

Agentes etiológicos em diferentes fases de lactação em vacas produtoras de leite para consumo humano na região de Imperatriz – MA

Manoel de Oliveira Dantas^{1*}, José Fábio França Orlanda², Marcelo Francisco da Silva³, Jozivaldo Silva Mota⁴, Murilo Barros Alves⁵

¹Professor Doutor em Fisiologia Médica UEMA, pesquisador CESI/UEMA cardioequino@hotmail.com,

²Chefe do laboratório do Departamento de Biologia Animal do CESI-UEMA Doutor em Química Analítica fFranca@cesi.uema.br,

³Biólogo Ex-diretor do curso de Ciências Biológicas do CESI/UEMA mfsilva@cesi.uema.br – Colaborador,

⁴Msc, Médico Veterinário, clínica de equinos e bovinos de Imperatriz-M, jozivaldovet@hotmail.com

⁵Professor de Estatística Experimental do CESI - UEMA – Imperatriz - MA, muriloimp@yahoo.com.br

RESUMO. O presente trabalho teve como objetivo registrar a predominância de agentes etiológicos a sensibilidade de microorganismo a mastite bovina em animais de fazendas produtoras de leite para consumo humano e as diferentes fases de infecção da mesma. As amostras de leite foram coletadas na primeira ordenha e antes era realizado em cada quarto o teste rápido do Califórnia Mastite Teste, que após seu resultado era recolhido nova amostra para a lactocultura e teste de sensibilidade aos antibióticos. As amostras eram condicionadas em caixas térmicas e conduzidas ao laboratório multidisciplinar de Biologia animal da Universidade Estadual do Maranhão. Da amostra de leite era retirado 0,5 mL e adicionado a tubos de ensaio com 4,5 mL de Brain Heart Infusion (BHI), para diluições seriadas até 10³. Em seguida eram levadas à estufa por 24 horas a 37°C e após 24h, a diluição seriada 10³ do leite em BHI (1 ml), era transferida para Placas de Petri contendo ágar específico para o crescimento de *Staphylococcus sp*, e as placas eram levadas à estufa por 24 horas a 37°C para o crescimento de colônias. Os microrganismos eram isolados em ágar específico e identificados por meio da coloração diferencial de Gram e produção de catalase, realizado em lâmina, adicionando a uma colônia, 0,2 mL de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) 3%. A prova da sensibilidade das cepas de *Staphylococcus sp* isoladas das amostras de leite foram realizadas pelo método dos discos impregnados com antibióticos. As cepas eram semeadas em tubos contendo BHI e incubadas a 37°C durante 24 horas. Após a incubação, um Swab era umedecido no caldo cultivado e semeado em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton. Os antibióticos utilizados nos testes foram: Penicilina G (PEN 10), Clorafenicol (CLO 30), Cefalotina (CFL 30) e Amicacina (AMI 30), que mostraram maior sensibilidade ao princípio ativo Cefalotina com um halo de inibição de 3,4 cm de diâmetro em média, seguido do Clorafenicol com 3,0 cm de diâmetro, a Amicacina com 2,0 cm de diâmetro e por fim a Penicilina G com um halo de inibição bacteriana apenas de 1,6 cm de diâmetro. Vacas em segunda lactação apresentaram alto índice de contaminação e detectou-se mastite subclínica em 73% das vacas testadas e índice de resistência bacteriana a Penicilina G.

Palavras chave: células somáticas, mastite, *Staphylococcus*

Etiologic Agent in different phases of lactation in cows producing milk for human consumption in the region of Imperatriz – MA

ABSTRACT. This study aimed to record the predominant etiologic agents of microorganism sensitivity to bovine mastitis in farm animals producing milk for human consumption and the different stages of infection from it. Milk samples were collected at the first milking and before it was done in each quarter of the rapid test California

Mastitis Test, after which his result was taken for the new sample lactocultura and sensitivity testing to antibiotics. The samples were conditioned in a thermal box and led the multidisciplinary laboratory animal biology at the State University of Maranhão. Sample of milk was 0.5 mL and added to test tubes with 4.5 mL of Brain Heart Infusion (BHI) for dilutions up to 10^3 . Then they were placed in the incubator for 24 hours at 37°C . After 24 hours of emissions, the serial dilution 10^3 milk in BHI (1mL) was transferred to Petri dishes containing agar specific for the growth of *Staphylococcus sp*, and the plates were placed in the incubator for 24 hours at 37°C for growth of colonies, microorganisms were isolated in specific agar and identified by means of differential staining of Gram and catalase production, performed in a slide, adding to a colony, 0.2 mL of H_2O_2 (hydrogen peroxide) 3%. The proof of the sensitivity strains of *Staphylococcus spp* isolated from milk samples were performed by using disks impregnated with antibiotics. The strains were grown in test tubes containing BHI and incubated at 37°C for 24 hours. After incubation, a swab moistened in broth was cultivated and sown in Petri dishes containing Mueller-Hinton agar. The antibiotics used in the tests were: Penicillin G (PEN 10), Chloramphenicol (CLO 30), cephalothin (CFL 30) and amikacin (AMI 30), which showed greater sensitivity to cephalothin active principle with an inhibition halo of 3.4 cm in diameter on average followed by Chloramphenicol at 3.0 cm in diameter, the Amikacin with 2.0 cm and finally diameter penicillin G with a halo of bacterial inhibition of only 1.6 cm in diameter. Cows in second lactation had a high rate of contamination was detected and clinical mastitis in 73% of cows tested and index of bacterial resistance to penicillin G.

Keywords: Somatic cells, mastitis, *Staphylococcus*,

Introdução

A mastite é a infecção mais freqüente dos animais destinados à produção de leite, e que mais onera a pecuária leiteira. As perdas econômicas são causadas tanto a honorários profissionais, medicamentos, morte ou descarte precoce de animais, como em nível de laticínios, pela queda na qualidade do produto final e diminuição no rendimento industrial para a fabricação dos seus derivados e pelas alterações na composição do leite mastítico (Fonseca, 2000).

Sob o ponto de vista de saúde pública, deve-se considerar que quando esta afecção é desencadeada por agentes infecciosos, o que ocorre em sua grande maioria, existe alto risco de sua transmissão ao homem, a partir do leite contaminado. A mamite (do latim *mammae*) ou mastite (do grego *mastos*) bovina é uma doença de grande importância, sobre há qual muito se tem investigado. Identificar uma mama doente, na maioria dos casos não representa uma tarefa difícil, mas considerar um quarto efetivamente sadio ou em vias de apresentar alguma alteração ainda é discutível. Além disso, a maioria das mamites apresenta-se sem sinais físicos de processo inflamatório agudo, sendo crônicas ou incipientes e, apesar do aspecto inofensivo,

causam sérios prejuízos econômicos e servem de fonte de infecção (Ribeiro et al., 2001). A mastite é definida como uma inflamação da glândula mamária, a qual freqüentemente tem origem bacteriana (Peeler et al., 2003, Santos et al., 2004). Mais de 80 diferentes espécies de microrganismos foram identificadas como agentes causadores de mastite bovina, sendo que as espécies mais freqüentemente isoladas são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* (Holtenius et al., 2004).

Segundo Sears et al. (1993) a qualidade do leite está diretamente relacionada com saúde, alimentação e manejo dos animais, com a qualidade da mão-de-obra, manejo adequado dos equipamentos e utensílios utilizados durante a ordenha e transporte até a indústria. Todos esses fatores influenciam a sua composição original (proteína, gordura, etc.) e, as características de sabor, cheiro e viscosidade, certificando ou não a qualidade do produto (Radostits et al., 2002).

Deve-se ter como objetivo principal no manejo de ordenha, assegurar que os tetos estejam limpos e secos antes do seu início. Além disso, recomenda-se que os animais sejam conduzidos para a sala de ordenha de forma

tranqüila, sem atropelos ou agressões. O bom funcionamento da sala de ordenha é obrigatório para se medir o nível de eficiência e qualidade, devendo ser limpa e arejada, desinfetada uma vez por semana, com produtos a base de cresóis ou cal virgem, os latões e baldes devem ser previamente limpos com água e sabão e colocados de cabeça para baixo, e deve-se evitar a presença de pessoas estranhas para não estressar os animais (Santos et al., 2004).

É importante estabelecer a "linha de ordenha", ou seja, vacas com infecções, principalmente mastite, devem ser ordenhadas por último, para não contaminarem animais sadios. Recomenda-se ordenhar animais em lotes de acordo com o estado sanitário. Primeiro novilhas primíparas; depois vacas que nunca tiveram mamite, seguidas pelas que foram curadas; e por último ordenhar as que estão em tratamento (Peeler et al., 2003).

Indica-se que seja feita antes da ordenha a lavagem completa das mãos dos ordenhadores com água e sabão, seguida preferencialmente pela desinfecção em solução desinfetante à base de cloro, iodo ou clorexidina. Os primeiros três ou quatro jatos devem ser retirados em uma "caneca telada" ou de "fundo preto", com objetivo de diagnosticar a mastite clínica e estimular a "descida" do leite (Santos et al., 2004).

Deve-se salientar a realização do *pré e pós-dipping*. Onde a imersão dos tetos em solução desinfetante antes da ordenha reduz o número de novas infecções, lembrando que após a execução do *pré-dipping* deve ser feita secagem dos tetos com papel toalha descartável. A imersão de tetos na pós-ordenha em solução desinfetante cobrindo toda extensão do teto é recomendada, principalmente para o controle de mastite ambiental. Logo após o *pós-dipping*, o animal sai da sala e recebe alimentação e água de boa qualidade. Essa prática faz com que o animal permaneça de pé durante o período em que o esfíncter da teta ainda não esteja completamente fechado (Dingwell et al., 2004).

Em termos de manejo externo, o período seco é um momento crucial para as vacas, pois elas se estressam devido à interrupção da ordenha e deixam de receber cuidados diários de desinfecção de tetos, tornando-se extremamente susceptíveis a mastite.

Segundo Santos et al. (2004) a colonização da glândula mamária bovina por bactérias

patogênicas resulta em eventos que conduzem a alterações na composição do leite. Inicialmente ocorrem elevados níveis de bactérias patogênicas, seguido pelo aumento marcante no número de células somáticas.

De acordo com Radostits et al. (2002), as alterações mais importantes no leite são descolorações, presença de coágulos e grande número de leucócitos. Segundo Peeler et al. (2003) quando um agente patogênico invade a glândula mamária, o organismo do animal reage, mandando para o local célula de defesa, principalmente leucócitos, a maioria neutrófilos polimorfo nucleares, para tentar reverter o processo infeccioso. Essas células de defesa somadas as células de descamação do epitélio secretor são chamadas células somáticas.

A mastite faz com que as células epiteliais do tecido secretor, os alvéolos, sejam substituídas por tecido conjuntivo, ocasionando queda na produção de leite, pois para células somáticas alcançarem o interior dos alvéolos e combater as bactérias, passam por entre duas células secretoras de leite e acabam destruindo estas células (Sommerhäuser et al., 2003).

Geralmente, os cálculos das perdas econômicas baseiam-se principalmente na perda imediata do leite causada pela mastite clínica. Sabe-se, entretanto, que nas infecções sub clínicas, os prejuízos são maiores, levando-se em consideração a sua frequência nos rebanhos e a longa persistência inaparente de infecções. A contínua ação irritante de microrganismos sobre a mucosa, durante uma ou várias lactações, provoca perda progressiva do epitélio secretor, reduzindo a produção Láctea (Sommerhäuser et al., 2003).

O prejuízo acarretado pela mastite constitui cerca de 25% de todas as doenças de importância econômica, que a mastite clínica representa 18% do prejuízo total por causar morte ou descarte prematuro e que a redução na produção total é representada principalmente pela a qualidade do leite por determinar sérias alterações na composição do leite, devido à diminuição na gordura, lactose, caseína, cálcio e fósforo. O presente trabalho tem como objetivo registrar os diferentes níveis de mastite nas diferentes fases de lactação e seus principais agentes etiológicos e sensibilidade aos antibióticos.

Material e Métodos

Coleta do leite para análises de CMT

Utilizaram-se vacas em diferentes fases de lactação inseridas na região de Imperatriz- MA. Semanalmente ocorria uma visita antes da primeira ordenha e depois de avaliado e examinado o úbere das vacas em lactação, era recolhida amostra de leite para análise imediata do Califórnia Mastite Test. Para realização do teste utiliza-se uma raquete contendo quatro cavidades e o reagente do CMT. Misturava-se 2 mL de leite com 2 mL de reagente, homogeneizava e fazia-se a leitura após 10 segundos. De acordo com a quantidade de células somáticas existentes no leite, forma-se um gel, de espessura variada. Se a quantidade de células somáticas é baixa, não forma gel, o resultado é negativo. De acordo com a espessura do gel, o resultado era dado em escores, que variavam de traços (leve formação de gel) a + (fracamente positivo), ++ (reação positiva) e +++ (reação fortemente positiva), (Figura 1A).

Semeadura em meio específico para lactocultura

Com resultado positivo para o CMT, o teto infectado era limpo com água e sabão, em seguida seco com papel toalha e uma posterior desinfecção com álcool-iodado. A amostra de leite era então coletada do respectivo teto em um tubo de ensaio auto clavado e acondicionado em caixa isotérmica contendo gelo e conduzido às dependências do laboratório de Biotecnologia Ambiental (LABITEC) da Universidade Estadual do Maranhão (Figura 1B).

Da amostra de leite era retirado 0,5 mL e adicionado a tubos de ensaio contendo 4,5 mL de Brain Heart Infusion (BHI), para diluições seriadas até 10^3 . Em seguida essas diluições eram levadas à estufa por 24 horas a 37°C, (Figura 2).

Isolamento e identificação de *Staphylococcus sp*

Após 24h de estufa, a diluição seriada 10^{-3} do leite em BHI (1 mL), era transferida para Placas de Petri contendo Agar específico para o crescimento de *Staphylococcus sp*, e as placas eram levadas à estufa por 24 horas a 37 °C para o crescimento de colônias.

Os microrganismos isolados em ágar específico foram identificados por meio da coloração diferencial de Gram (Tortora et al., 2002) e produção de catalase, realizado em lâmina, adicionando a uma colônia, 0,2 mL de

H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) a 3%. Eram considerados como *Staphylococcus sp*, os isolados que apresentavam morfologia típica de cocos Gram positivos, agrupados em cachos e produção de enzima catalase.



Figura 1 – Bandeja CMT.(A) e semeadura (B)



Figura 2 – Inclusão do meio de BHI em diluições a 10^3

Semeadura em meio de Mueller-Hinton para TSA – Antibiograma

A prova da sensibilidade das cepas de *Staphylococcus sp* isoladas das amostras de leite era realizada pelo método dos discos impregnados com antibióticos. Inicialmente as cepas eram semeadas em tubos contendo BHI e incubadas a 37° C durante 24 horas. Após a incubação, um Swab era umedecido no caldo cultivado e semeado em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton, esfregando-se o Swab em várias direções sobre o ágar para se obter uma distribuição uniforme dos microorganismos. Com auxílio de uma pinça, os discos impregnados com antibióticos eram depositados e levemente pressionados sobre a superfície do meio inoculado na placa de Petri, mantendo-se, entre um disco e outro, a distância de, aproximadamente 3 centímetros. Os antibióticos utilizados no teste foram: Penicilina G (PEN 10), Clorafenicol (CLO 30), Cefalotina (CFL 30) e Amicacina (AMI 30).

As placas foram incubadas por 12 a 24 horas e, com uma régua, realizava-se a leitura dos halos

de inibição, anotando-se o diâmetro. Os resultados foram interpretados como resistente (R), sensibilidade intermediária (I) e sensível (S), de acordo com a tabela fornecida pelo fabricante dos discos de sensibilidade (Figura 3).



Figura 3 – Halos de sensibilidade aos Antibióticos testados.

Resultados e Discussão

A mastite constitui-se na doença mais importante dos rebanhos leiteiros em todo o mundo devido à alta incidência de casos clínicos, alta incidência de infecções não perceptíveis a olho nu (infecções subclínicas) e aos prejuízos econômicos que acarreta. Nas suas principais formas de apresentação, clínica e subclínica, a doença é causada por um grande número de microrganismos (Santos et al., 2004). Embora mais de 137 espécies, subespécies e sorotipos de microrganismos já tenham sido isolados de infecções da glândula mamária bovina, sendo a maioria das infecções causadas por bactérias.

Apesar da heterogeneidade dos agentes que causam mastite, o primeiro passo para o início do processo infeccioso é a contaminação da extremidade da teta de uma glândula susceptível. Uma vez que um microrganismo tenha se instalado na glândula mamária, ele se nutre dos componentes do leite e se multiplica, atingindo números muito elevados. Nesse processo, são produzidas toxinas ou outras substâncias que causam danos ao tecido mamário. Essas substâncias atraem leucócitos (células somáticas) do sangue para o leite, a fim de destruir os microrganismos invasores. Como resultado da inflamação, as paredes dos vasos sanguíneos se tornam dilatadas e outras substâncias do sangue também passam para o leite. Entre essas estão íons de cloro e sódio, que deixam o leite com sabor salgado, e enzimas que causam alterações na proteína e na gordura.

Devido às lesões do tecido mamário, as células secretoras se tornam menos eficientes, e

com menor capacidade de produzir e secretar leite. Ocorre também a morte das células e a liberação de enzimas dentro da glândula, que contribuem para agravar o processo inflamatório, prejudicando a qualidade do leite e redução na produção de leite.

A redução na produção de leite é considerada o fator individual mais importante das perdas econômicas da mastite. Estudos realizados no Brasil mostraram que quartos mamários com mastite subclínica produziram em média 25 a 42% menos leite do que quartos mamários normais. A redução quantitativa e qualitativa do leite provocada pela mastite subclínica no quarto infectado, na vaca ou no rebanho, varia muito, dependendo de fatores ligados à natureza do(s) agente(s) etiológico(s), da resposta imunitária do animal, da evolução e duração da infecção e da propagação da mastite no rebanho. Estas condições ainda são influenciadas pelos cuidados e medidas sanitárias adotadas (Bareille et al., 2003).

As medidas de controle da mastite restringem-se normalmente às vacas em lactação, destacando-se como medidas usuais a imersão dos tetos com solução anti-séptica, manutenção e desinfecção da ordenhadeira, descarte de animais crônicos e tratamento das vacas no período seco (Dodd, 1983). Com relação às novilhas, técnicos e produtores, via de regra, não adotam nenhuma medida preventiva por considerarem esta categoria de animais refratária às infecções da glândula mamária (Hallberg et al., 1995).

Um conceito importante no diagnóstico e controle da mastite é que os patógenos mais comumente encontrados podem ser classificados em dois grupos: contagiosos e ambientais. Os microrganismos contagiosos são aqueles cujas principais fontes de infecção para o rebanho são o úbere ou canal da teta infectada, ou lesões nas tetas infectadas. A disseminação desses agentes se dá de um quarto infectado a outro ou de uma vaca para outra durante o processo de ordenha. Os microrganismos ambientais estão normalmente disseminados no solo, utensílios, dejetos, água ou outros locais e podem atingir a extremidade da teta a partir daí. Essa diferenciação entre os microrganismos causadores de mastite é de importância prática, porque medidas de controle diferenciado são necessárias para cada um desses grupos.

Quando há presença de microrganismos patogênicos na glândula mamária, geralmente a

contagem de células somáticas se apresenta elevadas (acima de 300.000 cel./ml de leite). Outros fatores como estágio de lactação, idade do animal, estação do ano e vários outros tipos de estresses, podem influenciar a contagem de células somáticas (Beauveau et al., 2002). O aumento na CCS é a principal característica utilizada para o diagnóstico da mastite subclínica. Dessa forma, existem vários testes que avaliam o teor de células somáticas do leite, e entre esses testes destacam-se o CMT (Califórnia Mastitis Test), que é muito empregado para identificar vacas com mastite subclínica na fazenda.

Dos 344 tetos analisados, 159 tetos tiveram resultado positivo para mastite subclínica, cujo resultado foi dado em escores, que variaram de traços (leve formação de gel) a + (fracamente positivo), ++ (reação positiva) e +++ (reação fortemente positiva); e 185 tetos negativos. Das 86 vacas examinadas, 63 apresentaram resultado positivo para mastite sub-clínica para pelo menos 1 teto, ou seja, a mastite acometeu 73% do rebanho examinado, indicando uma alta incidência na região (Quadros 1 e 2).

Tetos	Positivos	Negativos
Nº	159	185
%	46	54

Quadro 1. Proporção de tetos afetados.

Positivos	+	++	+++
Nº de tetos afetados	83	61	15
% de tetos afetados	52	39	9

Quadro 2. Relação de tetos positivos.

Os registros zootécnicos são precários na região, dificultando a pesquisa quanto à fase de lactação dos animais, porém a partir dos dados coletados podemos observar que a maior incidência de mastite ocorreu em animais de segunda lactação, como mostra o Quadro 3.

Lactação	1	2	3	4	5	6	11	13
Nº de animais	16	17	10	7	4	1	1	1
% de animais	28	30	17	12	7	2	2	2

Quadro 3: Quantidade de animais afetados por fase de lactação.

A mastite clínica é mais comum por ocasião da parição e nos primeiros três meses de lactação. As prevalências de infecções clínicas e de novas infecções podem aumentar com o número de lactações. A razão exata da influência da idade e do estágio de lactação não é conhecida. A alta taxa de prevalência de mastite próxima à parição é predominantemente uma consequência da alta taxa de novas infecções no período seco, e da supressão dos mecanismos de defesa da vaca no pré-parto. O aumento da ocorrência de doença com o avanço da idade provavelmente não se deve à maior suscetibilidade intra mamária, mas sim à maior facilidade de penetração do patógeno no canal do teto e às infecções prévias latentes (Andrews et al., 2008).

Os agentes mais frequentemente isolados do úbere dos animais pesquisados foram às bactérias do gênero *Staphylococcus aureus*. Os *Staphylococcus Coagulase Negativos* fazem parte na microbiota normal da pele dos bovinos e podem ser facilmente isolados em novilhas. Os agentes que causam mastite em novilhas podem ter origem do próprio ambiente, do corpo dos animais e do leite proveniente de animais com mastite que é usado no aleitamento dos bezerras.

Com relação ao teste de sensibilidade a antibióticos, avaliou-se a eficiência dos seguintes antibióticos como estratégia para o controle da mastite subclínica: Penicilina G (PEN 10), Cefalotina (CFL 30), Clorafenicol (CLO 30) e Amicacina (AMI 30). Entre esses antibióticos testados, o que se mostrou mais eficiente foi a Cefalotina, apresentando um halo de inibição bacteriana com média de 3,4 cm de diâmetro (Gráfico 1).

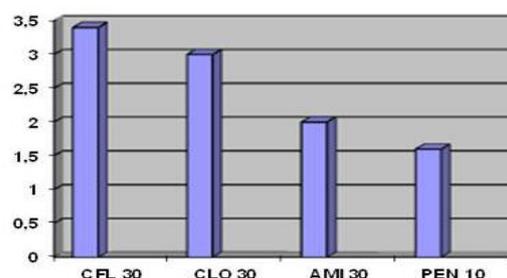


Gráfico 1: Eficácia dos antibióticos de acordo com média do halo de inibição do crescimento bacteriano (cm)

Conclusões

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, verificamos que:

A mastite é uma doença multifatorial, de grande importância para a pecuária leiteira e de ocorrência frequente na região de Imperatriz – Ma;

Registrou-se mastite sub clínica em 63 animais em pelo menos 1 teto;

Detectou-se mastite sub clínica em 73% das vacas testadas;

O *Staphylococcus aureus* foi o microorganismo de destaque nas lactoculturas;

As vacas em segunda lactação apresentaram alto índice de contaminação;

O TSA revela maior sensibilidade a Cefalotina com halo de inibição de 3,4cm, o cloranfenicol 3.0cm, Amicacina 2,0 cm e a Penicilina G.

Referências Bibliográficas

- Andrews, A. H., Blowey, R. W., Eddy, R. G. & Boyd, H. (2008). *Medicina bovina: doenças e criação de bovinos*. Editora Roca.
- Bareille, N., Beaudeau, F., Billon, S., Robert, A. & Faverdin, P. (2003). Effects of health disorders on feed intake and milk production in dairy cows. *Livestock Production Science*, 83, 53-62.
- Beaudeau, F., Fourichon, C., Seegers, H. & Bareille, N. (2002). Risk of clinical mastitis in dairy herds with a high proportion of low individual milk somatic-cell counts. *Preventive Veterinary Medicine*, 53, 43-54.
- Dingwell, R., Leslie, K., Schukken, Y., Sargeant, J., Timms, L., Duffield, T., Keefe, G. P., Kelton, D., Lissemore, K. & Conklin, J. (2004). Association of cow and quarter-level factors at drying-off with new intramammary infections during the dry period. *Preventive Veterinary Medicine*, 63, 75-89.
- Dodd, F. H. (1983). Mastitis - progress on control. *Journal of Dairy Science*, 66, 1773-1780.
- Fonseca, L. F. L. (2000). *Qualidade do leite e controle de mastite*. Lemos Editorial, São Paulo.
- Hallberg, J., Dame, K., Chester, S., Miller, C., Fox, L., Pankey, J., Nickerson, S. & Weaver, L. (1995). The visual appearance and somatic cell count of mammary secretions collected from primigravid heifers during gestation and early postpartum. *Journal of Dairy Science*, 78, 1629-1636.
- Holtenius, K., Waller, K. P., Essen-Gustavsson, B., Holtenius, P. & Sandgren, C. H. (2004). Metabolic parameters and blood leukocyte profiles in cows from herds with high or low mastitis incidence. *The Veterinary Journal*, 168, 65-73.
- Peeler, E., Green, M., Fitzpatrick, J. & Green, L. (2003). The association between quarter somatic-cell counts and clinical mastitis in three British dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 59, 169-180.
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C., Hinchcliff, K. W. & McKenzie, R. (2002). *Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Ribeiro, M. E. R., Stumpf J.R., W., Gomes, J. F., et al. Relação de CMT positivo e crescimento microbiológico no diagnóstico da mastite bovina na região sul do Rio Grande do Sul. In: Congresso Brasileiro de Zootecnia, 21 e Congresso Internacional de Zootecnia, 3., 2001, Goiânia. Anais... Goiânia:SBZ, (2001). p.98.
- Santos, J., Cerri, R., Ballou, M., Higginbotham, G. & Kirk, J. (2004). Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 80, 31-45.
- Sears, P., Gonzalez, R., Wilson, D. J. & Han, H. (1993). Procedures for mastitis diagnosis and control. *The Veterinary Clinics of North America. Food animal Practice*, 9, 445-468.
- Sommerhäuser, J., Kloppert, B., Wolter, W., Zschöck, M., Sobiraj, A. & Failing, K. (2003). The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. *Veterinary Microbiology*, 96, 91-102.
- Tortora, G.J., Funke, B.R. & Christine, L. (2002). *Microbiologia*, 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 827p.

Recebido em Setembro 28, 2015

Aceito em Outubro 29, 2015

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.