção de leite pós-mastite, de 1 a 25%, quando comparadas às vacas que não mostraram redução da produção ou mostraram uma redução maior de 25% ($P < 0,001$). As culturas com ausência de crescimento tiveram mais casos de mastite sem alteração da produção de leite e os isolamentos de bactérias Gram negativas mostraram queda variada da produção ($P = 0,025$).

Outros pesquisadores também estudaram a relação entre os sintomas clínicos da mastite e os isolamentos microbiológicos das amostras de leite. White e Montgomery (1987) separaram os resultados da cultura em bactérias Gram positivas ($n = 102$), bactérias Gram negativas ($n = 61$) e ausência de crescimento ($n = 40$) e verificaram associações com 12 atributos clínicos. Animais com cultura negativa não mostraram diferenças clínicas em comparação com os animais exibindo bactérias Gram positivas, mas tiveram nove atributos diferentes dos animais com isolamentos de bactérias Gram negativas. Esses últimos apresentaram maior proporção de animais com leite de consistência aquosa, edema de úbere, úbere firme, fraqueza, orelhas geladas, desidratação, depressão, e taxa de pulsação mais alta mas menor proporção de animais com sintomas clínicos por mais de 24 horas. Como nos achados citados acima, o presente trabalho mostrou sintomas clínicos mais acentuados nos animais que tiveram isolamentos de bactérias Gram negativas, porém as culturas com ausência de crescimento apresentaram sintomas similares aos outros dois conjuntos de resultados bacteriológicos. Pela data do trabalho de White e Montgomery é possível que as culturas negativas obtidas pelos autores fossem na verdade culturas falso negativas de bactérias Gram positivas que causam mastite contagiosa. A prevalência de um grupo de bactérias

na população estudada pode influenciar as características das culturas com ausência de crescimento.

Adicionalmente, Melai et al. (2003) procuraram associações entre os sintomas clínicos de casos de mastite e os achados bacteriológicos. Diferentemente os autores dividiram os resultados da cultura microbiológica em: Enterobactérias, bactérias Gram positivas maiores (*S. aureus* e Estreptococos), bactérias Gram positivas menores (Estafilococos Coagulase Negativa, *Corynebacterium spp.*, *Micrococcus spp.*), ausência de crescimento e outros (*Prothoteca spp.*, Levedura). Os animais com mastite clínica por Enterobactérias exibiram as maiores chances de apresentar redução na produção de leite, úberes com consistência firme ou edema, leite com aspecto aquoso, e sintomas sistêmicos da doença. Achados similares ao encontrado no presente trabalho para as mastites de grau 3 que tiveram maior número de isolamentos de bactérias Gram negativas do que as outras formas de mastite. Além disso, Milne et al. usaram um modelo de regressão logística para prever as características de coloração Gram das bactérias causadoras de mastite clínica. Os sintomas clínicos que mostraram ser significantes foram a redução na produção de leite e o comprometimento sistêmico da mastite. Utilizando esses dois parâmetros, um banco de dados com informações clínicas da mastite foi classificado por grupo de bactéria Gram para determinação da sensibilidade e especificidade. A sensibilidade dos dois parâmetros usados em conjunto foi de 28% e a especificidade de 96%. Dessa forma, a redução na produção de leite e o comprometimento sistêmico podem ser usados para apontar os casos de mastite causados por bactérias Gram negativas, mas quando esses parâmetros não reconhecem uma mastite causada por bactéria Gram negativa não se deve afirmar essa condição, pois a baixa sensibilidade leva a maior taxa de falsos negativos. Por esse motivo que, apesar dos sintomas clínicos ajudarem no direcionamento do tratamento da mastite, a cultura bacteriológica deve ser usada para reduzir os erros na classificação dos patógenos.

A proporção dos isolamentos foi diferente entre os grupos das propriedades de leite ($P = 0,049$). O grupo 1 apresentou maior número de patógenos Gram negativos do que o esperado, enquanto que o grupo 3 teve maior número de isolamentos com ausência de crescimento (Tabela 5). As duas diferenças principais entre os rebanhos que causaram o variado isolamento de bactérias foi registrada inicialmente na Tabela 3. O grupo 1 possuía um rebanho de maior produção de leite por vaca e menor CCS de tanque conforme os índices gerais da propriedade, e as mastites causadas por bactérias Gram negativas aconteceram em maioria em vacas de alta

produção e com CCS mais baixa. A produção de leite média das vacas do grupo 1 que tiveram mastite clínica foi 32,2 kg (EPM = 1,2), enquanto que o grupo 2 e 3 apresentaram média de aproximadamente 25,5 kg (EMP = 1,1; $P < 0,001$). A média mensal da CCS das vacas do grupo 1 que apresentaram mastite clínica foi 389.000 céls/mL (mediana = 202.000), enquanto que o grupo 2 e 3 apresentaram média de aproximadamente 1.342.000 céls/mL (mediana = 938.000; $P < 0,001$). O grupo 3 que teve maior número de isolamentos com ausência de crescimento também mostrou maior quantidade de mastites clínicas de grau 1 do que os outros dois grupos ($P = 0,023$).

Barkema et al. (1998) estudaram a incidência de mastite clínica em 274 rebanhos agrupados em três categorias de CCS do leite do tanque. Foi observado que rebanhos com baixa CCS (≤ 150.000 céls/mL) apresentaram maior frequência de mastite causada por bactérias Gram negativas, como *E. coli*, *Klebsiella spp.*, e *Pseudomonas spp.*, enquanto rebanhos com alta CCS (250.000 a 400.000 céls/mL) tiveram a maioria das mastites provocadas por *S. aureus*, *S. agalactiae*, e *S. dysgalactiae*. Além disso, a maior proporção de mastites com sintomas sistêmicos da doença foi encontrada nos rebanhos com baixa CCS no tanque. Apesar do agrupamento dos rebanhos do presente trabalho ter apresentado níveis mais altos de CCS em relação ao estudo citado acima, o mesmo padrão de incidência da mastite clínica foi registrado. O grupo 1 que teve a menor média de CCS do tanque (240.000 céls/mL) também apresentou maior porcentagem de isolamentos de bactérias Gram negativas e, conseqüentemente, a maioria dos casos de mastite clínica de grau 3.

2.3.2.3 Meios de cultura

A leitura do crescimento presente nos três meios, usados para cultura bacteriológica na fazenda, determinou o resultado da cultura para cada caso de mastite clínica (Tabela 6). Após a eliminação das amostras consideradas contaminadas, a cultura do leite mastítico realizada na fazenda resultou em 39,4% de bactérias Gram positivas exceto *S. aureus*, 7,9% de *Staphylococcus aureus*, 10,8% de bactérias Gram negativas e 41,9% de ausência de crescimento. O número de unidades formadoras de colônia foi diferenciado no crescimento dos meios de cultura ($P = 0,040$). A maior parte dos crescimentos no meio MacConkey tiveram de 1 a 50 ufc, no meio Vogel-Johnson de 51 a 100 ufc e no meio Sangue Base Azida mais de 100 ufc.

Tabela 6 - Resultado da cultura realizada na fazenda conforme as combinações de crescimento bacteriano encontradas nos meios

| Resultado | Crescimento no meio de cultura | | | Total |
|------------------------------|--------------------------------|-----------|------------------------------|-------|
| | Sangue Base Azida | MacConkey | Vogel-Johnson ⁽³⁾ | |
| Gram positivo ⁽¹⁾ | + | - | - | 82 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | + | - | + | 16 |
| Gram negativo | - | + | - | 22 |
| Negativo | - | - | - | 85 |
| Gram positivo ⁽²⁾ | + | + | - | 4 |
| Contaminada | + | + | + | 3 |
| Total | .. | .. | .. | 212 |

⁽¹⁾ Crescimento considerado Gram positivo com até dois tipos de colônia, com três ou mais tipos considerado contaminação.

⁽²⁾ Crescimento considerado Gram positivo com um tipo de colônia, com mais tipos considerado contaminação.

⁽³⁾ Crescimento considerado positivo somente quando houve a presença de colônias negras, brilhantes, circundadas por zona amarelo-ouro.

O crescimento bacteriano no Agar Sangue Base Azida ocorreu em padrões variados em relação ao tipo de colônia e presença de hemólise. A Figura 12 e 13 exemplificam os padrões de crescimento. A maioria dos isolamentos no Agar Sangue Base Azida foi de somente um tipo de colônia, 86,6%. Isolamentos de dois e três ou mais tipos de colônia foram, respectivamente, 10,6 e 2,8% do total dos resultados positivos em Sangue Base Azida. Os isolamentos com três ou mais tipos heterogêneos de colônia foram considerados contaminação e descartados das análises. Aproximadamente metade dos crescimentos no meio para bactérias Gram positivas mostrou algum tipo de hemólise, sendo 46,7% de hemólise tipo beta, 33,3% de hemólise tipo alfa e 20,0% de uma associação de beta e alfa hemólise. O crescimento bacteriano obtido com 24 horas de incubação a 37 °C, na maioria dos cultivos, 88,2%, se manteve igual ao original nas posteriores 48 horas. Nove e 2,8% dos resultados, que em 24 horas de incubação tiveram ausência de crescimento, mostraram crescimento positivo após 48 e 72 horas de incubação, respectivamente. Possivelmente, os crescimentos tardios verificados no meio Sangue Base Azida foram de bactérias de crescimento lento, ou injuriadas pela mastite, ou contaminantes.

O meio MacConkey também mostrou adequado crescimento bacteriano. O isolamento prevalente foi de bactérias fermentadoras da lactose, 81,8%, em comparação com não fermentadoras, 18,2%. A Figura 14 mostra exemplos dos resultados obtidos no meio MacConkey cultivado a campo.

O isolamento de *Staphylococcus aureus* no meio Vogel-Johnson foi marcado pelo crescimento de colônias negras, brilhantes, circundadas por zona amarelo-ouro (Figura 15). Do

total dos 212 cultivos realizados no meio Vogel-Johnson, trinta e cinco (16,5%) mostraram crescimento positivo não típico de *S. aureus* após 24 horas de incubação. Esse crescimento teve padrões diferenciados sendo composto na maioria por colônias negras opacas, colônias translúcidas, ou colônias negras circundadas por zona rosa (Figura 16). Dois desses crescimentos não típicos de *S. aureus* apresentaram colônias negras rodeadas por zona amarela, entretanto as colônias tinham o dobro do tamanho das colônias de *S. aureus* e a zona amarela era mais fraca (Figura 17). Todos os isolamentos de *S. aureus* no meio Vogel-Johnson foram acompanhados pelo crescimento de colônias hemolíticas no meio Sangue Base Azida, 68,7% mostrando uma combinação de beta e alfa hemólise e 31,3% somente beta hemólise.

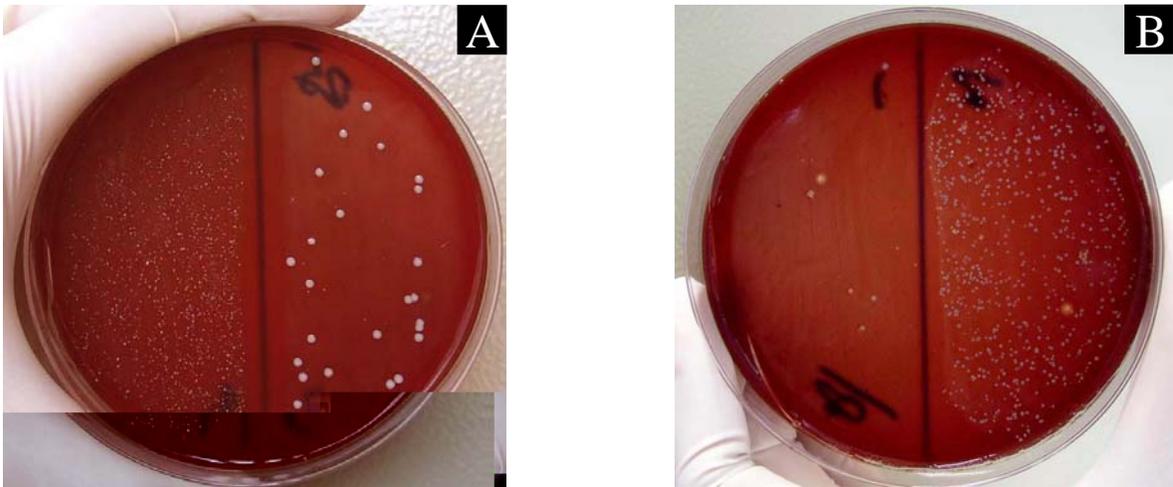


Figura 12 - Cultura a campo em Agar Sangue Base Azida. A: Crescimento positivo nas duas metades da placa. B: Crescimento negativo à esquerda e positivo à direita



Figura 13 - Cultura a campo em Agar Sangue Base Azida. Hemólises do tipo β e α

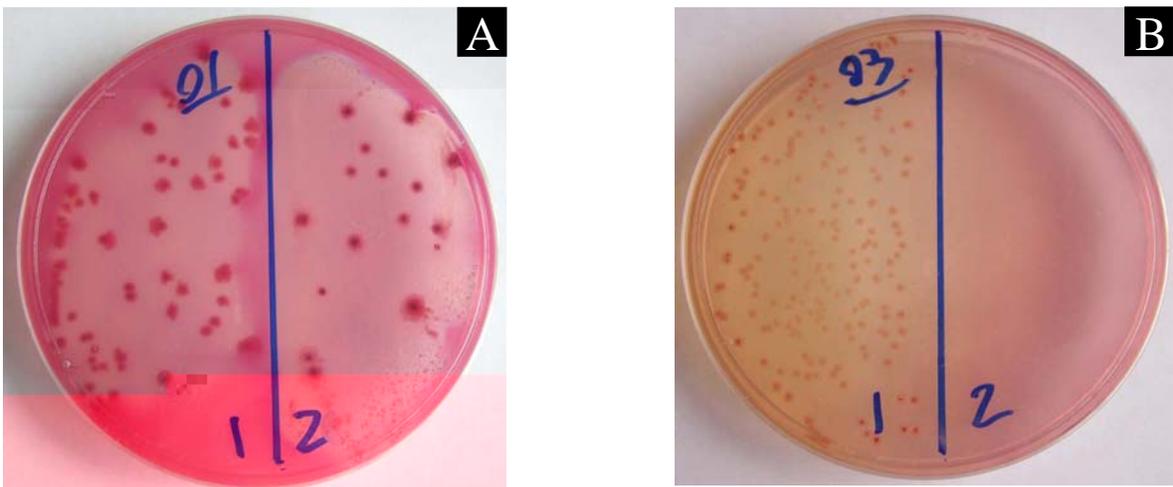


Figura 14 - Cultura a campo em Agar MacConkey. A: Crescimento positivo de colônias lac+ nas duas metades da placa. B: Crescimento positivo de colônias lac- à esquerda e negativo à direita

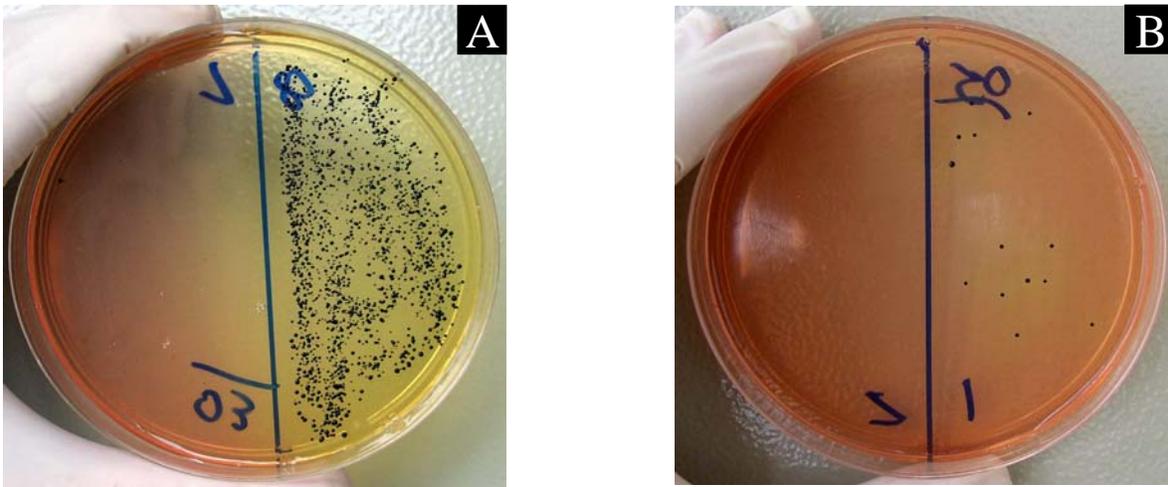


Figura 15 - Cultura a campo em Agar Vogel-Johnson. A: Crescimento negativo à esquerda e positivo tipo *S. aureus* à direita. B: Crescimento negativo à esquerda e positivo tipo *S. aureus* à direita

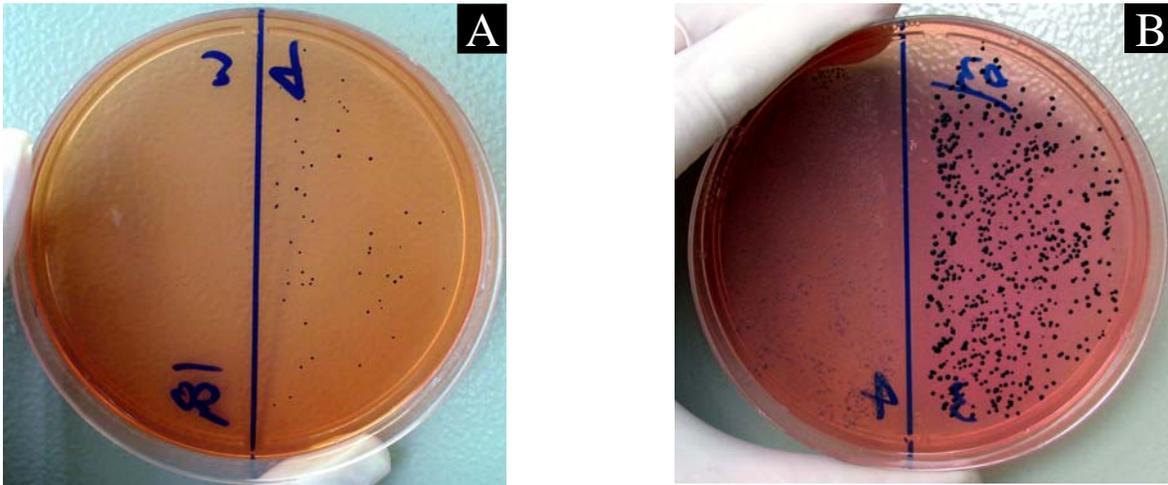


Figura 16 - Cultura a campo em Agar Vogel-Johnson. A: Crescimento negativo à esquerda e positivo não *S. aureus* à direita. B: Crescimento positivo não *S. aureus* nas duas metades da placa

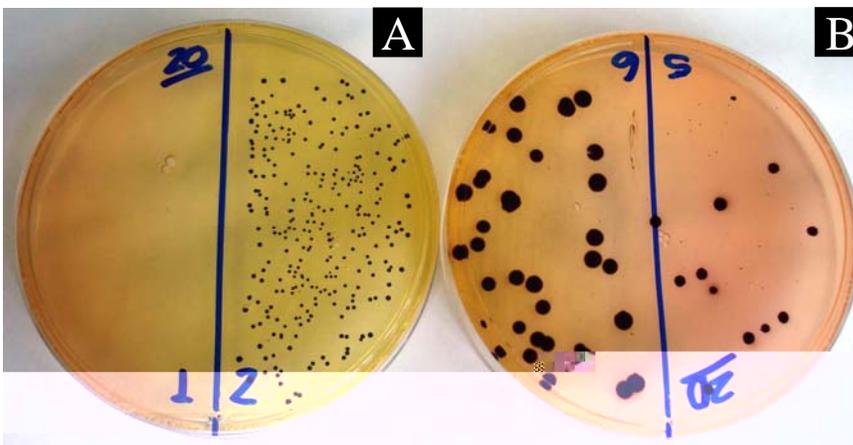


Figura 17 - Cultura a campo em Agar Vogel-Johnson. A: Crescimento típico de *S. aureus* (colônias de 2-3 mm, negras, brilhantes, circundadas por zona amarelo-ouro). B: Crescimento de colônias grandes, negras, brilhantes, circundadas por zona amarela clara

Ao comparar os resultados da cultura feita na fazenda e no laboratório, 79,3% dos 203 cultivos foram idênticos entre as duas formas de cultura (Tabela 7). O grupo das bactérias Gram positivas exceto *S. aureus* contribuiu para essa concordância com 36,0%, os *Staphylococcus aureus* com 5,9%, o grupo das bactérias Gram negativas com 5,4% e os resultados negativos com 32,0%. Dessa forma, restaram 20,7% dos resultados que foram discordantes entre as duas culturas.

Tabela 7 - Distribuição dos resultados das culturas bacteriológicas

| Cultura na fazenda | Cultura no laboratório | | | | Total |
|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|---------------|----------|-------|
| | Gram positivo exceto <i>S. aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | Gram negativo | Negativo | |
| Gram positivo exceto <i>S. aureus</i> | 73 | 0 | 0 | 7 | 80 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 0 | 12 | 0 | 4 | 16 |
| Gram negativo | 2 | 0 | 11 | 9 | 22 |
| Negativo | 17 | 0 | 3 | 65 | 85 |
| Total | 92 | 12 | 14 | 85 | 203 |

A cultura realizada na fazenda identificou 11 mastites causadas por bactérias Gram positivas e 9 causadas por bactérias Gram negativas que a cultura laboratorial mostrou resultado negativo. Dos 11 isolamentos de bactérias Gram positivas, quatro foram de *S. aureus*. Na cultura laboratorial de 14 e 21 dias pós-mastite três desses quatro isolamentos tiveram crescimento de *S. aureus*. Possivelmente esses três resultados de *S. aureus* identificados pela cultura a campo foram realmente positivos para essa bactéria. A respeito dos 9 isolamentos de bactérias Gram negativas não detectados pela cultura laboratorial, há relatos anteriores desse acontecimento. Kristula (1999) testando o kit de cultura Hy-Mast em 105 casos de mastite clínica verificou que 15 isolamentos de bactérias Gram negativas obtidos a campo tiveram crescimento negativo no laboratório. A cultura realizada na fazenda utilizou as amostras de leite na condição fresca, com no máximo 3 horas de resfriamento pós-coleta, enquanto isso a cultura laboratorial usou as amostras depois de aproximadamente 7 dias de congelamento. A cultura a campo pode ter sido favorecida pela utilização da amostra de leite fresca, já que o processo de congelamento pode reduzir a população bacteriana viável da amostra e assim, diminuir o número de unidades formadoras de colônia encontrado no cultivo. A quantidade de ufc entre os isolamentos das duas culturas mostrou diferença ($P < 0,001$). Os crescimentos positivos na fazenda apresentaram em

maioria 100 ufc (28,3%), enquanto os crescimentos positivos no laboratório tiveram de 1 a 50 ufc (32,0%).

Trabalhos mostram que o tratamento da amostra de leite pré-cultivo pode aumentar ou reduzir a recuperação bacteriana (DINSMORE et al., 1992; SILVA et al., 2005; SCHUKKEN et al., 1989). Em geral, a centrifugação, incubação ou enriquecimento da amostra antes do cultivo resulta no aumento do número de amostras com isolamento positivo em comparação com o método convencional de cultivo direto do leite. Além disso, a utilização de volumes maiores de inoculo levam ao aumento da proporção de amostras positivas. Por outro lado, o congelamento da amostra de leite tem efeito variado na recuperação dos patógenos da mastite. Schukken et al. (1989) verificaram que conforme o período de congelamento foi estendido o número de isolamentos de *E. coli* e *A. pyogenes* sofreram redução. Entretanto, Dinsmore et al. (1992) tiveram mais isolamentos bacterianos em amostras congeladas e posteriormente cultivadas usando maior volume de inoculo, do que em amostras cultivadas conforme o método convencional mesmo com maior inoculo. No presente trabalho ambas as culturas foram manipuladas para favorecer o isolamento bacteriano. A cultura realizada na fazenda utilizou a amostra de leite na condição fresca e com inoculo de 0,1 mL, ao passo que a cultura laboratorial usou a amostra congelada com inoculo de 0,01 mL mas os resultados com ausência de crescimento foram enriquecidos. Dessa forma, as diferenças observadas entre as duas formas de cultura no isolamento de certos patógenos da mastite devem levar em consideração a metodologia usada.

A cultura realizada no laboratório identificou 17 mastites causadas por bactérias Gram positivas e três causadas por bactérias Gram negativas que a cultura a campo mostrou resultado negativo. Dos 17 isolamentos de bactérias Gram positivas, seis foram de *Streptococcus* não *agalactiae*, três foram de *Enterococcus spp.*, dois foram de *Staphylococcus Coagulase Negativa*, quatro foram de *Corynebacterium spp.* e dois foram de *Bacillus spp.*. O mesmo foi observado para o teste Hy-Mast nos isolamentos que foram negativos a campo e positivos no laboratório, não houve uma determinada espécie bacteriana que não cresceu no meio de cultura (TORRES et al., 2000). Desses 17 resultados considerados negativos pela cultura a campo e positivos pela laboratorial, cinco tiveram crescimento positivo após 48 horas de incubação e dois após 72 horas de incubação no meio Sangue Base Azida. Somente 10 resultados da cultura realizada na fazenda permaneceram verdadeiramente com ausência de crescimento. Dos três isolamentos de bactérias

Gram negativas da cultura laboratorial, dois foram de *Enterobacter spp.* e um foi de *Citrobacter spp.*. Desses três resultados considerados negativos pela cultura a campo e positivos pela laboratorial, dois foram obtidos por prévio enriquecimento da amostras de leite no laboratório, o que aumenta a chance de isolamento bacteriano.

Pelo fato do resultado da cultura a campo ser obtido após 24 horas de incubação, a metodologia usada ser mais simples e os meios de cultura seletivos para determinadas bactérias, a cultura convencional em laboratório acaba tendo vantagens sobre a realizada na fazenda para o isolamento dos patógenos. Embora tenha sido utilizado um meio de cultura para detecção de *S. aureus*, o propósito da cultura realizada na fazenda não é promover a identificação bacteriana por espécies. A cultura a campo deve compor um sistema prático e de fácil interpretação, que seja útil para agregar informação sobre o tipo de patógeno causador da mastite e para fornecer suporte à decisão de manejo a ser tomada. Por esse motivo, não é realístico pensar que a cultura feita na fazenda irá detectar todos os patógenos envolvidos na mastite bovina. Certos microrganismos apresentam variações em relação ao requerimento nutricional, atmosfera e tempo de incubação, que não serão atendidas pela cultura a campo. Nos casos em que o resultado da cultura realizada na fazenda for duvidoso, como por exemplo um isolamento negativo com sintomas clínicos persistentes, ou dificuldade de interpretar o crescimento obtido, ou constante reincidência de casos clínicos, torna-se imprescindível enviar a amostra de leite para um laboratório padrão.

Dois cultivos tiveram resultados completamente opostos entre a cultura realizada na fazenda e a laboratorial. Enquanto a cultura a campo indicou o crescimento de bactérias Gram negativas, o resultado da cultura do laboratório foi de bactérias Gram positivas. Uma amostra teve isolamento de *Streptococcus nonagalactiae* e a outra de *Enterococcus spp.* mais *Enterobacter spp.*, sendo o resultado dessa segunda amostra obtido por prévio enriquecimento da amostra de leite.

A probabilidade da cultura feita na fazenda ter isolamento bacteriano positivo quando a amostra de leite mastítico continha bactéria (sensibilidade) foi de 83,0%, enquanto que a probabilidade dessa cultura ser negativa quando a amostra não continha bactéria (especificidade) foi de 76,5% (Tabela 8). Adicionalmente, a probabilidade de uma amostra de leite com isolamento positivo na cultura a campo ter mastite

corretamente positivos e negativos em relação ao padrão ouro) da cultura bacteriológica efetuada em três meios seletivos e lida após 24 horas de incubação foi 80,3% do total dos 203 casos de mastite clínica. As probabilidades do teste diagnóstico usado na fazenda foram afetadas pela taxa de resultados falsos positivos e negativos que o próprio teste originou. Essas taxas não necessariamente foram verdadeiras pois elas dependem da precisão do padrão ouro escolhido. Como comentado acima, três isolamentos positivos de *Staphylococcus aureus* da fazenda não foram detectados na cultura laboratorial e dificilmente um método diagnóstico apresenta cem por cento de acerto (GORDIS, 2004).

Tabela 8 - Testes para determinar a validade da cultura bacteriológica realizada na fazenda

| Cultura | Se. ⁽¹⁾ | Es. ⁽²⁾ | VPP ⁽³⁾ | VPN ⁽⁴⁾ | Ac. ⁽⁵⁾ | FP ⁽⁶⁾ | FN ⁽⁷⁾ | Kappa | P ⁽⁸⁾ |
|---------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------|------------------|
| | | | | % | | | | | |
| Geral | 83,0 | 76,5 | 83,0 | 76,5 | 80,3 | 23,5 | 17,0 | 0,59 | 1,000 |
| Gram positivo exceto <i>S. aureus</i> | 79,3 | 93,7 | 91,2 | 84,5 | 87,2 | 6,3 | 20,7 | 0,74 | 0,019 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 100,0 | 97,9 | 75,0 | 100,0 | 98,0 | 2,1 | 0,0 | 0,85 | 0,045 |
| Gram negativo | 78,6 | 94,2 | 50,0 | 98,3 | 93,1 | 5,8 | 21,4 | 0,57 | 0,032 |
| Negativo | 76,5 | 83,0 | 76,5 | 83,0 | 80,3 | 17,0 | 23,5 | 0,59 | 1,000 |

⁽¹⁾ Sensibilidade

⁽²⁾ Especificidade

⁽³⁾ Valor preditivo positivo

⁽⁴⁾ Valor preditivo negativo

⁽⁵⁾ Acurácia

⁽⁶⁾ Taxa de falso positivo

⁽⁷⁾ Taxa de falso negativo

⁽⁸⁾ Teste de McNemar ($P \leq 0,05$)

Conforme Landis e Koch (1977), o coeficiente kappa de Cohen mostrou concordância moderada entre as duas formas de cultura (Tabela 8). Como o coeficiente de kappa foi menor que a concordância observada (79,3%), parte da igualdade entre as duas culturas foi devido ao acaso. O teste de McNemar, que avalia a homogeneidade da frequência dos resultados positivos e negativos de provas realizadas em pares, mostrou não haver efeito do tipo de cultura sobre o diagnóstico da mastite clínica (Tabela 8).

Observando a Tabela 8, que lista as probabilidades e os testes estatísticos por resultado da cultura realizada na fazenda, é possível notar os resultados que positivamente e negativamente influenciaram o resultado geral. Os isolamentos de bactérias Gram positivas exceto *S. aureus* e do *Staphylococcus aureus* mostraram probabilidades maiores em relação à sensibilidade,

especificidade e valores preditivos, que ajudaram a melhorar a validade geral da cultura a campo. Apesar desses isolamentos não indicarem homogeneidade nas frequências marginais da tabela de contingência (P do teste de McNemar significativo), eles tiveram menores taxas de resultados falsos positivos e negativos, e exibiram concordância por kappa igual ou maior que completa. Ao contrário, os isolamentos de bactérias Gram negativas e os resultados com ausência de crescimento mostraram probabilidades menores, que levaram a reduzir a validade geral da cultura realizada na fazenda. Esses resultados tiveram menor capacidade de serem detectados corretamente (menor sensibilidade da cultura a campo) e assim, maior taxa de resultados falsos negativos. Também, para os isolamentos de bactérias Gram negativas e resultados negativos a concordância entre as culturas por kappa foi moderada.

Em comparação com os resultados obtidos no presente trabalho, o kit de cultura Hy-Mast[®], formado por meios seletivos para bactérias Gram positivas e negativas, mostrou maior sensibilidade para detecção de bactérias Gram negativas (89%, $n = 105$) mas teve menor especificidade (70%), e para bactérias Gram positivas a sensibilidade e especificidade foram mais baixas, 71 e 91% respectivamente (KRISTULA, 1999).

O sistema de cultura desenvolvido por pesquisadores da Universidade de Minnesota foi avaliado em laboratório utilizando amostras de leite de casos de mastite clínica de grau 1 e 2 (HOCHHALTER et al., 2006; JONES et al., 2006). Os dois formatos de cultura, Bi-plate e Tri-plate, mostraram menores índices de validade do que os encontrados no presente trabalho em comparação com a cultura laboratorial. Entretanto, os autores testaram os meios usando amostras congeladas. O sistema Bi-plate, composto por um meio seletivo para bactérias Gram positivas e outro para bactérias Gram negativas, apresentou sensibilidade de 76,9%, especificidade de 63,3%, valor preditivo positivo de 69,0%, e valor preditivo negativo de 72,1%. O sistema Tri-plate, composto por um meio seletivo para bactérias Gram positivas, um para bactérias Gram negativas e um para *Streptococcus spp.*, apresentou sensibilidade de 76,9%, especificidade de 68,8%, valor preditivo positivo de 72,7,0%, e valor preditivo negativo de 73,3%. Um fato interessante observado pelos pesquisadores foi a elevada concordância entre duas pessoas que interpretaram os isolamentos nos meios, o coeficiente kappa entre elas foi 0,84 para os dois sistemas de cultura.

Um teste desenvolvido para a detecção de bactérias Gram negativas em amostras de leite, que funciona pela reação de fatores protéicos com endotoxinas da parede celular bacteriana,

mostrou menor sensibilidade (63%) e maior valor preditivo positivo (70%) do que os observados nesse trabalho com o uso do meio MacConkey em condições de campo (WAAGE et al., 1994). O teste chamado LAL[®] (*Limulus* ameobocyte lysate) foi avaliado em relação a cultura laboratorial, usando 789 amostras de mastite clínica, e exibiu especificidade de 97%, valor preditivo negativo de 95%, concordância de 93%, e coeficiente kappa de 0,63. Uma preocupação desse teste apontada pelos autores foi o fato do teste funcionar pela detecção de endotoxinas e algumas vezes a toxina estar presente na amostra de leite mas não existir bactérias viáveis.

O Petrifilm[®] foi outro método de cultivo bacteriológico já testado a campo usando amostras de mastite clínica de grau leve e moderado (SILVA et al., 2004). A placa de contagem de bactérias aeróbicas (Aerobic Count Plate), de contagem de Coliformes (Coliform Count Plate) e de contagem de *S. aureus* (Staph Express Count Plate) foram usadas em 267 amostras de leite. A sensibilidade e especificidade geral do método foram registradas em 83 e 87%, respectivamente. Apesar da placa de *S. aureus* ter mostrado adequada sensibilidade (87%), o diagnóstico da bactéria foi altamente dependente da habilidade da pessoa observar a mudança de cor ao redor da colônia que determina o isolamento de *S. aureus* (SILVA et al., 2005). A percepção de mudança de cor também deve ser utilizada no Agar Vogel-Johnson para detectar o crescimento do *S. aureus* assim, o treinamento da pessoa que vai manusear o meio a campo torna-se essencial.

Para verificar o efeito de variáveis relacionadas ao caso de mastite clínica e ao animal sobre a concordância geral das duas culturas, um modelo estatístico foi construído tendo a resposta binomial concordância. As variáveis de efeito não significativo foram consecutivamente retiradas do modelo conforme o grau de importância. Número de crias ($P = 0,659$), aparência do leite mastítico ($P = 0,878$), reincidência ($P = 0,767$), CCS anterior à mastite clínica ($P = 0,847$), produção de leite ($P = 0,380$), dias em leite ($P = 0,527$), grupo da propriedade leiteira ($P = 0,475$) e grau da mastite ($P = 0,425$) não mostraram efeito sobre a concordância das culturas. Somente o número de unidades formadoras de colônia da cultura realizada na fazenda exibiu efeito ($P = 0,001$). A probabilidade do resultado da cultura a campo ser igual ao resultado da cultura laboratorial foi maior conforme a ufc da amostra aumentou (Figura 18). Amostras contendo de 51 a 100 ufc tiveram maior chance de apresentar concordância do que amostras com 1 a 50 ufc (OR = 6,22; $P = 0,050$). Amostras com mais de 100 ufc mostraram maior chance de concordar do que amostras com ausência de crescimento (OR = 7,71; $P = 0,043$) e amostras com 1 a 50 ufc (OR =

18,67; $P = 0,002$). Dessa forma, a concordância entre as culturas foi dependente unicamente da população bacteriana presente na amostra de leite. Um estudo que avaliou associações entre os resultados da cultura microbiológica de amostras de leite e fatores relacionados ao animal também verificou poucas variáveis significativas (ØSTERÅS et al., 2006). Somente o isolamento de *Streptococcus dysgalactiae* mostrou associação positiva com o aumento do número de crias e dias em leite do animal.

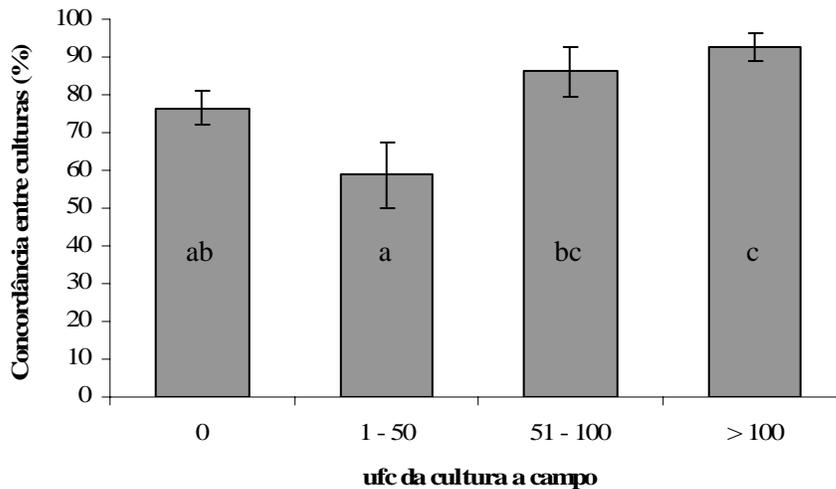


Figura 18 - Relação entre a concordância das culturas bacteriológicas e a unidade formadora de colônia da amostra de leite

Certamente nem toda propriedade leiteira vai ser capaz de incorporar ao manejo o uso de cultura bacteriológica a campo. Além da necessidade de um espaço para realização do cultivo, de uma estufa, e de meios de cultura frescos, é importante a presença de uma pessoa responsável e treinada para manejar a rotina da cultura. Nesser et al. (2006) estudaram uma população de 52 produtores, que estavam usando ou já haviam usado cultura a campo, para determinar fatores associados ao uso de tal método diagnóstico. Os autores verificaram que a maioria dos rebanhos era composto por mais de 200 vacas, 24% realizavam cultura de todos os casos de mastite clínica, 58% esperava o resultado da cultura para tratar o animal, e 39% iniciava o tratamento antes do resultado da cultura e depois de obtê-lo mudava o tratamento se necessário. As razões pelas quais eles não realizavam a cultura em cem por cento dos casos de mastite foram: falta de interesse em cultivar o leite de vacas que tiveram vários casos de mastite, em certos casos a bactéria podia ser determinada pelos sintomas clínicos, e em outros casos era preferível segregar e/ou descartar a

vaca em vez de tratá-la. Outros achados interessantes dos autores mostraram que os produtores que esperavam pelo resultado da cultura para tratar os animais tiveram redução do uso de antibióticos, que a maioria deles havia estabelecido protocolos de tratamento em conjunto com um veterinário e que eles usavam diferentes antibióticos conforme o resultado da cultura. A redução no uso de antibióticos, assim como a diminuição dos dias em que o leite de animais com mastite foi descartado, haviam sido observadas anteriormente em um rebanho que implementou o uso de cultura a campo (SILVA et al., 2004).

Em relação aos produtores que haviam deixado de usar a cultura a campo, eles alegaram que o custo era elevado, tinham dificuldades em atrasar o tratamento para esperar o resultado da cultura, e não enxergavam vantagem em usar a cultura pois estavam tratando quase todos os casos de mastite com antibiótico (NESSER et al., 2006). Provavelmente propriedades com maior número de animais em lactação, que têm mais casos de mastite clínica por mês, apresentam maior probabilidade de utilizar a cultura a campo como rotina no manejo dos animais. Nessa situação, o custo geral da cultura acaba sendo diluído pela quantidade de casos presentes. A mudança de comportamento dos produtores em relação ao tratamento da mastite associado à cultura pode apresentar certa resistência. Novas pesquisas devem ajudar a modificar antigos paradigmas sobre tratamento. É possível, que em fazendas com alta prevalência de bactérias Gram positivas, o produtor acabe tendo que tratar quase todos os casos de mastite. Dessa forma a cultura pode não parecer útil, mas isso depende do interesse do produtor em formar um histórico dos casos de mastite e tratamentos usados na fazenda.

2.3.2.4 Tratamento

Em relação ao tratamento dos animais, ao total foram tomadas 196 decisões de tratamento. Treze vacas precisaram receber tratamento adicional ao que havia sido estipulado inicialmente. Cinco dessas vacas haviam sido tratadas de forma tradicional (três bisnagas no teto), quatro não haviam sido tratadas com antibiótico, três tiveram mastite de grau 3, e uma havia recebido tratamento com seis bisnagas no teto. Esses dados juntamente com os dados das amostras que tiveram cultura contaminada e isolamento de alga e levedura foram excluídos das análises de cura.

A taxa de cura bacteriológica geral encontrada no presente trabalho foi 69,7%, aproximadamente 10 pontos percentuais a menos do que a taxa observada por Langoni et al.

(2004) ao tratarem mastites clínicas com cefquinome (79,4%). Segundo a metodologia dos pesquisadores, somente foram tratados os casos de mastite em que o agente envolvido apresentou sensibilidade *in vitro* ao cefquinome. Dessa forma, é possível que a taxa de cura encontrada tenha sido influenciada pela seleção de cepas sensíveis a serem tratadas. Garino Jr et al. (2006) observaram que a taxa de cura clínica e microbiológica concomitantemente das mastites clínicas, que tiveram a sensibilidade *in vitro* avaliada para escolha do tratamento, foi superior (78,6%) à taxa de cura dos casos nos quais não foi avaliada a sensibilidade dos agentes causais (58,5%). Por outro lado, Hoe e Ruegg (2005) não verificaram associação entre susceptibilidade *in vitro* à pirlimicina e cura bacteriológica pós-tratamento para 133 casos de mastite clínica. A Tabela 9 mostra a relação do tratamento escolhido com cura bacteriológica e redução da CCS por isolamento bacteriano da fazenda.

Tabela 9 - Distribuição dos resultados de mastite clínica por cultura, tratamento e cura

| Cultura na fazenda | | | | Antibiótico (¹) | Cura bacteriológica (²) | | | Redução da CCS (³) | | |
|---|------------------|------------------|----------|---------------------------------|--------------------------------------|------------|-------|---------------------------------|------------|-------------------|
| (n) | | | | | (%) | | | | | |
| Gram positivo exceto <i>S. aureus</i> | <i>S. aureus</i> | Gram negativo | Negativo | | 14 dias | 21 dias | total | 14 dias | 21 dias | total |
| 1 | .. | 3 | 4 | 3xIMM 2xIM | 100,0 | 83,3 | 83,8 | 0,0 | 14,3 | 0,0 |
| .. | 15 | .. | .. | 6xIMM | 33,3 | 35,7 | 14,3 | 13,3 | 0,0 | 0,0 |
| 68 | .. | .. | .. | 3xIMM | 83,3 | 71,9 | 65,6 | 13,6 | 20,3 | 12,5 |
| .. | .. | 7 | .. | 3xIMM | 100,0 | 85,7 | 85,7 | 57,1 | 42,9 | 28,6 |
| .. | .. | 9 | .. | Não | 88,9 | 100,0 | 100,0 | 22,2 | 25,0 | 25,0 |
| .. | .. | .. | 36 | 3xIMM | 79,4 | 88,5 | 69,2 | 44,1 ^a | 39,3 | 35,7 ^a |
| .. | .. | .. | 31 | Não | 80,0 | 80,8 | 69,2 | 16,7 ^b | 25,9 | 11,1 ^b |

(¹) Cobactan administrado por via IMM - Intramamário e IM - Intramuscular

(²) Resultados da cultura laboratorial que não apresentaram o patógeno causador da mastite ou permaneceram negativos. Porcentagem calculada em relação ao número de observações por variável.

(³) Resultados da CCS que foram abaixo de 200.000 céls/mL. Porcentagem calculada em relação ao número de observações por variável.

^{a,b} Teste exato de Fisher ($P \leq 0,05$)

O tratamento composto por três aplicações intramamárias e duas intramuscular de cefquinome foi realizada nos animais que apresentaram mastite de grau 3. Esses animais tiveram elevada taxa de cura bacteriológica, mas a CCS do teto permaneceu aumentada. A maioria dos cultivos das mastites de grau 3 originaram bactérias Gram negativas ou ausência de crescimento. Wenz et al. (2001) também observaram que a maior parte, 42%, dos isolamentos de bactérias Gram negativas pertenceu aos animais com mastite hiperaguda. Além disso, eles registraram

bacteremia em vários animais com mastite hiperaguda e a morte de 35% dos animais com isolamento de bactéria Gram negativa. Possivelmente, a severidade da mastite clínica de grau 3 deixou sequelas que mantiveram as contagens acima de 200.000 céls/mL, levando a baixa taxa de redução da CCS verificada no presente trabalho. Bannerman et al. (2004) para estudar a reação inflamatória em tetos infectados por bactérias Gram negativas realizaram a infusão de *E. coli* em 8 tetos sadios. As mudanças foram mais acentuadas após 16 horas da infusão, sendo compostas por: elevação da temperatura corporal, aumento da permeabilidade vascular na glândula, diminuição da população de neutrófilos no sangue, aumento de substâncias pró-inflamatórias e quimio-atraentes no leite. Além disso, uma queda de 42% na produção de leite foi observada com 24 horas pós-infusão e durante dois dias foi possível isolar a bactéria no leite de aproximadamente 6 tetos, mas após 7 dias da infusão somente um teto teve isolamento positivo com reduzida contagem bacteriana. Esses achados mostram que a infecção intramamária por bactérias Gram negativas é marcada por uma reação inflamatória vigorosa e baixa persistência do patógeno na glândula mamária, o que auxilia a cura bacteriológica mas interfere na redução da CCS do teto.

Os *Staphylococcus aureus*, que foram tratados com seis aplicações de cefquinome no teto, mostraram as taxas mais baixas de cura bacteriológica e diminuição da CCS. Langoni et al. (2004) tratando 15 casos de mastite clínica por *S. aureus* com cefquinome, uma vez ao dia por três dias consecutivos, encontraram taxa de cura bacteriológica de 73,3% após 21 dias do tratamento. Normalmente, a taxa de cura bacteriológica no tratamento de *S. aureus* durante a lactação é variada, entre 4 a 92%, pois depende de fatores relacionados à bactéria, ao animal e ao tratamento escolhido (BARKEMA et al., 2006). Apesar da taxa de cura para *S. aureus* ter sido baixa no presente trabalho, o tratamento com administração estendida de antibiótico tem mostrado taxas de cura mais elevadas. Um estudo que analisou dados de quatro experimentos a respeito do tratamento de mastite clínica por *S. aureus*, 159 casos, mostrou que tetos tratados por maior período de tempo foram 2,3 vezes mais propensos a exibir cura bacteriológica (SOL et al., 2000).

A falta de êxito em eliminar o *S. aureus* do teto acaba resultando em uma inflamação crônica, já que essa bactéria é altamente adaptada a viver em associação com seu hospedeiro, o que estimula o aumento da CCS do teto. Do total dos casos de *S. aureus* tratados 86,7% já haviam apresentado mastite clínica durante a lactação e 100,0% tinham a média de CCS da

lactação acima de 200.000 céls/mL (média = 1.917.000), o que indica que esses animais possuíam infecções estabelecidas a um longo período de tempo. Hensen et al. (2000) mostraram que nas mastites persistentes causadas por *S. aureus* ocorreu colonização do epitélio mamário e invasão do tecido intersticial da glândula pela bactéria. Também, em outros casos desse tipo de mastite foi verificada a formação de abscessos no parênquima mamário como uma forma de defesa da glândula contra a bactéria (BENITES et al., 2002). O padrão de infecção invasivo do *S. aureus* acaba dificultando o contato do antibiótico com o microrganismo diminuindo a eficácia do tratamento em eliminar a bactéria. Barkema et al. (2006) apontaram fatores que diretamente reduzem a taxa de cura de *S. aureus* como sendo o maior número de parições, elevada CCS, infecções persistentes, maior número de tetos infectados por animal e alta contagem bacteriana no leite. Além dos animais tratados nesse trabalho terem infecção crônica e alta CCS, 66,7% apresentou três ou mais crias e 80,0% exibiu crescimento bacteriano maior que 50 ufc. A soma desses fatores possivelmente influenciaram a baixa taxa de cura registrada.

Todos os isolamentos de bactérias Gram positivas exceto *S. aureus* receberam tratamento tradicional para mastite clínica (três bisnagas intramamárias). Langoni et al. (2004) trataram mastites clínicas por *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae* (n = 42), com a mesma quantidade de cefquinome, e encontraram 80,6% de cura bacteriológica após 21 dias do tratamento. No presente trabalho a taxa de cura total encontrada foi menor do que a observada pelos primeiros pesquisadores e a diminuição da CCS pouco expressiva. Entretanto Garino Jr. et al. (2006) observaram taxas de cura bacteriológica de 65,5 e 76,8% para mastites clínicas por *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus spp.*, respectivamente, tratadas com cefquinome e outros dois antibióticos IMM.

As bactérias Gram negativas e os resultados com ausência de crescimento tiveram uma porção tratada de forma tradicional e outra que não recebeu tratamento antibiótico nem IMM nem IM. Os tetos com isolamento de bactérias Gram negativas que foram tratados exibiram taxa de cura total similar à encontrada por Langoni et al. (2004) tratando mastites clínica por *E. coli* (81,8%, n = 11). Ao analisar pelo resultado da cultura a campo, as taxas de cura bacteriológica e a redução da CCS, entre os casos de mastite clínica tratados e não tratados, somente foi verificada diferença na diminuição da CCS aos 14 dias pós-mastite para os isolamentos negativos ($P = 0,013$). Nesse conjunto de resultados, os tetos tratados tiveram 27,4 pontos percentuais a mais de redução da CCS do que os tetos não tratados. Zafalon et al. (2007) mostraram que tetos tratados

com antibiótico tiveram redução da CCS (118.500 céls/mL) após 30 dias em comparação com tetos não tratados (469.000 céls/mL). Da mesma forma, Rosenberg et al. (2003) avaliando tetos com CMT positivo após o parto tratados e não tratados, observaram que aos 14 e 28 dias pós-tratamento os tetos tratados mostraram redução da CCS a níveis inferiores de 200.000 céls/mL. Ao contrário do presente trabalho, nos dois trabalhos citados acima a redução da CCS foi acompanhada por uma taxa de cura bacteriológica maior nos tetos tratados.

A população composta por animais tratados com três aplicações IMM de antibiótico e não tratados foi analisada como um todo em relação à cura bacteriológica total e redução da CCS total do teto. As duas variáveis respostas, cura e redução total, não apresentaram relação com dias em leite, número de crias, grau da mastite, aparência do leite mastítico, queda da produção pós-mastite, número de tetos acometidos por mastite clínica por vaca, quantidade de ufc da amostra de leite, e tratamento antibiótico IMM. Somente cura total exibiu uma tendência em relação ao isolamento bacteriano a campo, mastites causadas por bactérias Gram negativas tiveram maior proporção de cura do que o esperado e as causadas por bactérias Gram positivas menor proporção ($P = 0,094$). Garino Jr. et al. (2006) também não verificaram diferenças significativas entre o conjunto de cura bacteriológica e clínica e forma clínica da mastite, e entre cura e agentes etiológicos dos casos clínicos. Da mesma forma, Hoe e Ruegg (2005) não observaram diferenças entre o tipo de bactéria isolada na mastite clínica (Gram positiva ou negativa) e cura bacteriológica e cura clínica.

Por outro lado, no presente trabalho, cura bacteriológica total e redução da CCS total do teto mostraram relação com reincidência clínica da mastite (Figura 19). Tanto cura bacteriológica total ($P = 0,001$) como redução da CCS total ($P = 0,009$) foram maiores no grupo de animais que nunca havia tido mastite clínica na lactação e decresceram conforme o animal apresentou mais casos de mastite clínica. Produção de leite também mostrou relação com cura total ($P = 0,010$) e redução da CCS total ($P = 0,011$). Vacas que produziram em média 30 kg de leite tiveram maior taxa de cura e redução da CCS do que vacas com produção de 25 kg. Além disso, vacas com média mensal de CCS igual a 185.454 céls/mL (mediana = 158.000) mostraram maior taxa de redução da CCS total do teto após a mastite clínica do que vacas com média de 714.260 céls/mL (mediana = 430.000) ($P = 0,010$). Esses achados mostram a importância de manter um banco de dados com informações dos animais (casos de mastite clínica na lactação, produção de leite, CCS mensal) para servir de suporte nas decisões de tratamento. No presente trabalho nenhuma

variável estudada foi capaz de explicar cura bacteriológica total e redução da CCS total do teto pós-mastite clínica, somente produção de leite mostrou uma tendência de efeito sobre cura bacteriológica total ($P = 0,055$).

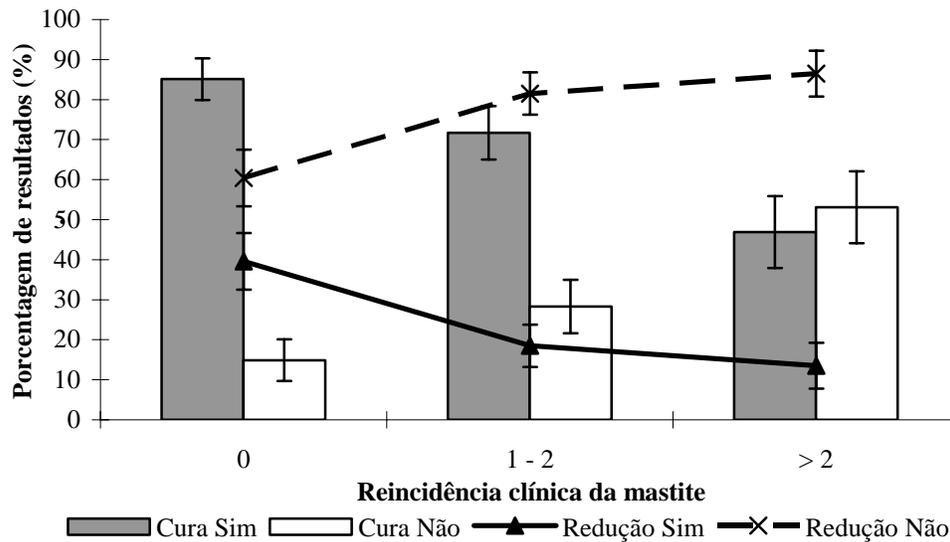


Figura 19 - Relação de cura bacteriológicas e redução da CCS com reincidência clínica da mastite durante a lactação.

De forma geral, os resultados mostraram que a utilização de antibiótico, para o tratamento de mastites clínicas de grau 1 e 2 causadas por bactérias Gram negativas ou com isolamento negativo na cultura bacteriológica, não afeta cura e CCS. As taxas de cura e redução da CCS verificadas nesse estudo podem ter sido influenciadas pela eficácia do antibiótico escolhido para os tratamentos e/ou pela quantidade de observações adquiridas. O intuito do projeto não foi avaliar a capacidade do cefquinome em curar mastites clínicas assim, o protocolo experimental carece de informações para essa questão. Wilson et al. (1999), ao analisarem cura bacteriológica em 9007 casos de mastite subclínica após um mês do tratamento para sete princípios ativos diferentes, verificaram que alguns antibióticos não mostraram diferença estatística em taxa de cura quando comparados ao grupo que não recebeu tratamento. O reduzido número amostral principalmente do conjunto das bactérias Gram negativas enfraquece as análises estatísticas podendo causar erros. Outros estudos são necessários para confirmar os benefícios do uso de protocolos de tratamento guiados pela cultura bacteriológica. A utilização em conjunto de antimicrobianos de variados princípios ativos nos protocolos de tratamento pode ser pesquisada

em grande extensão, principalmente no Brasil diante da vasta oferta de produtos registrados com indicação para o tratamento de mastite. Raia Jr e Costa (2006) realizaram um levantamento dos medicamentos catalogados no Compêndio de Produtos Veterinários do SINDAN 2003-2004 e encontraram 121 produtos comerciais para o tratamento da mastite bovina sendo 28 com aplicação por via IMM e 93 por via IM.

Apesar disso, levando em consideração o custo da cultura realizada na fazenda e a acurácia de tal método, certamente trata-se de uma ferramenta interessante para aplicação a campo. O custo do material (tubo estéril, luva, algodão, swab, placas com os meios de cultura) usado por caso de mastite clínica para cultura a campo foi estimado em R\$ 6,70 em setembro de 2007. A partir do custo de um tratamento convencional de mastite clínica, três aplicações IMM de antibiótico mais sete dias de descarte de leite, de R\$ 77,00 (Zafalon et al., 2007) a cultura feita na fazenda representaria somente 8,7% do total gasto no tratamento do animal. No presente trabalho, devido ao preço mais elevado do cefquinome e a maior produção de leite dos animais, o custo do tratamento convencional foi R\$ 124,60 sendo o valor da cultura ainda mais baixo em relação ao total gasto (5,4%).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O teste Somaticell foi capaz de determinar corretamente a CCS de amostras de leite de quartos mamários. Os resultados do teste apresentaram alta correlação com a CCS realizada por equipamento automatizado. Além disso, o teste mostrou adequada validade para determinar infecções intramamárias usando um ponto de corte de 205.000 céls/mL.

Uma pequena variação foi verificada nos resultados do teste quando realizado por diferentes pessoas ou pela mesma pessoa mais de uma vez. Apesar dessa diferença não ter sido significativa e nem ter afetado a quantidade de amostras classificadas como contendo mastite subclínica, ela mostrou que os procedimentos do teste podem levar a variações do resultado.

O uso de amostras de leite conservadas a 4 °C por 5 horas não influenciou os resultados do teste Somaticell. Entretanto, quando o teste foi realizado com amostras de leite que foram congeladas a -20°C ou adicionadas do conservante bronopol, e posteriormente armazenadas por 3 dias, ocorreu decréscimo dos valores da CCS realizada pelo teste.

A mastite clínica causada por bactérias Gram positivas e Gram negativas mostrou características diferentes em relação ao nível dos sintomas e ao animal. As bactérias Gram positivas foram em maioria isoladas de casos de mastite com alteração visual do leite e edema de úbere, de vacas reincidentes e com CCS maior de 200.000 céls/mL. As bactérias Gram negativas foram recuperadas mais vezes de casos de mastite de grau 3 de vacas de alta produção. As culturas microbiológicas de amostras mastíticas com ausência de crescimento apresentaram grau da mastite e perfil do animal variados. O conjunto das amostras que obtiveram cultura negativa possivelmente foi formado por uma mistura de casos de mastite com real ausência de bactéria na amostra e presença de bactéria não recuperada pela cultura laboratorial.

A cultura bacteriológica realizada na fazenda com o conjunto dos meios Sangue Base Azida, MacConkey e Vogel-Johnson, mostrou adequada recuperação das bactérias presentes na amostra de leite mastítico. Somente o isolamento positivo no meio Vogel-Johnson demandou maior atenção para leitura do crescimento de *Staphylococcus aureus*, já que somente as colônias negras, brilhantes e circundadas por zona amarelo-ouro devem ser consideradas *S. aureus*. O cultivo feito na fazenda teve a vantagem de usar amostras de leite frescas, porém a leitura precoce do crescimento bacteriano e a metodologia simples que foram utilizadas reduziram a acurácia da cultura. Ao utilizar a cultura laboratorial como padrão ouro para determinar a validade da cultura

realizada na fazenda, esta mostrou apropriada capacidade e concordância moderada para determinar o diagnóstico bacteriológico da mastite clínica. A validade da cultura a campo foi positivamente influenciada pelo isolamento de bactérias Gram positivas e negativamente influenciada pelo isolamento de bactérias Gram negativas e resultados com ausência de crescimento. O único efeito observado sobre a concordância das culturas bacteriológicas foi do número de unidades formadoras de colônia da amostra de leite.

As mastites clínicas de grau 3 tratadas com a administração de antibiótico IMM e IM apresentaram elevada taxa de cura bacteriológica, mas pouca redução da CCS de teto possivelmente pela severidade da doença. As mastites com isolamento de *S. aureus* tratadas com terapia antibiótica IMM estendida tiveram baixa taxa de cura e redução da CCS. A maioria dos animais infectados por *S. aureus* exibiram características que prejudicam a eficácia do tratamento contra essa bactéria. O tratamento da mastite clínica de grau 1 e 2 sem a utilização de antibiótico IMM não mostrou diferença, em cura bacteriológica e redução da CCS do teto quando comparado a sua utilização, nos casos em que bactérias Gram negativas ou isolamentos negativos foram originados na cultura realizada na fazenda. O número amostral da população que foi estudada para essa conclusão certamente não favorece as análises estatísticas. Outras pesquisas utilizando protocolos de tratamento guiados pela cultura bacteriológica com diferentes antibióticos seriam importantes.

A utilização de um método prático de identificação bacteriana seria útil para o suporte e direcionamento do tratamento da mastite clínica em fazendas leiteiras. A partir do conhecimento do agente causador em curto intervalo de tempo, entre a detecção da doença e o diagnóstico bacteriológico, o tratamento poderia ser escolhido visando a melhor resposta à cura e, possivelmente, a redução do uso de antibióticos. Além disso, o diagnóstico bacteriológico a campo poderia ser aplicado em outras áreas no controle da mastite como por exemplo para avaliação de animais comprados que serão introduzidos no rebanho, para estimar o sucesso do tratamento de vaca seca, para determinar o estado de infecção de vacas que mostram aumento repentino da CCS, ou ainda, para segregação de animais com mastite por *S. aureus*. Certamente, a cultura realizada na fazenda não tem o intuito de substituir a cultura padrão feita em laboratório e sim, pretende servir como mais uma ferramenta a campo para o controle da mastite.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, T.G.R. **Caracterização de propriedades leiteiras com relação ao conhecimento técnico, gestão administrativa e atendimento das necessidades humanas**. 2008. 169 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- BANNERMAN, D.D.; PAAPE, M.J.; LEE, J.W.; ZHAO, X.; HOPE, J.C.; RAINARD, P. Escherichia coli and Staphylococcus aureus elicit differential innate immune responses following intramammary infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 11, n. 3, p. 463-472, May. 2004.
- BARKEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y.H.; ZADOKS, R.N. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 89, n. 6, p. 1877-1895, Jun. 2006.
- BARKEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y.H.; LAM, T.J.; GALLIGAN, D.T.; BEIBOER, M.L.; BRAND, A. Estimation of interdependence among quarters of the bovine udder with subclinical mastitis and implications for analysis. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 80, n. 8, p. 1592-1599, Aug. 1997a.
- BARKEMA, H.W.; VAN DER SCHANS, J.; SCHUKKEN, Y.H.; DE GEE, A.L.; LAM, T.J.; BENEDICTUS G. Effect of freezing on somatic cell count of quarter milk samples as determined by a Fossomatic electronic cell counter. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 80, n. 2, p. 422-426, Feb. 1997b.
- BARKEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y.H.; LAM, T.J.; BEIBOER, M.L.; WILMINK, H.; BENEDICTUS, G.; BRAND, A. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 81, n. 2, p. 411-419, Feb. 1998.
- BARRATT, K.; LESLIE, K.; BASHIRI, A. An evaluation of the PortaSCCTM test for determining udder health status in dairy cows at dry off. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING, 42., 2003, Fort Worth. **Resumos...** Verona: National Mastitis Council, 2003. p. 280-281.
- BENITES, N.R.; GUERRA, J.L.; MELVILLE P.A.; COSTA, E.O. Aetiology and histopathology of bovine mastitis of spontaneous occurrence. **Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Disease and Veterinary Public Health**, Berlin, v. 49, n. 8, p. 366-370, Oct. 2002.
- BERTRAND, J.A. Influence of shipping container, preservative, and breed on analysis of milk components of shipped samples. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 79, n. 1, p. 145-148, Jan. 1996.

- BRITO, J.R.F.; PINTO, S.M.; SOUZA, G.N.; ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; SILVA, M.R. Adoção de boas práticas em propriedades leiteiras tecnificadas como um passo para a produção de leite seguro. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 32, n. 2, p. 125-131, 2004.
- BRITO, J.R.F.; CALDEIRA, G.V.; VERNEQUE, R.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, Abr./Jun. 1997.
- COSTA, E.O.; BENITES, N.R.; MELVILLE, P.A.; PARDO, R.B.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 4, p. 156-158, 1995.
- DELLA LIBERA, A.M.M.P.; KITAMURA, S.S.; ROSENFELD, A.M.F.; GARCIA, M.; MIRANDOLA, R.S.; ARAUJO, W.P. Influência do tipo de leite produzido no emprego da contagem de células somáticas para o diagnóstico das afecções da glândula mamária. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 4, p. 33-39, Out./Dez. 2002.
- DINGWELL, R.; GODDEN, S.; KELTON, D.; LESLIE, K.; SCHUKKEN, Y. Misclassification of udder health status due to culture of single versus duplicate quarter milk samples. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING, 46., 2007, San Antonio. **Resumos...** Verona: National Mastitis Council, 2007. p. 258-259.
- DINSMORE, R.P.; ENGLISH, P.B.; GONZALEZ, R.N.; SEARS, P.M. Use of augmented cultural techniques in the diagnosis of the bacterial cause of clinical bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 75, n. 10, p. 2706-2712, Oct. 1992.
- ERSKINE, R.J.; EBERHART, R.J. Herd benefit-to-cost ratio and effects of a bovine mastitis control program that includes blitz treatment of *Streptococcus agalactiae*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 196, n. 8, p. 1230-1235, Apr. 1990.
- FOX, L.K.; GASKINS, C.T.; HANCOCK, D.D.; NEWKIRK, D.; HUTTON, C.T. Comparison of media to isolate *Staphylococcus aureus* from teat skin and milking unit liners. **The Cornell Veterinarian**, Ithaca, v. 82, n. 3, p. 225-231, Jul. 1992.
- GARINO JR, F.; WATANABE, E.T.; SANTOS, F.G.B.; BALBINO, T.C.L.; COSTA, E.O. Eficácia terapêutica em mastite clínica e análise de fatores preditivos. **Napgama**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 9-16, 2006.
- GODDEN, S.; LAGO, A.; BEY, R.; LESLIE, K.; RUEGG, P.; DINGWELL, R. Use of on-farm culture systems in mastitis control programs. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL REGIONAL MEETING, 2007, Visalia. **Anais...** Verona: National Mastitis Council, 2007. p. 1-9.
- GORDIS, L. Avaliação da validade e da confiabilidade dos testes diagnósticos e de rastreamento. **Epidemiologia**. Rio de Janeiro: Revinter, 2. ed., 2004. cap. 4, p. 63-81.

HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 77, n. 7, 2103-2112, Jul. 1994.

HENSEN, S.M.; PAVIČIĆ, M.J.; LOHUIS, J.A.; DE HOOG, J.A.; POUTREL, B. Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 83, n. 9, p. 1966-1975, Sep. 2000.

HESS, J.L.; NEUDER, L.M.; SEARS, P.M. Rethinking clinical mastitis therapy. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING, 42., 2003, San Antonio. **Resumos...** Verona: National Mastitis Council, 2003. p. 372-373.

HOE, F.G.; RUEGG, P.L. Relationship between antimicrobial susceptibility of clinical mastitis pathogens and treatment outcome in cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 227, n. 9, 1461-1468, Nov. 2005.

HOCHHALTER, J.; GODDEN, S.; BEY, R.; LAGO, A.; JONES, M. Validation of the Minnesota Easy Culture System II: Results from in-lab bi-plate culture versus standard laboratory culture, and bi-plate inter-reader agreement. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF BOVINE PRACTITIONERS, 39., 2006, Saint Paul. **Resumos...** Opelika: American Association of Bovine Practitioners, 2006. p. 298-299.

JONES, M.; HOCHHALTER, J.; BEY, R.; LAGO, A.; GODDEN, S. Validation of the Minnesota Easy Culture System II: Results from in-lab tri-plate culture versus standard laboratory culture, and tri-plate inter-reader agreement. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF BOVINE PRACTITIONERS, 39., 2006, Saint Paul. **Resumos...** Opelika: American Association of Bovine Practitioners, 2006. p. 299-300.

KRISTULA, M.A. Evaluation of the Hy-Mast test to classify clinical mastitis cases as either Gram positive or negative. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING, 38., 1999, Arlington. **Resumos...** Verona: National Mastitis Council, 1999. p. 218-219.

LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, Arlington, v. 33, p. 159-174, 1977.

LANGONI, H.; SILVA, R.C.; LUCHEIS, S.B.; Husne, M. Utilização do Cefquinome no tratamento da mastite bovina. **Napgama**, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 3-5, 2004.

LANGONI, H.; SILVA, A.V.; CABRAL, K.G.; DOMINGUES, P.F. Aspectos etiológicos na mastite bovina: Flora bacteriana aeróbica. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 5, p. 204-210, 1998.

LAW, W. A quantitative cow-side somatic cell count test with a portable reflectometer. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING, 43., 2004, Charlotte. **Resumos...** Verona: National Mastitis Council, 2004. p. 335-336.

LIMBERT, M.; ISERT, D.; KLESEL, N.; MARKUS, A.; SEEGER, K.; SEIBERT, G.; SCHRINNER, E. Antibacterial activities in vitro and in vivo and pharmacokinetics of cefquinome (HR 111V), a new broad-spectrum cephalosporin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 35, n. 1, p. 14 -19, Jan. 1991.

MEYER, P.M. **Fatores não-nutricionais que afetam as concentrações de nitrogênio uréico no leite**. 2003. 131 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

MILNE, M.H.; BIGGS, A.M.; FITZPATRICK, J.L.; INNOCENT, G.T.; BARRETT, D.C. Use of clinical information to predict the characteristics of bacteria isolated from clinical cases of bovine mastitis. **The Veterinary Record**, London, v. 152, n. 20, p. 615-617, May. 2003.

MOON, J.S.; KOO, H.C.; JOO, Y.S.; JEON, S.H.; HUR, D.S.; CHUNG, C.I.; JO, H.S.; PARK, Y.H. Application of a new portable microscopic somatic cell counter with disposable plastic chip for milk analysis. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 90, n. 5, p. 2253-2259, May. 2007.

MORIN, D.E.; SHANKS, R.D.; MCCOY, G.C. Comparison of antibiotic administration in conjunction with supportive measures versus supportive measures alone for treatment of dairy cows with clinical mastitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 213, n. 5, p. 676-684, Sep. 1998.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Laboratory and field handbook on bovine mastitis**. 1th ed. Verona, 1987. p. 151.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality**. 4th ed. Verona, 2004. 47 p.

NEIJENHUIS, F.; BARKEMA, H.W.; HOGEVEEN, H.; NOORDHUIZEN, J.P. Classification and longitudinal examination of callused teat ends in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 83, n. 12, p. 2795-2804, Dec. 2000.

NEESER, N.L.; HUESTON, W.D.; GODDEN, S.M.; BEY, R.F. Evaluation of the use of an on-farm system for bacteriologic culture of milk from cows with low-grade mastitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 228, n. 2, p. 254-260, Jan. 2006.

ØSTERÅS, O.; SØLVERØD, L.; REKSEN, O. Milk culture results in a large Norwegian survey-effects of season, parity, days in milk, resistance, and clustering. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 89, n. 3, p. 1010-1023, Mar. 2006.

OXOID. **Manual**, traduzido por Franco, B. D. G. M.; Landgraf, M. E.; Landgraf, M. 8th ed. São Paulo, 2000. 1 v.

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

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical veterinary microbiology**. Danvers, 1994. 648 p.

RAIA JR, R.; COSTA, E.O. Deficiências das informações técnicas (bulas) em produtos para tratamento de mastite como fator predisponente para a ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite. **Napgama**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 3-8, 2006.

READ JR, R.B.; REYES, A.L.; BRADSHAW, J.G.; PEELER, J.T. Evaluation of seven procedures for detection of abnormal milk due to mastitis. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 52, n. 9, p. 1359-1367, Sep. 1969.

ROBERSON, J.R. Establishing treatment protocols for clinical mastitis. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Orlando, v. 19, n. 1, p. 223-234, Mar. 2003.

ROSENBERG, J.B.; LOVE, B.C.; PATTERSON, D.L. Bacterial cure and somatic cell count response of dairy cows with a positive California Mastitis Test at calving to therapy with cephapirin sodium. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING, 42., 2003, Fort Worth. **Resumos...** Verona: National Mastitis Council, 2003. p. 366-367.

RODRIGUES, A.C.; CARAVIELLO, D.Z.; RUEGG, P.L. Management of Wisconsin dairy herds enrolled in milk quality teams. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 88, n. 7, p. 2660-2671, Jul. 2005.

RUEGG, P.L. Investigation of mastitis problems on farms. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Orlando, v. 19, n. 1, p. 47-73, Mar. 2003.

RUEGG, P.L.; HULLAND, C.; RIETH, B. Performance of the Direct Cell Counter used on milk samples obtained from fresh cows. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING, 44., 2005, Orlando. **Resumos...** Verona: National Mastitis Council, 2005. p. 291-292.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. Principais agentes causadores da mastite. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole, 1. ed., 2007. cap. 3, p. 24-37.

SANTOS, E.M.P.; BRITO, M.A.V.P.; LANGE, C.C.; BRITO, J.R.F.; CERQUEIRA, M.M.O.P. Streptococcus e gêneros relacionados como agentes etiológicos de mastite bovina. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, n. 1, p. 17-27, 2007.

SARIKAYA, H.; BRUCKMAIER, R.M. Importance of the sampled milk fraction for the prediction of total quarter somatic cell count. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 89, n. 11, p. 4246-50, Nov. 2006.

SAS INSTITUTE. **SAS User's Guide: Statistics**. Version 9.1 for Windows. SAS Institute Inc. Cary, 2002-2003.

SCHUKKEN, Y.H.; GROMMERS, F.J.; SMIT, J.A.; VANDEGEER, D.; BRAND, A. Effect of freezing on bacteriologic culturing of mastitis milk samples. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 72, n. 7, p. 1900-1906, Jul. 1989.

- SILVA, B.; CARAVIELLO, D.; RODRIGUES, A.; RUEGG, P. Use of Petrifilm™ for mastitis diagnosis and treatment protocols. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING, 43., 2004, Charlotte. **Anais...** Verona: National Mastitis Council, 2004. p. 52-59.
- SILVA, B.O.; CARAVIELLO, D.Z.; RODRIGUES, A.C.; RUEGG, P.L. Evaluation of Petrifilm for the isolation of *Staphylococcus aureus* from milk samples. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 88, n. 8, p. 3000-3008, Aug. 2005.
- SOL, J.; SAMPIMON, O.C.; BARKEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y.H. Factors associated with cure after therapy of clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 83, n. 2, p. 278-284, Feb. 2000.
- SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; MOREIRA, C.; BRITO, M.A.V. P.; BASTOS, R.R. Fatores de risco associados a alta contagem de células somáticas do leite do tanque em rebanhos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, supl. 2, p. 251-260, Abr. 2005.
- THOMPSON, D.I.; POSTLE, D.S. The Wisconsin Mastitis Test - an indirect estimation of leucocytes in milk. **Journal of Milk and Food Technology**, Des Moines, v. 27, p. 271-275, 1964.
- TORRES, A.; BERMUDEZ, V.; ZAMBRANO, H.; GARCIA, M. Evaluation of the Hy-Mast test to detect *Staphylococcus* on clinical mastitis cases. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING, 39., 2000, Atlanta. **Resumos...** Verona: National Mastitis Council, 2000. p. 209-210.
- ZAFALON, L.F.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J.V.; RESENDE, F.D. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibiotico terapia de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 3, p. 577-585, Jun. 2007.
- WAAGE, S.; JONSSON, P.; FRANKLIN, A. Evaluation of a cow-side test for detection of gram-negative bacteria in milk from cows with mastitis. **Acta Veterinaria Scandinavica**, London, v. 35, n. 2, p. 207-212, 1994.
- WAGNER, S.; ERSKINE, R.; RIEKERINK, R.O. 2000. Outcomes of on-farm culture-based mastitis therapy. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING, 46., 2007, San Antonio. **Resumos...** Verona: National Mastitis Council, 2007. p. 200-201.
- WENZ, J.R.; BARRINGTON, G.M.; GARRY, F.B.; MCSWEENEY, K.D.; DINSMORE, R.P.; GOODELL, G.; CALLAN, R.J. Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 219, n. 7, p. 976-981, Oct. 2001.
- WHITE, M.E.; MONTGOMERY, M.E. The resemblance of clinical attributes between mastitic cows with no growth on bacterial milk cultures and those with gram-positive bacteria cultured. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 51, n. 2, p. 181-184, Apr. 1987.

WILSON, D.J.; GONZALEZ, R.N.; CASE, K.L.; GARRISON, L.L.; GRÖHN, Y.T. Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 82, n. 8, p. 1664-1670, Aug. 1999.

YAZDANKHAH, S.P.; SORUM, H.; LARSEN, H.J.; GOGSTAD, G. Rapid method for detection of gram-positive and -negative bacteria in milk from cows with moderate or severe clinical mastitis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 9, p. 3228-3233, Sep. 2001.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Fórmula dos meios de cultura da marca OXOID utilizados para cultura na fazenda

Agar Sangue Base Azida (OXOID CM259) g/L

| | |
|------------------|-----------|
| Triptose | 10,0 |
| Extrato de carne | 3,0 |
| Cloreto de sódio | 5,0 |
| Azida sódica | 0,2 |
| Agar | 12,0 |
| pH | 7,2 ± 0,2 |

Agar MacConkey (OXOID CM115) g/L

| | |
|--------------------|-----------|
| Peptona | 20,0 |
| Lactose | 10,0 |
| Sais biliares nº 3 | 1,5 |
| Cloreto de sódio | 5,0 |
| Vermelho neutro | 0,03 |
| Cristal violeta | 0,001 |
| Agar | 15,0 |
| pH | 7,1 ± 0,2 |

Agar Vogel-Johnson (OXOID CM641) g/L

| | |
|---------------------|-----------|
| Triptona | 10,0 |
| Extrato de levedura | 5,0 |
| Manitol | 10,0 |
| Fosfato dipotássico | 5,0 |
| Cloreto de lítio | 5,0 |
| Glicina | 10,0 |
| Vermelho de fenol | 0,025 |
| Agar | 16,0 |
| pH | 7,1 ± 0,2 |

ANEXO

ANEXO A - Questionário Aplicado às Propriedades Leiteiras

Ficha da Propriedade
Projeto Identificação e Tratamento de Mastite Clínica

Proprietário ou funcionário responsável: _____

Endereço para correspondência: _____

1. A produção de leite é a atividade principal da propriedade? ()Sim ()Não
2. Há quantos anos você trabalha com leite? _____ anos
3. Você pretende aumentar o número de animais para produção de leite? ()Sim ()Não
4. Número total de animais em lactação: _____ animais
5. Número de animais em primeira lactação (novilhas dando leite): _____ animais
6. Produção diária de leite: _____ kg
7. Contagem bacteriana total (CBT) do leite nos três últimos meses:
último mês _____
penúltimo mês _____
antepenúltimo mês _____
8. Contagem de células somáticas (CCS) do leite nos três últimos meses:
último mês _____
penúltimo mês _____
antepenúltimo mês _____
9. A análise de CCS do leite é usada pelo laticínio para calcular o preço do leite? ()Sim ()Não
10. Você acha que precisa melhorar a qualidade do seu leite? ()Sim ()Não
11. Qual o sistema de produção dos animais? ()Pasto ()Confinado
12. Qual o sistema de ordenha? ()Balde ao pé ()Canalizado
13. Quantas ordenhas são feitas por dia? ()Uma ()Duas ()Três
14. As vacas são alimentadas durante a ordenha? ()Sim ()Não
15. Quem faz a ordenha das vacas? ()Próprio proprietário ()Funcionário responsável

16. Quantas pessoas têm a função de ordenhar as vacas na propriedade? _____ pessoas
17. É usado luva nas mãos para ordenhar as vacas? ()Sim ()Não
18. Marque os passos que você usa para preparar as vacas para a ordenha:
- ()Tira os primeiros jatos de leite do teto
- ()Lava o teto com água
- ()Coloca desinfetante no teto
- ()Seca o teto com papel
19. É colocado desinfetante no teto das vacas após a ordenha? ()Sim ()Não
20. Você tem um tanque de refrigeração para armazenar o leite? ()Sim ()Não
21. Você usa o teste de CMT (teste da raquete) no leite das vacas? ()Sim ()Não
22. Você trata as vacas com mastite clínica com qual antibiótico?
- No teto _____
- No músculo _____
23. Quantas pessoas têm a função de tratar as vacas com mastite? _____ pessoas
24. Você anota o tratamento das vacas em um caderno? ()Sim ()Não
25. Você separa as vacas com problema de mastite para ordenhar por último? ()Sim ()Não
26. Você usa antibiótico de vaca seca quando seca as vacas? ()Sim, qual: _____ ()Não

ANEXO B - Classificação da aparência do esfíncter do teto

ESCORE DO ESFÍNCTER DO TETO**ESCORE 1**

Não formação de calo

ESCORE 2

Leve ou ligeiro calo

ESCORE 3

Calo com um pouco de prolapso

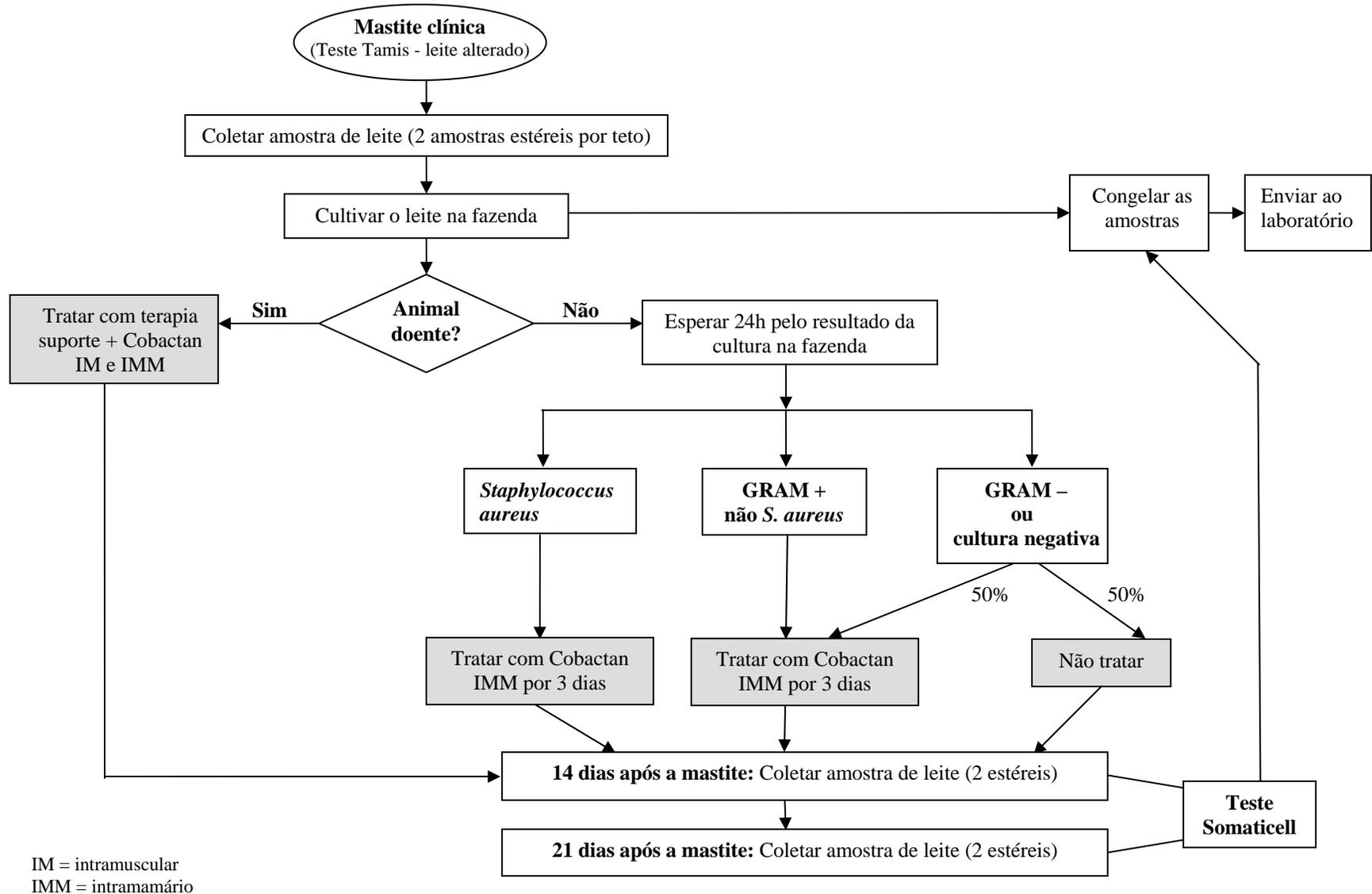
ESCORE 4

Calo com prolapso intenso



Fonte: Pamela L. Ruegg & Douglas J. Reinemann, 2005.

ANEXO C - Fluxograma da metodologia do projeto



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)