

LUIZ RÔMULO ALBERTON

**CONTROLE DA MASTITE EM VACAS LEITEIRAS COM
BACTERINA DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DO
PRÓPRIO REBANHO, APLICADA REPETIDAMENTE
DURANTE A LACTAÇÃO**

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de Mestre, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Pedro R. Werner, Ms, Ph D

CURITIBA

1999



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa de Tese do Candidato ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, **LUIZ RÔMULO ALBERTON** após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

- 1) A Tese, intitulada "CONTROLE DA MASTITE EM VACAS LEITEIRAS COM BACTERINA DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DO PRÓPRIO REBANHO APLICADO REPETIDAMENTE DURANTE A LACTAÇÃO" foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.
- 2) O Candidato se houve muito bem durante a Defesa de Tese, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pelo Candidato, atribuiu o grau "A" concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de Patologia Animal.

Curitiba, 30 novembro de 1999.

Prof. Dr. PEDRO RIBAS WERNER
Presidente/Orientador

Prof. Dr. IVAN DECONTO
Membro

Dr. RUDIGER DANIEL OLLHOFF
Membro

Dedico este trabalho à minha namorada Ana Paula

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Pedro Werner, pela amizade, confiança e conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. José Francisco Warth, pelo apoio fundamental na elaboração deste trabalho.

Ao Médico Veterinário Laudi da Cunha, do Sítio Bom Jesus, pela ajuda em todos os instantes na execução deste projeto.

Ao Prof. Newton Pohl Ribas e ao químico Darci Rodrigues da Veiga, que abriram as portas da Associação Paranaense de Criadores da Raça Holandesa do Paraná.

A Prof. Clotilde Germiniani, pela atenção dispensada durante o curso de Mestrado.

Aos Professores Pachaly e Elza, pelo incentivo à minha carreira acadêmica.

Ao Prof. Ivan Deconto, pelos conselhos nas horas certas.

Ao meu irmão Geraldo e minha cunhada Lígia, pelo estímulo que me deram antes e durante o curso de mestrado.

À minha amiga e colega da pós-graduação Mara Elisa Joineau, pelo companheirismo.

Ao amigo Anderson Farias, pela contribuição profissional na clínica durante minhas ausências.

Ao meu sobrinho Fábio Luís pelo ajuda na formatação desta dissertação.

Aos meus pais, Remo e Mirtes Alberton, pela dedicação à educação e ao bem-estar de nossa família.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta, contribuíram para que o presente trabalho pudesse ser realizado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMO	IX
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 ETIOLOGIA	3
2.2 PATOGÊNESE.....	5
2.3 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS	6
2.4 MONITORIZAÇÃO DA MASTITE.....	8
2.5 IMPACTO DA MASTITE ESTAFILOCÓCICA NA QUALIDADE E QUANTIDADE DE LEITE PRODUZIDO	11
2.6 CONTROLE DA MASTITE ESTAFILOCÓCICA	12
2.6.1 Controle da mastite estafilocócica com antibióticos.....	12
2.6.2 Emprego de vacinas no controle da mastite estafilocócica.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 ANIMAIS E MANEJO DO REBANHO	17
3.2 ISOLAMENTO DO PATÓGENO	18
3.3 ELABORAÇÃO DA VACINA	19
3.4 DESENHO EXPERIMENTAL	20
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
3.6 ANÁLISE DO CUSTO-BENEFÍCIO	21
3.7 CÁLCULO DA EFICÁCIA DA VACINA	22
4.RESULTADOS	23
4.1 REAÇÃO À APLICAÇÃO DA VACINA	23
4.2 PREVALÊNCIA DA MASTITE DURANTE O EXPERIMENTO.....	23
4.3 ANÁLISE DA CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS/ML DE LEITE	24
4.4 RESULTADOS DAS PROVAS DO CMT.....	27
4.5 RESULTADOS DA ANÁLISE DA QUALIDADE E PRODUÇÃO DE LEITE	29
4.6 ANÁLISE CUSTO/BENEFÍCIO DA VACINAÇÃO	35
4.7 CÁLCULO DA EFICÁCIA DA VACINA	36
5. DISCUSSÃO	37
6.CONCLUSÕES.....	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

LISTA DE TABELAS

- 1 Valores médios semanais de células somáticas ($\times 10^3/\text{ml}$) presentes em amostras de leite de vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S.aureus* sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas25
- 2 Número de amostras de leite com contagem de células somáticas superior a 3×10^5 cél/ml, em vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S. aureus* sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas.....26
- 3 Número de amostras de leite com contagem de células somáticas superior a 5×10^5 céls/ml, em vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S.aureus*, sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas.....26
- 4 Número de mamas afetadas com mastite, ao teste do *CMT*, em vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S.aureus* sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas...27
- 5 Número de mamas afetadas segundo a severidade da reação pelo *CMT* em vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S.aureus*, com dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas.....27
- 6 Gravidade da inflamação mamária, de acordo com o *CMT*, em vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S.aureus* sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas.....28
- 7 Valores médios da produção de leite (kg/dia) e teores (%) de gordura, proteína, sólidos totais e lactose, em vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S.aureus*, sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas.....29

8	Análise custo/benefício do processo de vacinação de vacas contra mastite com bacterina de <i>S.aureus</i> , comparando-se o grupo controle e o semanal, durante um ano.....	35
---	---	----

LISTA DE FIGURAS

- 1 Distribuição dos casos de mastite quanto à gravidade da lesão segundo reação ao CMT, em vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *Staphylococcus aureus*, sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas.....28
- 2 Variação na produção média de leite kg/dia de vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S. aureus*, com dois esquemas posológicos diferentes., durante 16 semanas.....29
- 3 Modelo estatístico ajustado para a produção média de leite kg/dia das vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *Staphylococcus aureus* sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas.....30
- 4 Variação nos teores médios de gordura (%) no leite de vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *Staphylococcus aureus*, sob dois esquemas posológicos, durante 16 semanas.....30
- 5 Modelo estatístico ajustado para o teor médio de gordura (%) do leite de vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S. aureus* sob dois esquemas posológicos, durante 16 semanas.....31
- 6 Variação nos teores médio de proteína (%) no leite de vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S. aureus*, sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas.....31
- 7 Modelo estatístico ajustado para o teor médio de proteína (%) no leite de vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *Staphylococcus aureus*, sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas.....32

8	Varição nos teores médios de sólidos totais (%) no leite de vacas vacinadas contra mastite com bacterina de <i>S. aureus</i> , sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas.....	32
9	Modelo estatístico ajustado para o teor de sólidos totais (%) no leite de vacas vacinadas contra mastite com bacterina de <i>Staphylococcus aureus</i> , sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas.....	33
10	Varição nos teores médios de lactose (%) no leite de vacas vacinadas contra mastite com bacterina de <i>Staphylococcus aureus</i> , sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas.....	33
11	Modelo estatístico ajustado para o teor em lactose (%) no leite de vacas vacinadas contra mastite com bacterina de <i>Staphylococcus aureus</i> , sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

UFC	Unidade formadora de colônia
CMT	<i>California mastitis test</i>
APCBRH	Associação paranaense dos criadores de bovinos da raça holandesa
CCS	Contagem de células somáticas
S.	<i>Staphylococcus</i>
Cél./ml	Células por mililitro
Kg/dia	Quilogramas por dia

RESUMO

CONTROLE DA MASTITE EM VACAS LEITEIRAS COM BACTERINA DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DO PRÓPRIO REBANHO, APLICADA REPETIDAMENTE DURANTE A LACTAÇÃO.

A eficiência de bacterina de *Staphylococcus aureus* no controle da mastite foi avaliada durante dezesseis semanas, em quarenta e cinco vacas da raça Jersey em lactação, em um rebanho na região metropolitana de Curitiba. A vacina foi elaborada a partir de cepas de *S.aureus* coagulase positiva, isoladas de casos de mastite subclínica da mesma propriedade. As cepas foram inativadas com formalina e adicionadas de hidróxido de alumínio a 2,50% como adjuvante. Os animais foram divididos em três lotes de quinze animais, sendo o controle, sem nenhum tratamento; o semanal, onde os animais receberam 3,0 ml da vacina semanalmente, por via subcutânea na região do linfonodo mamário; e o quinzenal, que recebeu o mesmo tratamento do grupo anterior, mas a cada quinze dias. A produção foi avaliada diariamente sendo colhidas amostras de leite de todos os animais a cada semana e submetidas ao *California Mastitis Test* (CMT), Contagem de Células Somáticas (CCS) e às seguintes mensurações: teores de sólidos totais, de lactose, de gordura e de proteína. As amostras positivas para mastite no CMT foram submetidas a exames bacteriológicos para identificação do patógeno. Finalmente, fez-se uma análise da relação custo/benefício da vacinação e de seu impacto econômico na atividade leiteira comparando-se os dados obtidos nos grupos controle e semanal, os dados obtidos sendo extrapolados para um ano. Demonstrou-se que as porcentagens de amostras de leite com CCS inferior a

3×10^5 cél./ml e 5×10^5 cél./ml foram maiores no grupo semanal ($p \leq 0,05$) do que nos demais grupos. Em relação ao total de casos, o número de amostras positivas ao CMT foi 60,00% menor ($p \leq 0,05$) no grupo semanal (9,16%) do que no grupo controle (22,70%). Também, as percentagens de infecções moderadas a graves ao CMT foram menores ($p \leq 0,05$) no grupo semanal (35,98%) do que nos grupos quinzenal (57,43%) e controle (63,3%). A produção foi 7,12% maior no grupo semanal e o teor em sólidos totais foi maior nos grupos semanal e quinzenal em relação ao controle. No entanto, o teor em lactose foi maior no grupo quinzenal. Já os teores de gordura e proteína não foram diferentes estatisticamente entre os grupos. Durante o experimento, em todos os grupos, os casos de mastites subclínicas foram mais frequentes do que as outras formas clínicas da doença, atingindo 81,46% do total de casos de mastites, sendo *S. aureus* o principal agente causador. No grupo semanal, a porcentagem de mastites subclínicas causadas por *S. aureus* foi menor (25,00%) do que no grupo controle (32,25%) e no grupo quinzenal (43,75%). A análise econômica demonstrou que, no grupo controle, os custos anuais com descarte de leite e tratamento dos casos de mastite seriam de US\$ 2.636,28; enquanto no grupo vacinado semanalmente, computando-se os gastos com a vacina e os ganhos com o aumento da produção leiteira, haveria um retorno de US\$ 841,59. Concluiu-se que a bacterina de *S. aureus*, tendo hidróxido de alumínio como adjuvante, quando aplicada subcutaneamente na região do linfonodo mamário, uma vez por semana durante o curso da lactação, é capaz de diminuir tanto a prevalência quanto a gravidade dos

casos de mastite em vacas leiteiras, além de melhorar a qualidade do leite e diminuir substancialmente os prejuízos causados pela mastite.

ABSTRACT

CONTROL OF MASTITIS IN LACTATING COWS USING *Staphylococcus aureus* BACTERIN APPLIED REPEATEDLY DURING LACTATION

The efficiency of *Staphylococcus aureus* bacterin in the control of mastitis in cows was evaluated in forty-five lactating Jersey cows which received the vaccine repeatedly for sixteen weeks. The vaccine was made from strains of *S. aureus* coagulase-positive isolated from the same herd tested. The bacteria were inactivated with formalin and 2,5% aluminum hydroxide was added as adjuvant. The animals were divided in three groups of fifteen animals as follows: Control, without any treatment; weekly group, where the animals received weekly injections of 3,0 ml of the vaccine, subcutaneously in the region of the mammary lymph-node; and the biweekly group, which received the same treatment as the previous one in two-week intervals. Milk production was evaluated daily. Samples of milk were collected weekly and submitted to the following tests: California Mastitis Test (CMT); Somatic Cells Count (SCC); and mensuration of total solids, lactose, fat and protein contents. Samples positive for mastitis in CMT were submitted to bacteriological exams for identification of the bacteria involved. Finally, an evaluation was made of the economic impact the vaccination might have comparing the control and weekly groups. The data attained were extrapolated for one year. Results demonstrated that the percentage of milk samples with CCS inferior to 3×10^5 cells/ml and 5×10^5 cells /ml was larger in the weekly group ($p \leq 0,05$) than in other groups. The percentage of positive samples to CMT was 60,00% smaller ($p \leq 0,05$) in the weekly group than in control (9,16% and 22,70%, respectively). The percentages of moderate to severe infections according to CMT

were smaller ($p \leq 0,05$) in the weekly group (35.98%) than control (63.33%) and biweekly groups (57,43%). Comparing to the control group, milk production was 7,10% larger in the weekly group and the total solids contents was larger in the weekly and biweekly groups. However, lactose content was larger in the biweekly group than in the weekly group. Fat and protein contents did not vary significantly among the groups. During the experiment, in all the groups, cases of subclinical mastitis were more frequent than other forms of the disease, reaching 81,46% of the total of cases, and *Staphylococcus aureus* was the most frequent bacteria isolated. The percentage of *S. aureus* subclinical mastitis cases was smaller in the weekly group (25.00%) than in control group (32,25%) and in the biweekly group (43,75%). The economic analysis demonstrated that, in the control group, the costs represented by milk discarding and treatment of mastitis cases would reach US\$ 2.636,28 annually. On the other hand, in the group vaccinated weekly, could have a profit of US\$ 841,59 if the expenses with vaccine and the increase in milk production are considered. It was concluded that bacterin made from *S. aureus* isolated from the same herd and containing aluminum hydroxide as adjuvant, when injected SQ repeatedly at one-week intervals in the mammary lymph-node region during the course of lactation, is capable to decrease both the prevalence and the severity of mastitis in lactating cows, and can improve the quality of milk and to reduced financial losses caused by the *staphylococcal* mastitis.

1. INTRODUÇÃO

Mastite é a inflamação da glândula mamária, geralmente em consequência de infecção microbiana, sendo que os microorganismos causadores da mastite são muitos (PHILPOT e PANKEY, 1975). Sua importância reside na ação prejudicial à qualidade e a quantidade de leite produzido pela mama infectada, como pela dificuldade de diagnóstico e prevenção. A enfermidade pode ser clínica ou subclínica, sendo que esta última é muito mais importante, pois COSTA et al (1995a) encontrou, em rebanhos brasileiros, a incidência de 46,54% de mastite subclínica e 6,48% de mastite clínica. As mastites são também classificadas em ambiental e contagiosa, sendo as primeiras causadas por microorganismos presentes no ambiente, como a *Escherichia coli* e a *Klebsiella sp.* As mastites contagiosas são causadas por microorganismos transmitidos diretamente entre os animais, ou por meio das mãos do ordenhador ou pelo equipamento de ordenha. Nesta forma os *Staphylococcus sp.* e os *Streptococcus sp.* são os principais patógenos (KLOSS, 1980; COSTA, 1995b). As mastites subclínicas geralmente são do tipo contagioso e, nos rebanhos brasileiros, são as que causam maior prejuízo à exploração leiteira.

Estimativas recentes sugerem que a mastite causa perdas em torno de US\$ 185 por vaca anualmente nos Estados Unidos, e que em torno de 60% desta perda é devida a diminuição da produção de leite causada pelas infecções (HARMON, 1998).

Na prevenção da mastite, considerável ênfase tem sido dada às rotinas de manejo, as quais reduzem a exposição do úbere aos patógenos, diminuindo as taxas de novas infecções e a prevalência da doença no rebanho leiteiro. Ao contrário de outras doenças infecciosas de importância econômica, a imunização não tem sido efetiva devido, entre outros, à baixa antigenicidade do *S. aureus* (AMARAL, 1999), aliado ao efeito de diluição que o leite exerce sobre os fatores de defesa da glândula mamária (SANDHOLM e KORHONEN, 1995).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi o de avaliar a eficácia de uma vacina feita a partir de cepas de *Staphylococcus aureus* coagulase positivas isoladas do próprio rebanho, como medida de controle da enfermidade, utilizando-se uma combinação de esquema posológico ainda não descrito na literatura, numa tentativa de reduzir a magnitude do impacto negativo da mastite na produção leiteira.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etiologia

Muitos microorganismos podem causar a mastite, pois WATT (1988) relatou um total de 137 agentes, com suas subespécies e sorovares, em todo o mundo, associados à infecção da glândula mamária.

Estudando a prevalência dos patógenos da mastite bovina, LANGONI et al. (1991), examinaram 702 amostras de leite bovino com mastite subclínica e isolaram os seguintes microorganismos em cultura pura ou em associação, nas seguintes proporções: *Staphylococcus aureus* - 35,53%; *Staphylococcus epidermidis* - 23,19%; *Corynebacterium bovis* - 9,2%; *Corynebacterium pyogenes* - 4,49%; *Streptococcus uberis* - 4,36%; *Streptococcus dysgalactiae* - 3,36%; *Candida albicans* - 3,37%; *Streptococcus agalactiae* - 3,24%; *Escherichia coli* - 2,87%; *Pseudomonas aeruginosa* - 2,37%; *Klebsiella spp* - 2,12%; *Alcalygenes faecalis* - 2,0%; *Proteus mirabilis* - 1,37%; *Pasteurella multocida* - 1,25%; *Micrococcus spp* - 0,37%; *Salmonella spp* - 0,25%; *Acinetobacter calcoaceticus* - 0,25%; *Nocardia asteroides* - 0,25% e *Enterobacter agglomerans* - 0,12%.

Os cocos Gram positivos e catalase positiva são os microrganismos mais freqüentemente isolados das glândulas mamárias de vacas com mastite, estando presentes em 20,50% das amostras examinadas (WATTS, 1986; FERNANDES, 1992). Dentre os cocos coagulase positiva, destaca-se o *Staphylococcus aureus*, consistindo-se no agente etiológico de maior prevalência e patogenicidade (KLOSS, 1980).

Em todo o mundo, estudos recentes mostram a importância do *Staphylococcus sp* na mastite bovina, como demonstrou SEDDEK (1997) no Egito onde o *Staphylococcus aureus* é responsável por 32,78% das mastites bacterianas. SWAMI e MURTHY (1998), na Índia, constataram que 54,05% das mastites subclínicas são causadas pelo *Staphylococcus epidermidis* e 44,50% pelo *Staphylococcus aureus*. Da mesma maneira, LOGUE (1997) demonstrou que, na Escócia, o *Staphylococcus aureus* é o agente causal mais prevalente e mais difícil de controlar, sendo responsável pelas altas contagens de células somáticas e por casos de mastite subclínica. Além disso, a importância do patógeno como causador de mastites aumentou nos últimos anos, como demonstrou ZECONNI (1998), em rebanhos italianos, onde houve aumento da percentagem de infecções causadas por *S. aureus* de 10% em 1973 para 35% em 1996. Ainda MIHAIU (1996), estudando a flora microbiana de amostras de leite de vacas com mastites subclínicas, isolou *Staphylococcus sp* em 62,70% das amostras, sendo 45% do tipo coagulase positiva e 17,70% coagulase negativa.

No Brasil, VIANNI (1992) isolou *Staphylococcus aureus* coagulase positiva de 52,22% e *S. aureus* coagulase negativa de 16,67% das amostras em estudo realizado em Itaguaí - Rio de Janeiro. Da mesma maneira, COSTA (1995), em São Paulo e Minas Gerais, constatou que 34,00% das mastites em 3.574 vacas eram devido ao *Staphylococcus sp* e 21,77% ao *Streptococcus sp*.

2.2 Patogênese

A mastite causada por *Staphylococcus spp* pode causar oclusão de ductos, formação de microabcessos, involução lobular e alveolar, e fibrose (BLOOD e RADOSTITIS, 1991).

O *Staphylococcus aureus* excreta várias enzimas como a lipase, estearase, desoxirribonuclease, estafiloquinase, hialuronidase e fosfolipase. Clinicamente a mais importante é a estafiloquinase (coagulase) que provoca a coagulação do plasma *in vitro* e caracteriza as espécies patogênicas, de *S. aureus*, *S. intermedius* e algumas cepas de *S. hyicus*. Outra proteína importante excretada pelo *S aureus* é a leucocidina, que pode destruir os neutrófilos e macrófagos por modificar a permeabilidade da membrana celular dessas células. As toxinas hemolíticas diferenciam-se antigenicamente, bioquimicamente e quanto ao seu efeito sobre os eritrócitos de várias espécies animais em alfa, beta, delta e gama. A toxina beta, uma fosfolipase C, predomina em cepas de animais domésticos (BIBERSTEIN, 1990).

Quando o *Staphylococcus aureus* coloniza as células através dos ductos da glândula mamária, as toxinas causam injúrias ao epitélio ductal que resultam em liberação de substâncias quimiotáticas, atraindo leucócitos. As toxinas causam também liberação de lisossomos leucocitários, aumentando a injúria ao epitélio mamário. Os fatores plasmáticos e células descamadas formam grumos, que ocluem os ductos e impedem a drenagem dos lóbulos, com conseqüente retenção de leite e involução do alvéolo comprometido. A persistência do *Staphylococcus aureus* ativo no foco inflamatório provoca destruição do ducto e expansão da reação inflamatória com formação de microabcessos. O epitélio do ducto, consistindo normalmente de

uma camada de células cubóides, sofre metaplasia pavimentosa e torna-se estratificado. Posteriormente, o estroma mamário é infiltrado por linfócitos e células plasmáticas, caracterizando um processo crônico. Como o *Staphylococcus aureus* difunde-se para novas áreas da glândula, focos adicionais de mastite se desenvolvem. Deste modo, do ponto de vista patológico, focos de inflamação aguda e crônica podem coexistir. Leucócitos fagocitam os *Staphylococcus aureus*, mas substâncias produzidas por estes os protegem das enzimas digestivas daqueles e sua sobrevivência pode representar a morte do leucócito. O rápido crescimento bacteriano, com produção de grandes quantidades de alfa-toxinas pode resultar em constrição alveolar com isquemia e desenvolvimento de gangrena (SCHALM, 1971).

Segundo OWENS (1997), a cura bacteriológica com antibioticoterapia em infecções recentes por *Staphylococcus aureus* é de 70%, enquanto a taxa de cura para infecções antigas é muito baixa, menor que 35%, ressaltando a dificuldade de eliminação do agente em mamas infectadas.

2.3 Aspectos Imunológicos

Segundo SORDILLO (1997), a imunidade da glândula mamária é representada pela barreira física do esfíncter do teto, pela queratina do canal do teto, fluxo descendente do leite e pela barreira imunológica através da presença de macrófagos, neutrófilos, linfócitos, e fatores solúveis como a lactoferrina, complemento, lisozima, sistema peróxido de hidrogênio–tiocianato–peroxidase, citocininas, anticorpos (IgG1, IgG2, IgA e IgM) no leite. Além destes, ácidos graxos

como o mirístico, palmitoléico e linoléico associados à queratina, têm função bacteriostática.

Os principais fatores de resistência ao estabelecimento de bactérias na glândula mamária são os componentes humoral e celular do sistema imunológico. Os neutrófilos são fagócitos e sua presença no leite é aumentada prontamente seguindo-se a invasão bacteriana (HILLERTON et al., 1993). Contudo, durante períodos de mudanças fisiológicas marcantes, como da ordenha para o período seco, do período seco para o início da lactação, e no pico da lactação há aumento do risco de mastite, sendo que no início do período de lactação, alguns fatores que contribuem para a maior susceptibilidade da glândula mamária, segundo SHANKS et al. (1981), são o edema fisiológico perinatal, baixo grau de queratinização do canal do teto, grande perda de queratina, tempo insuficiente para queratinização do canal do teto e pressão intramamária relativamente alta.

A ordenha mecânica influi na incidência de mastite porque favorece mecanismos pelos quais as bactérias podem ser forçadas através do canal do teto (HILLERTON et al., 1993). Flutuações na pressão negativa da ordenhadeira resultam em movimento de leite entre as teteiras e, se o leite que contém patógenos é movido rapidamente, ele pode ser forçado através do canal do teto para dentro da mama, permitindo a contaminação entre as mamas (THIEL et al. 1973).

No pico de lactação, a grande quantidade de leite produzida dilui os fatores de proteção da glândula mamária, em especial lactoferrinas, leucócitos polimorfonucleares, anticorpos e lactoperoxidasas (SANDHOLM e KORHONEN, 1995). Além disso, algumas cepas de *Staphylococcus aureus*, formam em torno de si uma cápsula viscosa de polissacarídeos como proteção e usam proteínas do

hospedeiro como caseína, fibrinogênio e imunoglobulinas, para se proteger do sistema de defesa. Algumas cepas de *S. aureus* podem aderir-se aos tecidos protegendo-se do fluxo de saída do leite durante as ordenhas (SANDHOLM et al. 1990).

No que tange à imunidade da glândula contra *Staphylococcus aureus*, o grande problema é que, enquanto esta bactéria possui infectividade, viabilidade e patogenicidade altas, possui baixo poder imunogênico (AMARAL, 1999). Além disso, o *Staphylococcus aureus* produz coagulase, proteases, lipases e citolisinas que são capazes de destruir neutrófilos, bloquear o acesso de neutrófilos ao centro da infecção e produzir necrose de tecidos. A proteína A, que é um componente da parede celular do *S. aureus*, pode bloquear o processo de opsonização quando se liga à porção Fc da imunoglobulina dificultando a fagocitose. Muitos estafilococos apresentam pseudocápsulas de polissacarídeos que impedem a formação de anticorpos protetores. A formação destes anticorpos só é observada quando ocorre conjugação destes polissacarídeos a proteínas carreadoras (FRIEDRICHS et al. 1998).

2.4 Monitorização da mastite

Segundo PHILPOT (1998), células somáticas no leite são leucócitos do sangue que se deslocam ao úbere e cujo número aumenta significativamente logo após a instalação de uma infecção. Por isso, a contagem de células somáticas (CCS) é uma técnica importante para a monitorização do *status* inflamatório das glândulas mamárias em produção. Outros estudos têm demonstrado que durante a inflamação, o aumento no número de células somáticas é devido ao fluxo de

neutrófilos para a glândula mamária a fim de combater a infecção (HARMON e HEALD, 1982; MILLER e PAAPE, 1985; HARMON, 1994), e que o principal fator que afeta a CCS é a infecção da glândula mamária (DOHOO e MEEK, 1982).

Outros estudos mostraram que células epiteliais da glândula mamária não são freqüentemente encontradas nas secreções do úbere, mesmo durante o período sêco, e podem representar até 7% do total de células (LEE et al., 1980).

Aqueles agentes que causam o maior aumento na CCS são chamados de patógenos maiores, como o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e coliformes. Patógenos menores, por outro lado são aqueles, que apenas duplicam ou triplicam a CCS do leite quando comparados com os resultados de mamas não infectadas. Entre estes últimos, citam-se o *Corynebacterium pyogenes* e o *Staphylococcus aureus* coagulase negativa (HARMON e LANGLOIS, 1986). Embora a magnitude das respostas aos patógenos maiores possa variar de animal para animal, parece não ser possível diferenciar os diversos tipos de patógenos somente com a CCS (DOHOO e MEEK, 1982). Estudos indicam que o uso exclusivo da CCS para classificar mamas em infectadas ou não infectadas, resulta em algum grau erro devido aos falso-positivos e falso-negativos (DOHOO e MEEK, 1982; RENEAU, 1986).

THIERS et al. (1999b), comparando os resultados da CCS, do *California Mastitis Test* (CMT) e do exame microbiológico em rebanhos leiteiros, encontraram correlação significativa entre o aumento na CCS nas amostras microbiologicamente positivas e com maior intensidade na reação ao CMT.

Alguns métodos são utilizados para contar ou estimar o número de células somáticas no leite e, assim para o diagnóstico da mastite. Dentre eles citam-se a

Contagem Microscópica Direta (CMD), a Contagem Eletrônica de Células (CEC), o *California Mastitis Test* (CMT) e o *Wisconsin Mastitis Test* (WMT). Mas, a campo, tem-se utilizado o CMT por ser um método prático e de eficácia comprovada para diagnóstico da inflamação das mamas em vacas em lactação (SILVA, 1999).

THIERS et al. (1999a), estudando o conteúdo celular do leite de vacas em diferentes fases de lactação, verificou que existe correlação entre a presença de microorganismos no leite, número de células somáticas/ml e os resultados do CMT, e considerou o CMT um método eficiente para indicar o nível de celularidade do leite. No entanto, alguns pesquisadores tentaram estabelecer padrões para os valores de CCS para caracterizar um úbere como são ou infectado. Assim, RENEAU (1986) afirma que vacas não infectadas deveriam ter CCS inferior a 3×10^5 aos 5 dias após o parto e PHILPOT (1998) afirma que vacas com úberes saudáveis apresentam CCS no leite inferior a 3×10^5 células por mililitro de leite. SCHULTZ (1977) constatou que pode levar dias, semanas ou até mais tempo para a CCS diminuir depois que os patógenos foram eliminados da glândula mamária.

Muitos estudos foram feitos na tentativa de determinar outros fatores que pudessem afetar a CCS. LAEVENS et al. (1997) não encontrou efeitos significativos de número de partos ou estágio de lactação na CCS no leite de vacas bacteriologicamente negativas. A privação de alimento ou de água resultou em grandes quedas na produção de leite e aumentos proporcionais na CCS (RENEAU, 1986). Vários tipos de estresse têm sido implicados como causas no aumento da CCS (DOHOO e MEEK, 1982). Entretanto, tentativas para induzir experimentalmente alterações na CCS em vacas não infectadas pela injeção de hormônio adenocorticotrófico (ACTH) ou de corticosteróides ou, ainda, pela

colocação dos animais em câmara de ambiente controlado, mostraram poucos resultados positivos (PAAPE et al., 1973; WEGNER et al., 1976). Embora ELVINGER et al. (1991) tenham demonstrado um aumento significativo na CCS de vacas estressadas pelo calor. Identificou-se, também, que o estro dos animais não tem efeito significativo sobre a CCS (GUIDRY et al., 1975). No entanto, COULON et al. (1998) constataram aumento na CCS de vacas com atividade física quando comparadas com vacas que permaneciam estabuladas. Levando-se em conta as estações do ano, geralmente a CCS é baixa no inverno e mais alta no verão (DOHOO e MEEK, 1982). Este fato coincide com o aumento na incidência de mastite clínica nos meses de verão, como que tem sido relatado em vários estudos (PAAPE et al. 1973; SMITH et al., 1985). Estes últimos autores mostraram que o nível de infecção por patógenos ambientais foi máximo no verão, sendo que nesta estação há também as maiores contagens de coliformes na cama dos animais. Pode haver uma variação diurna normal na CCS (DOHOO e MEEK, 1982).

A diminuição dos valores de CCS e do número de casos de mastite resultam em benefícios econômicos significativos e melhoria no bem-estar dos animais (HARMON, 1998).

2.5 Impacto da mastite estafilocócica na qualidade e quantidade de leite produzido

MÜLLER (1999) afirma que 70,00% das perdas econômicas são devidas à forma subclínica e 30,00% à forma clínica da mastite e que, dentro de um programa para reduzir esta afecção, controlar e erradicar o *Staphylococcus aureus* e o *Streptococcus agalactiae* é de extrema importância.

VIANNI (1992) estimou os percentuais médios de redução na produção de leite em mamas infectadas por *Staphylococcus aureus* coagulase positiva e negativa em 30,94% e 21,15%, respectivamente.

Outros fatores também importantes e que devem ser considerados são os custos em diagnóstico, medicamentos e descarte de leite, além da taxa de cura bacteriológica muitas vezes inferior a 50% em infecções por estafilocos, o que faz com que o tratamento de mastite subclínica na lactação seja considerado anti-econômico por muitos pesquisadores. (COSTA e WATANABE, 1999).

Segundo PHILPOT (1998), além do efeito negativo sobre a produção, a mastite subclínica reduz os teores de lactose em 5 a 20%, de caseína em 6 a 18 % e de sólidos totais em 3 a 12%. Os minerais, como o cálcio, fósforo e potássio diminuem, enquanto que o sódio e cloro aumentam, sendo estes últimos prejudiciais à qualidade do leite. Além disso, a inflamação aumenta a plasmina e a lipase, sendo que a plasmina causa danos à caseína e a lipase pode rancificar a gordura do leite.

O *Staphylococcus aureus* pode, durante a multiplicação no leite cru, produzir enterotoxinas responsáveis por intoxicação alimentar estafilocócica em pessoas. São conhecidas oito enterotoxinas de origem estafilocócica: A, B, C₁, C₂, C₃, D, E e H (NADER FILHO, 1999).

2.6 Controle da mastite estafilocócica

2.6.1 Controle da mastite estafilocócica com antibióticos

O uso de antimicrobianos no controle da mastite não tem oferecido bons resultados. A resistência dos patógenos a estes produtos tem sido verificada por

alguns pesquisadores. Também os resíduos destas drogas no leite têm limitado o tratamento de vacas lactantes com mastite.

LANGONI et al. (1999), estudando a sensibilidade aos antibióticos dos *Staphylococcus aureus* presentes no leite em São Paulo, encontrou grande incidência de resistência aos principais antimicrobianos. Também DONATELE et al. (1999) demonstraram, em estudo de sensibilidade de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva no Estado do Rio de Janeiro, que 91,70% das cepas eram resistentes à penicilina, 64,50% a oxacilina, 89,50% a ampicilina e 82,80% a amoxicilina.

2.6.2 Emprego de vacinas no controle da mastite estafilocócica.

Segundo BLOOD e RADOTITIS (1991), os anticorpos presentes no soro de vacas vacinadas não aparecem no leite, no colostro ou na glândula mamária durante a involução da mesma, a não ser que o epitélio seja ferido. Por isso, é improvável que qualquer vacina parenteral tenha eficácia completa.

A vacinação tem por objetivo aumentar as concentrações de anticorpos no sangue e no leite frente ao organismo específico, deste modo fornecendo imunidade pela inibição do crescimento bacteriano e da produção de toxinas. Pelo fato do *Staphylococcus aureus* responder tão pouco à terapia com antibióticos, vacinas contra estes microorganismos têm sido mais estudadas (NICKERSON, 1998).

Bacterinas são vacinas feitas a partir de culturas de microorganismos inativados com produtos químicos como a formalina, que age nas proteínas e nos ácidos nucleicos para formar ligações cruzadas e conferir-lhes rigidez estrutural. As toxinas também podem ser inativadas, formando toxóide. Assim, algumas vacinas

podem conter toxinas e bactérias inativadas, sendo chamadas de bacterina-toxóide. A eficácia da vacina inativada pode ser melhorada com uso de adjuvantes como o hidróxido de alumínio, um adjuvante de depósito que, quando injetado, induz a formação de um granuloma rico em macrófagos e que proporciona estímulo antigênico prolongado (TIZARD, 1998).

Tem-se comprovado a possibilidade de estimulação do sistema imunológico para ampliar a sua eficácia, e neste sentido muitos testes têm sido feitos para amenizar ou prevenir mastites por *Staphylococcus aureus* via programas de vacinação, mas com pouco sucesso (HILLERTON et al., 1993). Muitos estudos iniciais utilizaram injeções de bacterinas derivadas de cultura *in vitro*. Embora os títulos de anticorpos séricos aumentassem após a imunização, concentrações adequadas de anticorpos no leite somente são observadas após a infecção. Títulos elevados de anticorpos do leite diminuem a severidade da doença, mas não têm efeito na prevenção de nova infecção mamária (BROCK, 1975).

Segundo NICKERSON (1998), para o preparo da vacina contra mastite, os organismos devem ser cultivados, mortos e injetados no paciente com ou sem toxóides e adjuvantes imunológicos. No entanto, melhores resultados são obtidos com aquelas vacinas que incluem em sua formulação fatores de virulência do *Staphylococcus aureus*, como a Proteína A, pseudocápsulas e adesinas.

YOSHIDA et al. (1984) formularam uma vacina com *Staphylococcus* encapsulado, consistindo de *S. aureus* tipo A e B inativados pelo calor, além de polissacarídeos capsulares extraídos de *Staphylococcus epidermidis*. Esta preparação foi aplicada em dois rebanhos pela via intramuscular seguida de reforço 15 dias após. Nos quatro meses seguintes, a taxa de mastite por *Staphylococcus*

aureus, bem como a CCS foram menores nas vacas vacinadas do que no grupo controle.

WATSON et al. (1996) desenvolveram um toxóide celular inativado, preparado de duas cepas de *Staphylococcus aureus* que produziram material pseudocapsular e hemolisinas beta e gama, e que depois foram misturados com um adjuvante de óleo mineral e Dextran sulfato. Após aplicação por via intramuscular por duas vezes, em intervalos de 4 a 6 semanas durante as últimas 10 semanas de prenhez, o número de casos clínicos de mastite foi menores nas vacas vacinadas do que no grupo controle, embora a diferença não tenha sido significativa.

Segundo TIZARD (1998), quando o antígeno entra nos linfonodos, inicia-se a captura linfocítica, ou seja, os linfócitos que de forma normal passam livremente através desses órgãos são retidos. O mecanismo do processo de captura não é claro, mas provavelmente resulta da interação entre antígeno e macrófagos, levando à liberação de um fator que influencia o movimento dos linfócitos. A captura concentra os linfócitos próximos aos locais de acúmulo antigênicos, o que aumenta a eficiência da resposta imune. Alguns adjuvantes também podem agir por meio da potencialização da captura. Após cerca de 24 horas, o linfonodo libera células capturadas e aumenta sua produção de células de defesa durante aproximadamente sete dias.

Uma injeção intramuscular de bacterina no fim da lactação, seguida de uma injeção de reforço na área do linfonodo mamário no período pré-parto, resulta em altos títulos de anticorpos durante a lactação subsequente e promove a proliferação de células linfóides sensibilizadas no tecido mamário involuído, produzindo grandes quantidades de IgA e IgM (NICKERSON, 1998).

GIRAUDO et al. (1998) desenvolveram uma vacina baseada em *Staphylococcus aureus* inativados e encapsulados, extrato bruto de exopolissacarídeos de *Staphylococcus aureus*, e espécies de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus sp.* não-encapsulados inativados, em adjuvante de hidróxido de alumínio. As frequências de mastites foram reduzidas de 18% no grupo controle para 6,7 e 6,0% nas novilhas vacinadas pré-parto e pós-parto, respectivamente, e este efeito foi mantido por no mínimo 6 meses. A produção de gordura aumentou levemente no leite das vacas vacinadas, mas não houve efeitos na CCS quando comparada com o do grupo controle.

A eficácia de uma vacina pode ser medida pela porcentagem de animais que respondem satisfatoriamente ao desafio. A eficácia real de uma vacina, chamada de fração evitável (FE) é calculada pela seguinte fórmula:

$$FE = \frac{(\% \text{ de morte de controles} - \% \text{ de morte de vacinados})}{\% \text{ de mortes de controles}}$$

As vacinas com eficácia aceitável devem ter uma FE de pelo menos 80%. Contudo vacinas menos efetivas tornam-se aceitáveis se não houver nenhuma melhor (TIZARD, 1998).

Não se conseguiu encontrar referências na literatura quanto ao emprego de vacina (bacterina) contra *Staphylococcus aureus* injetada na região do linfonodo mamário, em intervalos de uma ou duas semanas durante quatro meses em vacas lactantes. Assim, conduziu-se o presente experimento, cujo principal objetivo foi avaliar a eficácia dessa nova alternativa de controle de mastite, e determinar o impacto econômico que esta técnica poderia causar na atividade leiteira.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e manejo do rebanho

Foram utilizadas vacas lactantes da raça Jersey, de alto padrão zootécnico, em uma propriedade da região metropolitana de Curitiba¹. No manejo adotado pela propriedade a composição da dieta varia conforme a produção, e as vacas são separadas em quatro lotes segundo a produção e sanidade da glândula mamária, sendo que as vacas com mastite subclínica, crônica ou que estejam em tratamento permanecem no último lote a ser ordenhado, para evitar que o leite com resíduos e patógenos se misture com o leite do tanque de coleta.

A ordenha é feita mecanicamente duas vezes ao dia. A sala de ordenha está instalada em forma de espinha de peixe e tem capacidade para ordenhar seis vacas por vez. A cada ordenha, todas as vacas são submetidas ao teste do caneco do fundo escuro para detectar possíveis mastites clínicas. Antes da ordenha os tetos são submergidos em uma solução desinfetante à base de ácido cloroso e dióxido de cloro. Caso os tetos estejam sujos, eles são lavados com água antes desse procedimento. A seguir, os tetos são limpos e secos com toalha de papel, usando-se uma toalha para cada teto. Após a ordenha aplica-se o mesmo produto usado antes da ordenha.

Semanalmente as vacas são submetidas pelo veterinário residente, ao *California Mastitis Test* (CMT), sendo que a partir desse teste a inflamação da mama é classificada em leve (traço e positiva +), e moderada (positiva ++) e grave (positiva +++).

¹ Sítio Bom Jesus, Estrada da Baitaca s/n, fone: (41) 772-1116 Quatro Barras - Pr

Mensalmente as vacas registradas são submetidas às provas da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH), para determinação dos teores de gordura, contagem de células somáticas (CCS) no leite e produção leiteira.

3.2 Isolamento do patógeno

Antes que se iniciasse o experimento, amostras de leite foram colhidas assepticamente em frasco estéril daquelas vacas que apresentavam mastite subclínica detectadas pelo método do CMT e CCS. As quais foram enviadas sob refrigeração para o laboratório² para isolamento do agente causador da mastite. No laboratório, as amostras de leite foram semeadas em ágar manitol e ágar sangue, e as placas incubadas a 37^o C durante 48 a 72 horas.

A análise do crescimento bacteriano em ambos os meios de cultivo foram realizadas conjuntamente. As colônias brancas ou amareladas, com ou sem hemólise em ágar sangue e apresentando diâmetro maior que 1mm foram coradas pela técnica de Gram e submetidas ao teste de coagulase em lâmina. Cocos Gram-positivos e coagulase positivos foram considerados como sendo *Staphylococcus aureus*. Concomitantemente no ágar manitol, colônias amarelo douradas, manitol positivas, foram consideradas suspeitas. Estas foram semeadas em ágar sangue e submetidas aos mesmos procedimentos citados anteriormente.

As cepas isoladas de, no mínimo, 10 animais da mesma propriedade foram utilizadas para a confecção da vacina.

² Laboratório Veterinária Preventiva: R. São Pedro – Cabral - Fone: 41-352-44-80, 80035-020 – Curitiba - PR

3.3 Elaboração da vacina

As cepas de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva utilizadas como antígeno vacinal foram submetidas aos testes de sensibilidade e resistência aos principais antimicrobianos, para determinar sua pureza, sendo utilizadas as cepas que apresentaram comportamento idêntico.

Estas cepas foram cultivadas em 250 ml de caldo B.H.I. com 1% de glicose, em frascos de Erlenmeyer com capacidade para 1.000 ml e incubadas em estufa a 37^oC durante 5 dias sob agitação contínua.

Após este período, o cultivo foi submetido a dois teste de pureza, semeando-se em ágar sangue de carneiro e ágar manitol, que foram incubados a 37^o C por 48 horas. Para os procedimentos de contagens do número de bactérias (determinação do número de unidades formadoras de colônia - U.F.C), utilizou-se a técnica de diluição decimal até 10⁻¹⁰ em solução fisiológica até obter-se 17 x 10⁹ U.F.C/ml em placa para contagem em ágar.

A inativação das bactérias foi feita adicionando-se formalina ao caldo para atingir a concentração de 6/1000. A seguir, o caldo bacteriano foi incubado a 37^oC por 48 horas, após as quais foi realizado o teste de esterilidade. Este consistiu na colheita de 10 ml do caldo, que foram semeados em *thioglicolato* e caldo *Sabouraud* e incubados a 37^o C durante 48 a 72 horas e a 21^o C durante 15 dias, respectivamente. Uma vez constatada a esterilidade, adicionaram-se ao caldo 25 ml de solução de hidróxido de alumínio a 10% como adjuvante vacinal, atingindo a concentração final de 2,5% na vacina. Um teste de inocuidade foi realizado inoculando-se 1ml da bacterina em 2 cobaias (*Cavya porcellus*) pela via subcutânea.

Comprovada sua inocuidade, a bacterina foi envasada em frascos contendo 50 ml e mantida refrigerada em geladeira a 2 - 8°C.

3.4 *Desenho experimental*

Foram utilizadas 45 vacas em lactação escolhidas de forma aleatória e divididas em três grupos de 15 vacas cada. O grupo controle não recebeu nenhum tipo de tratamento; o grupo semanal era vacinado semanalmente, cada vaca recebendo 3,0 ml da bacterina por via subcutânea na região adjacente ao linfonodo mamário e o grupo quinzenal era vacinado a cada quinze dias da mesma maneira que o grupo semanal. O experimento teve duração de quatro meses, o grupo semanal recebendo um total de 16 doses de vacina e o grupo quinzenal, oito doses de vacina. As vacas eram vacinadas após a ordenha enquanto se alimentavam no *free-stall*. Amostras de leite eram colhidas semanalmente de todas as vacas dos três grupos. O leite era colhido, diretamente do balão na sala de ordenha, em frascos especiais fornecidos pelo laboratório da APCBRH com capacidade para 30 ml e contendo uma pastilha de dicromato de potássio como conservante. As amostras de cada animal eram datadas, identificadas e enviadas ao laboratório a temperatura ambiente para determinação das percentagens de gordura, lactose, sólidos totais e proteína e para a contagem de células somáticas (CCS). A medição da produção era feita diretamente no balão da ordenhadeira.

A contagem de células somáticas foi feita com equipamento automático³ no laboratório da APCBR. A CCS foi estudada em dois níveis: de 3×10^5 cel/ml que foi utilizado como limite entre a mama sadia e a infectada, e de 5×10^5 cel/ml, que é o

³ *Somacount500* - Contador Eletrônico de Células por Fluorescência. Bentley Inc. Minnesota - EUA

valor limite adotado nos laticínios como um dos itens do programa de pagamento por qualidade do leite.

A dosagem de lactose, sólidos totais, gordura e proteína também foram feitas no laboratório da APCBRH por método automático⁴ através de radiação infravermelha.

As vacas que apresentavam mastite clínica ou contagem de células somáticas acima de 5×10^5 /ml de leite, foram submetidas a exames bacteriológicos para identificar o patógeno.

3.5 Análise estatística

As variáveis foram analisadas por meio do teste do Qui-quadrado e da técnica de dados longitudinais⁵.

3.6 Análise do Custo-Benefício

A análise custo-benefício da imunização contra mastite com bacterina de *Staphylococcus aureus* foi feita considerando uma projeção dos casos de mastite graves (+++ ao CMT), que surgiriam num período de um ano com dados obtidos neste trabalho. A quantidade de leite descartada, variação na produção de leite, custo com o tratamento nos casos de mastite e os custos com a vacina foram considerados com os seguintes valores:

- Preço do leite, por litro – R\$ 0,26, ou US\$ 0,13

⁴ Bentley 2000 – Analisador de Leite por radiação infravermelha. Bentley Inc. Minesota – EUA

⁵ Software “Statistica Graph” – Microsoft

- Custo do tratamento com antimicrobiano intramamário em duas aplicações -
R\$ 6,00 ou US\$ 3,15

- Custo da vacina feita sob encomenda em laboratório particular – R\$0,60 ou
US\$ 0,31/dose

Nesta análise não foram levadas em conta as formas mais brandas de mastite (+ e ++ ao CMT), possíveis diferenças na qualidade do leite, bem como a despesas com mão-de-obra e prejuízos com descarte de animais.

3.7 Cálculo da eficácia da vacina

O cálculo foi feito através da fórmula proposta por TIZARD, 1998, cujo resultado é uma estimativa da fração evitável da vacina. Para tanto, substituiu-se a porcentagem de mortes pela porcentagem de mamas afetadas.

$$FE = \frac{(\% \text{ de mamas afetadas grupo controle} - \% \text{ de mamas afetadas grupo semanal})}{\% \text{ de mamas afetadas grupo controles}}$$

4.RESULTADOS

4.1 Reação à aplicação da vacina

Em nenhum dos animais foram observadas reações locais ou sistêmicas, imediatas ou mediatas e atribuíveis à presença da vacina no tecido subcutâneo próximo à região do linfonodo mamário, a não ser discreto e passageiro aumento de volume no local da aplicação, que foi atribuído ao trauma próprio do procedimento de injeção. A posição dos animais no *free stall* facilitou grandemente o procedimento, tanto para a aplicação como a avaliação de eventuais reações.

4.2 Prevalência da mastite durante o experimento

Durante 16 semanas de experimento, nas 45 vacas ocorreram 27 casos de mastite, sendo que 22 casos (81,48%) foram de mastites subclínicas e cinco casos (18,54%) de mastite clínica.

Quanto à mastite subclínica, 16 casos (72,72%) foram causados por *S. aureus* coagulase positiva, três (13,60%) por *S. aureus* coagulase negativa, e em três (13,60%) das amostras não se conseguiu isolar o patógeno. As mastites subclínicas causadas por *S. aureus* coagulase positiva ocorreram nos três grupos, distribuídos da seguinte forma: 32,25% no grupo controle; 25,00% no grupo semanal; e 43,75% no grupo quinzenal. Já dos episódios de mastite clínica, 3 casos (60%) foram causados por *Escherichia coli*, ocorrendo 2 casos no grupo controle e 1 no grupo semanal; os outros dois casos (40%) foram causados pelo *S. aureus* coagulase positiva, ocorrendo apenas no grupo quinzenal.

4.3 Análise da contagem de células somáticas/ml de leite

Com relação a CCS, as médias e as porcentagens de amostras com contagem superior a 3×10^5 cel /ml e superior a 5×10^5 cel /ml de leite estão sumarizados nas tabelas 1 a 3.

Tabela 1 - Valores médios semanais de células somáticas ($\times 10^3/\text{ml}$) presentes em amostras de leite de vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S. aureus* sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas.

Semana	GRUPOS					
	Controle (n = 15)		Semanal (n=15)		Quinzenal (n=15)	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
1	550,1	755,7	198,9	89,0	289,2	297,3
2	232,5	145,0	101,6	379,0	417,0	584,0
3	409,1	991,0	129,2	93,8	314,6	513,0
4	139,2	119,2	71,9	63,2	137,6	91,3
5	365,0	722,0	81,0	84,3	547,2	1111,0
6	377,9	829,0	146,0	209,7	380,3	464,9
7	123,4	148,2	88,8	96,8	308,0	610,1
8	215,1	208,3	171,2	292,4	354,4	258,2
9	325,9	332,0	747,0	139,3	285,0	383,0
10	443,1	386,1	331,0	586,7	530,9	537,4
11	513,0	551,0	331,7	511,0	322,3	490,0
12	452,1	522,7	225,1	170,0	327,9	407,5
13	392,0	396,0	221,7	169,0	322,2	489,0
14	380,0	474,0	245,6	319,0	382,9	321,0
15	435,2	433,9	295,2	496,6	314,3	359,5
16	645,3	803,9	457,9	760,0	288,3	290,0
Média	374,9		240,2		339,0	

Tabela 2 - Número de amostras de leite com contagem de células somáticas superior e inferior a 3×10^5 céls/ml em vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S. aureus* sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas.

GRUPO	ACIMA DE 3×10^5		ABAIXO DE 3×10^5		TOTAL
	n	%	n	%	n
Controle	80	38,27 ^b	129	61,72	209
Semanal	46	18,77 ^a	199	81,22	245
Quinzenal	59	29,20 ^b	143	70,80	202
Total	185	28,20	471	71,80	656

Nota: a é diferente de b ($p \leq 0,05$).

Tabela 3 - Número de amostras de leite com contagem de células somáticas superior e inferior a 5×10^5 céls/ml em vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S. aureus*, sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas.

GRUPO	ABAIXO DE 5×10^5		ACIMA DE 5×10^5		TOTAL
	n	%	n	%	n
Controle	160	76,55	49	23,44 ^b	209
Semanal	227	92,65	18	9,56 ^a	245
Quinzenal	166	82,21	36	17,82 ^b	202
Total	553	84,29	103	15,70	656

Nota: a é diferente de b ($p \leq 0,05$).

4.4 Resultados das provas do CMT

Os resultados provenientes das provas do CMT estão agrupados nas tabelas 4 a 6, sendo que a distribuição de mastite segundo sua gravidade entre os grupos estão representados graficamente na figura 1.

Tabela 4 - Número de mamas afetadas com mastite, ao teste do CMT, em vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S. aureus* sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas.

GRUPO	MAMAS AFETADAS		MAMAS NÃO AFETADAS		TOTAL
	n	%	n	%	n
Controle	187	22,70 ^b	637	77,3	824
Semanal	83	9,16 ^a	823	90,83	906
Quinzenal	174	24,85 ^b	526	75,14	700
Total	444	18,27	1986	81,73	2430

CMT- *California Mastitis Test*

Nota: a é diferente b ($p \leq 0,05$).

Tabela 5 - Número de mamas afetadas, segundo a severidade da reação pelo CMT, em vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S. aureus*, sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas.

GRUPO	Traço		+		++		+++		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Controle	108	13,1	195	23,6	179	21,7	342	41,5 ^c	824	100
Semanal	304	33,5	276	30,4	145	16,0	181	19,9 ^a	906	100
Quinzenal	97	13,8	201	28,7	133	19,0	269	38,4 ^b	700	100

Nota: a, b, c são diferentes entre si ($p \leq 0,05$).

CMT: *California Mastitis Test*

Traço: suspeito; +, ++ e +++ resultados positivos em ordem de severidade da reação ao CMT

Tabela 6 - Gravidade da inflamação mamária, de acordo com o CMT, em vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S. aureus* sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas.

GRUPO	LEVE		MODERADA A GRAVE		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%
Controle	303	36,7	521	63,3 ^c	824	100
Semanal	580	64,1	326	35,9 ^a	906	100
Quinzenal	298	42,6	402	57,4 ^b	700	100

Nota: a, b, c são diferentes entre si ($p \leq 0,05$).

CMT: *California Mastitis Test*

Leve: reações suspeitas e positivas + ao CMT

Moderada a grave: reações positivas ++ e +++ ao CMT

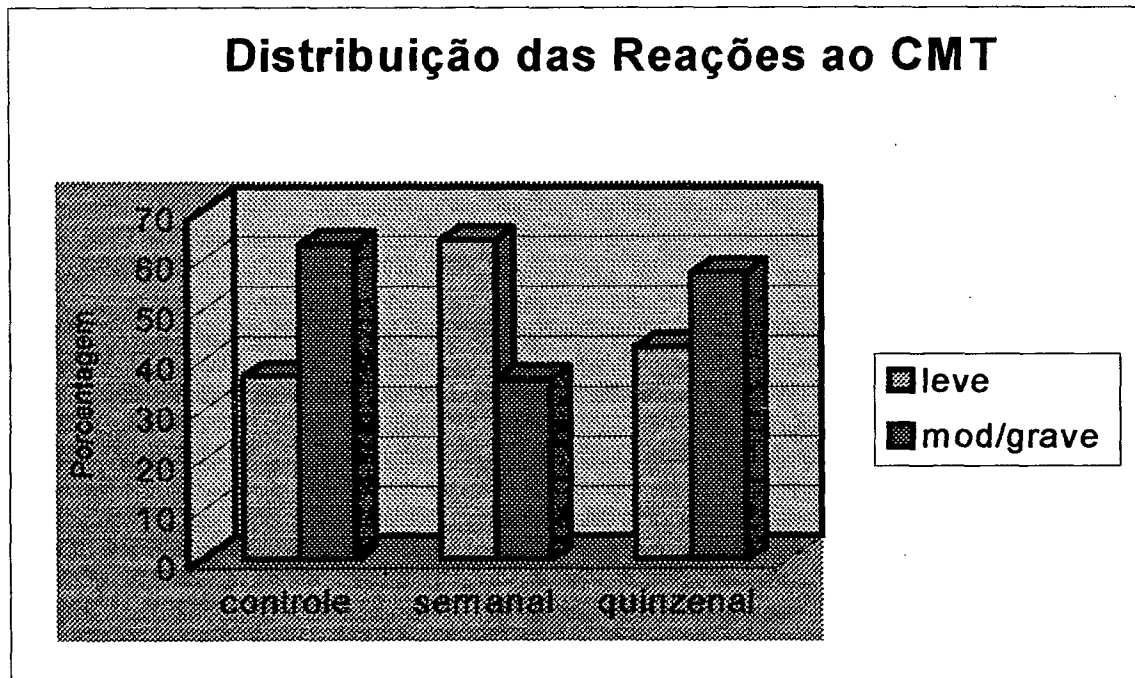


Figura1 Distribuição dos casos de mastite quanto à gravidade da inflamação, segundo reação ao CMT (*California Mastitis Test*), em vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *Staphylococcus aureus*, sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas.

4.5 Resultados da análise da qualidade e produção de leite

Os valores médios da análise da qualidade e produção estão sumarizados na tabela 7.

Tabela 7 - Valores médios da produção de leite (kg/dia) e porcentagens de gordura, proteína, sólidos totais e lactose, em vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S. aureus*, sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas.

GRUPO	LEITE (kg)	GORDURA (%)	PROTEÍNAS (%)	SÓLIDOS TOTALS (%)	LACTOSE (%)
Controle	17,79	4,08	3,62	13,19	4,66
Semanal	19,05	4,11	3,67	13,31	4,67
Quinzenal	17,19	4,40	3,68	13,68	4,68

As curvas referentes a produção de leite em quilogramas, e aos teores de lactose, sólidos totais, gordura e proteína, bem como o resultado da análise estatística de dados longitudinais estão representados nas figuras 2 a 11.

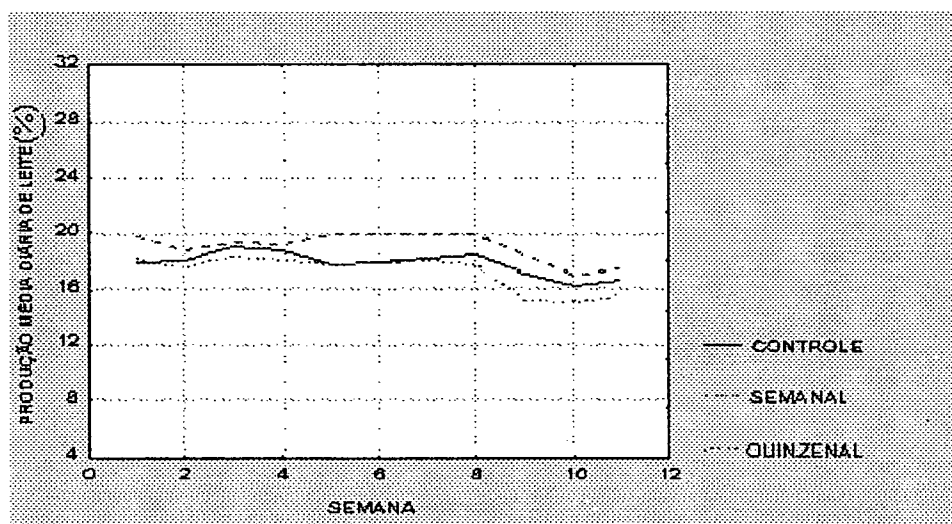


Figura 2 - Variação na produção média diária de leite, em quilogramas, de vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S. aureus*, com dois esquemas posológicos diferentes, durante 11 semanas.

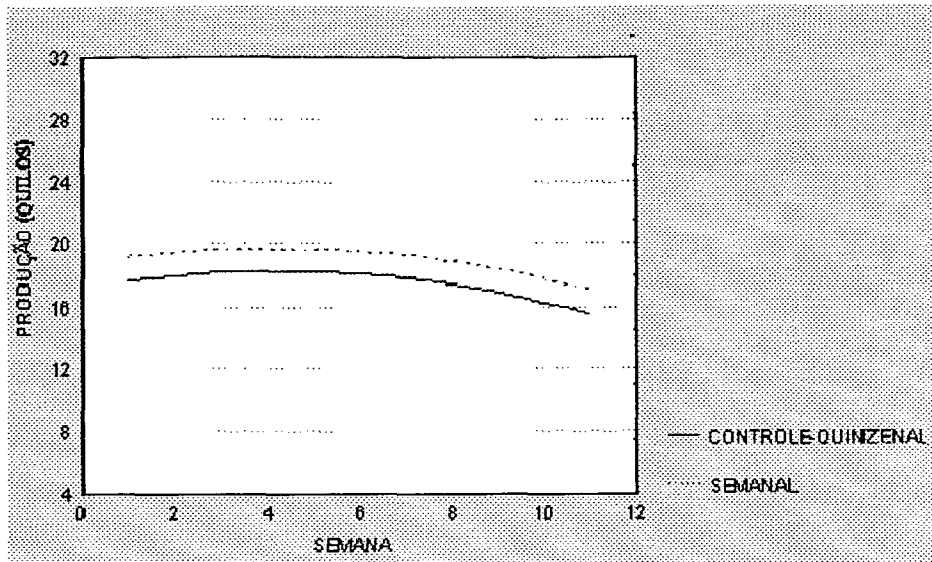


Figura 3 - Modelo estatístico ajustado para a produção média de leite, em quilogramas, das vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S. aureus*, sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 11 semanas.

Nota: As curvas referentes a produção de leite foram diferentes entre os grupos, sendo que o grupo semanal apresentou maior produção de leite (kg) em relação aos grupos controle e quinzenal.

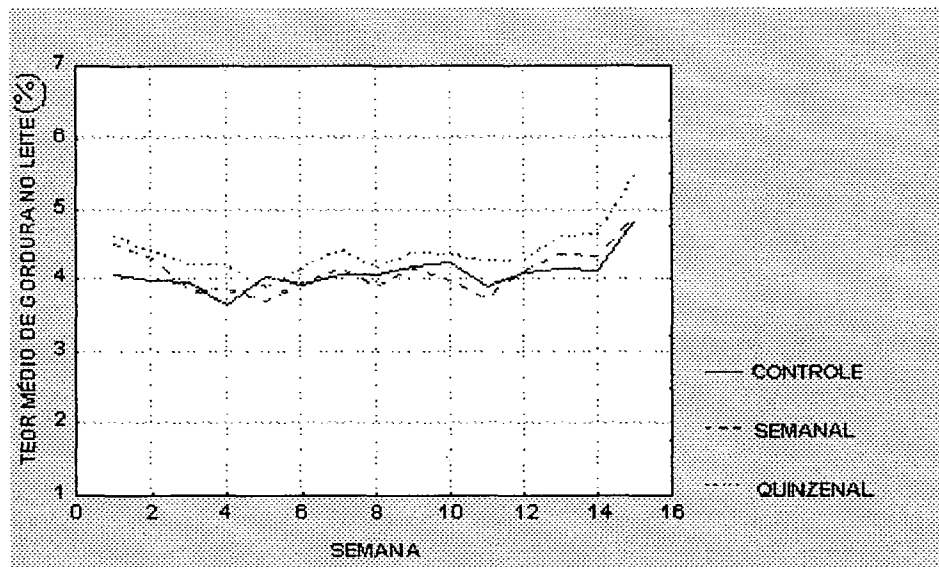


Figura 4 - Variação nos teores médios de gordura (%) no leite de vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S. aureus*, sob dois esquemas posológicos, durante 16 semanas.

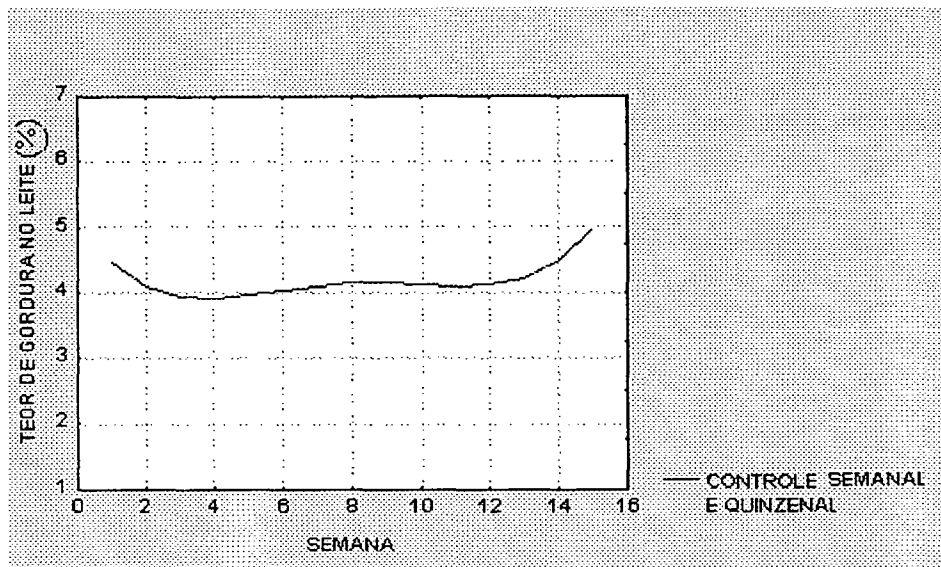


Figura 5 - Modelo estatístico ajustado para o teor médio de gordura (%) do leite de vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S. aureus* sob dois esquemas posológicos, durante 16 semanas.

Nota: As curvas referentes às percentagens médias de gordura no leite foram semelhantes entre os grupos, isto é, não houveram diferenças significativas entre eles.

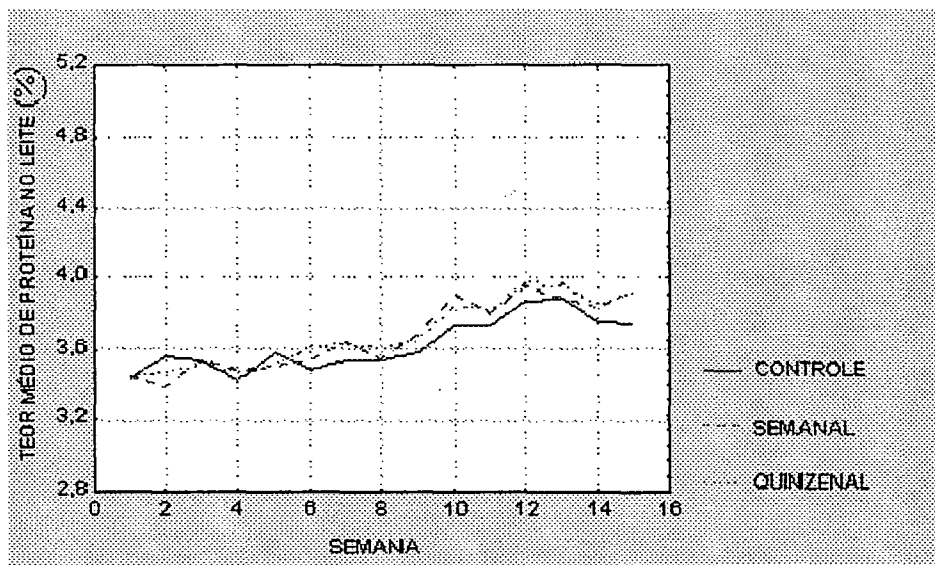


Figura 6 - Variação nos teores médios de proteína (%) no leite de vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S. aureus*, sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas.

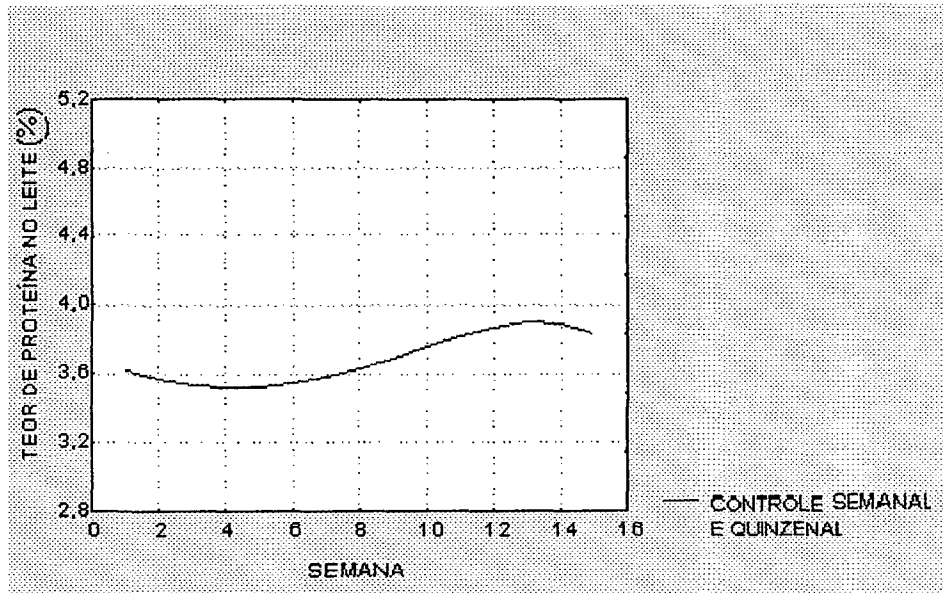


Figura 7 - Modelo estatístico ajustado para o teor médio de proteína (%) no leite de vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S. aureus*, sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas.

Nota: As curvas referentes aos teores médios de proteína no leite foram semelhantes entre os grupos, isto é, não houveram diferenças significantes e os teores médios de proteína não variaram entre os grupos.

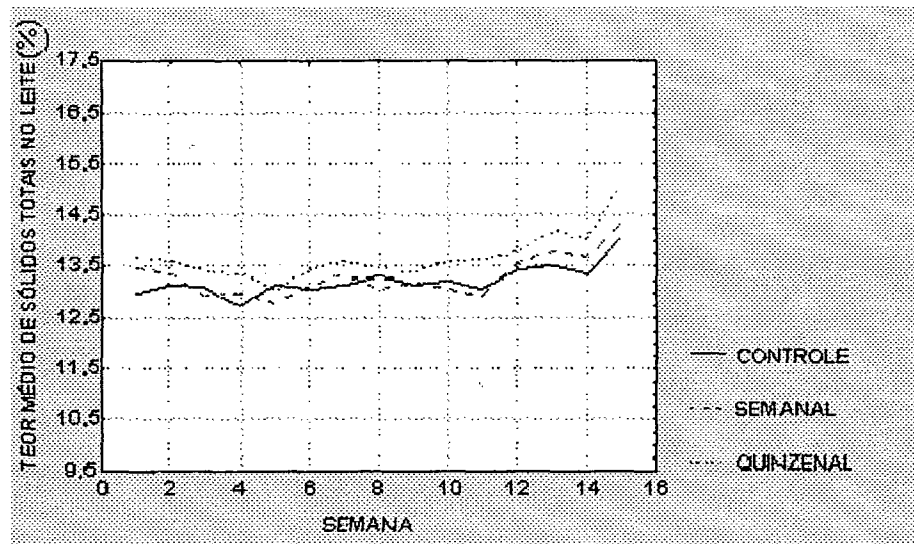


Figura 8 - Variação nos teores médios de sólidos totais (%) no leite de vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S. aureus*, sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas.

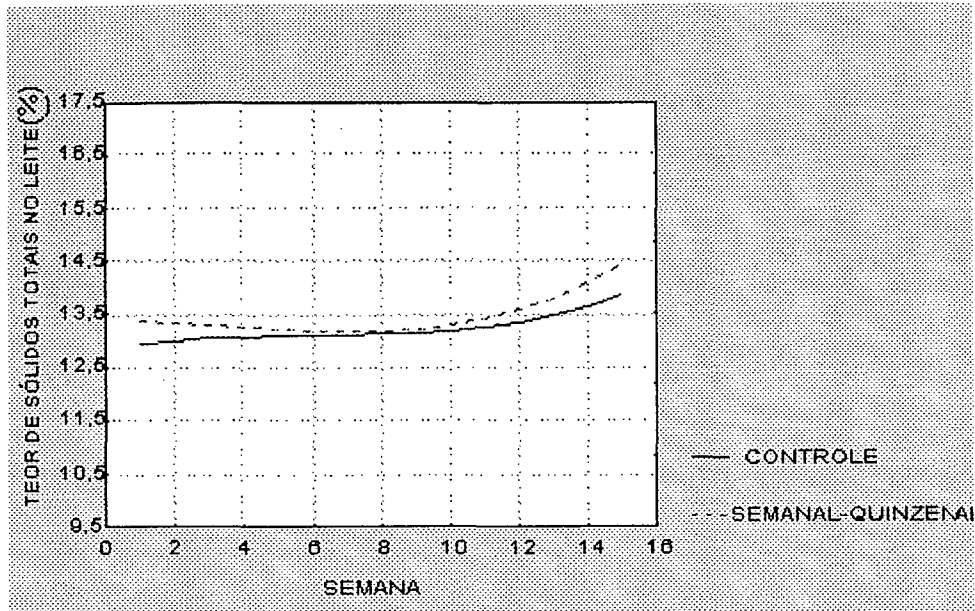


Figura 9 - Modelo estatístico ajustado para o teor de sólidos totais (%) no leite de vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S. aureus*, sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas.

Nota: A curva referente ao teor de sólidos totais no leite é diferente entre os grupos, sendo que no grupo teste semanal e quinzenal as percentagens de sólidos totais foram maiores que no grupo controle.

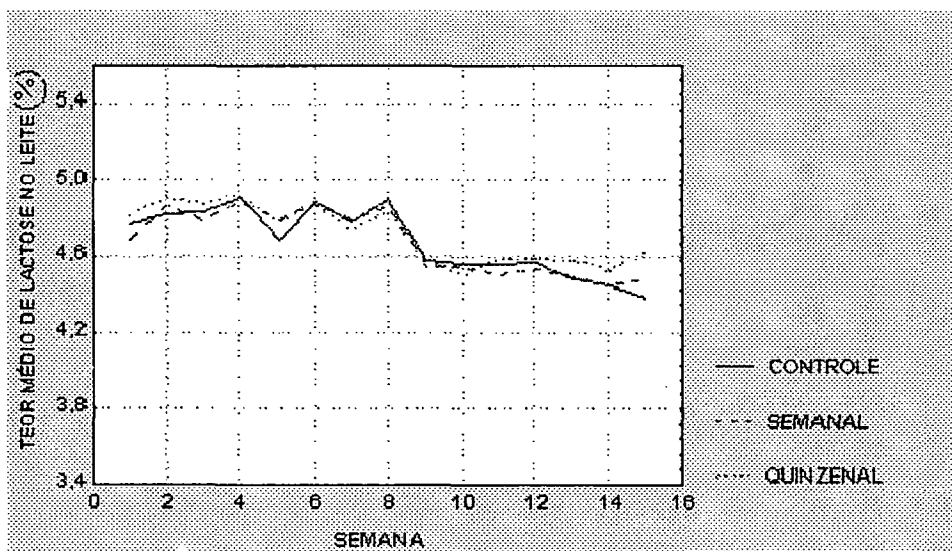


Figura 10 - Variação nos teores médios de lactose (%) no leite de vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *S. aureus*, sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas.

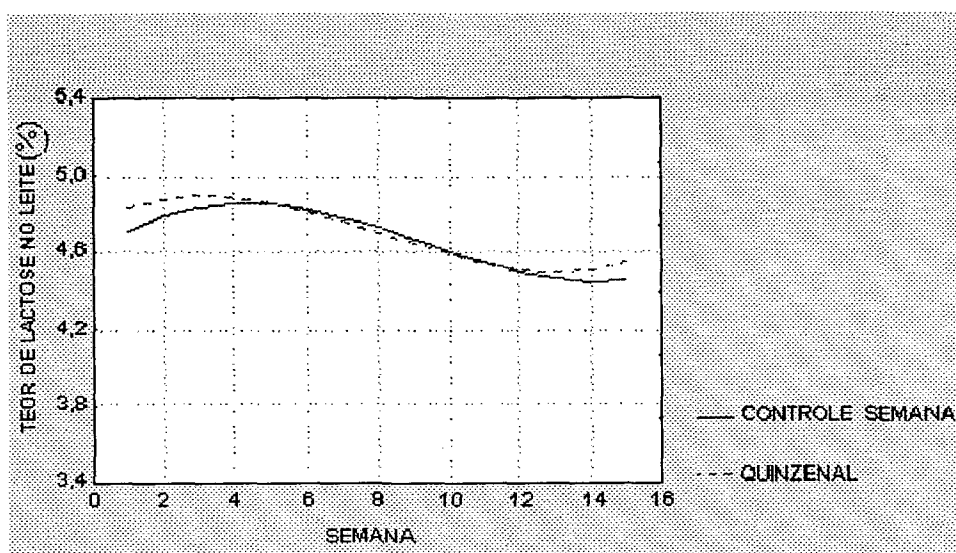


Figura 11 - Modelo estatístico ajustado para o teor em lactose (%) no leite de vacas vacinadas contra mastite com bacterina de *Staphylococcus aureus*, sob dois esquemas posológicos diferentes, durante 16 semanas.

Nota: A curva referente ao teor de lactose é diferente entre os grupos, sendo que no grupo quinzenal o teor de lactose (%) foi maior em relação aos grupos semanal e quinzenal.

4.6 Análise Custo/Benefício da vacinação

Os dados referentes a análise econômica (relação custo-benefício) da vacinação semanal comparada com o grupo controle estão sumarizados na tabela 8, que representa a projeção de custos para um ano.

Tabela 8 - Análise custo/benefício do processo de vacinação de vacas contra mastite com bacterina de *S. aureus*, comparando-se o grupo controle e o semanal, durante um ano.

	CONTROLE	SEMANAL
Número de mamas afetadas (+++) ao CMT	116,5	22,4
Leite descartado (R\$)	-3.609,15 (1.899,55)	- 700,50 (368,68)
Custo tratamento(R\$)	-1.399,80 (736,73)	- 271,68 (142,99)
Custo da vacina(R\$)	-	- 2.280,0 (1.200,00)
Aumento na produção(R\$)	-	+ 4.896,0 (2.576,84)
Total	- 5.008,95 (2.636,28)	+1.599,02 (841,59)

Nota : Entre parênteses valores equivalentes em US\$

(+++): forma consideradas apenas os casos de mastite graves ao CMT

4.7 Cálculo da eficácia da vacina

Por meio da fórmula de fração evitável da vacina (FE), o resultado para o grupo semanal foi de 59,6%, no entanto para o grupo quinzenal não foi possível determinar porque não houve diferenças entre este grupo e o controle.

5. DISCUSSÃO

Na análise da contagem de células somáticas, verificou-se que as médias da CCS foram menores nas vacas vacinadas semanalmente do que no grupo controle ($2,4 \times 10^5$ cél/ml e $3,75 \times 10^5$ cel/ml respectivamente). Também, no grupo semanal, a percentagem de amostras com CCS inferior a $3,0 \times 10^5$ cél/ml, foi maior em 31,60% em relação ao grupo controle. Considerando que no leite de glândulas saudáveis a CCS deve ser inferior a $3,0 \times 10^5$ cél/ml (RENEAU, 1986) e que contagens acima desse valor indicam inflamação da mama (PHILPOT, 1998), pode-se dizer que a vacina aplicada semanalmente diminui a porcentagem de vacas com glândulas inflamadas. É importante ressaltar que, apesar do estímulo ao sistema imunológico ter sido mais freqüente nas vacas vacinadas semanalmente, comparando-se com outros métodos convencionais de vacinação, não se observou aumento, mas sim uma diminuição na contagem celular do leite, mesmo nas vacas vacinadas que apresentavam mastite durante o experimento. Talvez isto deveu-se ao fato de que a vacina tenha estimulado o suficiente a produção de anticorpos para, conseqüentemente, diminuir a extensão da injúria ao epitélio mamário causado pelo *S. aureus* e diminuir a atração de células de defesa para o foco da inflamação.

Encontrou-se percentagem menor de mamas afetadas ao CMT nas vacas vacinadas semanalmente do que no grupo controle (9,16% e 22,70% respectivamente), o que representa uma diminuição de, aproximadamente 60% na percentagem de mamas afetadas. Além disto, as percentagens de mamas afetadas ao CMT, classificadas como moderadas e grave, foram significativamente menores no grupo semanal, comparando-se com o grupo controle e quinzenal (35,98%,

63,22% e 57,43%, respectivamente). A estimulação semanal foi eficaz na redução do número de casos de mastite subclínica e na gravidade das infecções. Para que isso tenha ocorrido, era necessário que já houvesse grande quantidade de imunoglobulinas e células de defesa disponíveis e capazes de proteger a glândula em tempo hábil quando infectada, já que o *Staphylococcus aureus*, apesar de ter alta patogenicidade, tem baixo poder imunogênico (AMARAL, 1999) e o leite dilui grande parte dos fatores de defesa da glândula (SANDHOLM e KORHONEN, 1995). A aplicação da vacina repetidamente e a intervalos relativamente curtos foi, aparentemente, o fator capaz de manter os níveis de imunoglobulinas, células e outros fatores num patamar adequado para enfrentar o desafio representado pelo *Staphylococcus aureus*.

A fração evitável da vacina foi de 50,6%. Mas segundo TIZARD (1998), as boas vacinas devem ter uma fração evitável de pelo menos 80%. Considerando que BLOOD e RADOSTITS (1991) e HILLERTON et al. (1996) destacaram a ineficácia das vacinas contra mastite estafilocócica, uma fração evitável de 60% de mamas com mastite parece ser um resultado bastante animador.

A percentagem de amostras de leite com contagem de células abaixo de 5×10^5 cél/ml foi significativamente maior no grupo semanal em relação aos demais grupos. Neste sentido, a vacinação pode também beneficiar os produtores mantendo os níveis de CCS mais baixos no leite e conseqüentemente melhorando-o quanto à qualidade.

Quanto à produção de leite, as vacas do grupo semanal produziram 7,12% a mais em relação ao grupo controle, apesar daquele grupo ter sido submetido à perturbação da vacinação semanal. Isto demonstra, que a vacina aplicada

semanalmente não é um fator estressante para as vacas e, à medida que se melhorou a saúde das glândulas mamárias, a produtividade também aumentou. Isto também foi verificado por VIANNI (1992).

Através da análise de dados longitudinais, procurou-se estudar o comportamento dos níveis dos principais componentes que podem refletir na qualidade do leite. Comparando-se as curvas da variável sólidos totais no leite, a percentagem média do grupo semanal e quinzenal foi ligeiramente superior à média do grupo controle, isto porque glândulas saudáveis produzem leite de melhor qualidade (PHILPOT, 1998). Considerando os teores de proteína e gordura, as curvas não foram significativamente diferentes entre os três grupos, embora o teor médio de gordura e a curva do teor médio em lactose foram maiores no grupo quinzenal. Os teores maiores de lactose e gordura no leite das vacas vacinadas quinzenalmente talvez devam-se ao fato de que, neste grupo, a produção de leite tenha sido menor e conseqüentemente com menor efeito de diluição sobre estes componentes.

Talvez a principal razão para o uso de um programa de vacinação contra a mastite bovina seja de natureza econômica, já que essa afecção é a grande causa de prejuízos na exploração leiteira de todo o mundo (HARMON, 1998). Neste sentido a análise custo/benefício da vacinação foi feita para quantificar possíveis ganhos com tal procedimento. Verificou-se que não vacinando as vacas, o produtor estaria sujeito a perder em torno de US\$ 2.636,28 (ou R\$ 5.008,95) com as mastites durante o ano, enquanto que vacinando semanalmente o produtor não perderia, mas sim ganharia em torno de US\$ 841,59 ao ano (ou R\$ 1.599,02) com a diminuição dos custos com tratamento da mastite, diminuição dos prejuízos com descartes de

leite e ganhos em produção leiteira. Estes resultados foram obtidos levando-se em consideração apenas a ocorrência de mastites causadas por *S. aureus* e considerados severas no CMT. Não se conseguiu computar os prejuízos causados por outras formas de mastites, queda na qualidade do leite, mão-de-obra, descarte de animais, serviço veterinário e medicamentos, além do bem estar animal. Se esses fatores forem levados em conta, os benefícios econômicos que a vacina utilizada semanalmente poderia proporcionar à exploração leiteira seriam ainda mais expressivos.

Durante as dezesseis semanas de experimento, as mastites subclínicas foram as mais freqüentes (81,46% do total de casos de mastite), sendo o *S. aureus* o principal agente causador. Embora tenham ocorrido em todos os grupos, no grupo semanal a percentagem de mastites subclínicas causada por *Staphylococcus aureus* foi menor, provando a eficiência desse esquema posológico. Apenas no grupo quinzenal ocorreu mastite clínica por *S. aureus*, sendo que nos outros dois grupos foram causadas por *E. coli*. Em virtude do pequeno volume de dados da avaliação microbiológica, não foi possível fazer uma análise estatística para estabelecer diferenças significativas, mas os dados obtidos permitem dizer que, embora não tenha impedido que as glândulas fossem infectadas, a gravidade e a prevalência das infecções subclínicas causadas por *S. aureus* coagulase positiva foram menores nos animais onde a vacina foi repetida semanalmente. A diminuição da gravidade da infecção nas vacas vacinadas semanalmente tem um significado importante no que diz respeito ao dano que o *S. aureus* causa ao tecido secretor, que poderia comprometer seriamente a produção em lactações futuras (SCHALM, 1971).

É questionável a influência do local da aplicação das vacinas na resposta imunitária do paciente. Isto é, questiona-se se a aplicação da vacina nas proximidades da mama e do linfonodo mamário induziriam melhores respostas do que a aplicação no tecido subcutâneo de qualquer outra região corporal. NICKERSON (1998) e TIZARD (1998) afirmaram que a deposição de antígeno naquela região resultaria em uma maior proliferação de células de defesa e maior produção de imunoglobulinas, mas tal afirmação não pode ser confirmada no presente experimento por não ter sido este o seu objetivo. Assim, recomenda-se que novas pesquisas sejam feitas para comprovar aquela hipótese. Contudo, pode-se afirmar que aquele local de aplicação é conveniente devido à posição dos animais no estábulo. Isto, aliado à ausência de reações adversas recomendam o local e a via de aplicação como ideais para vacinação das vacas contra mastite.

6.CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

1. A vacinação com bacterina de *Staphylococcus aureus* isolados do próprio rebanho foi eficaz no controle de mastite contagiosa em vacas lactantes, sendo que a vacinação semanal apresentou melhores resultados do que a vacinação quinzenal.
2. A prevalência de mastites subclínicas, bem como a gravidade das mesmas infecções diminuíram com a vacinação semanal.
3. A vacinação semanal pode melhorar substancialmente a receita da propriedade, ao diminuir os prejuízos provocados pela mastite estafilocócica. Adicionalmente, vacas vacinadas semanalmente apresentaram maior produção e leite de melhor qualidade do que as não vacinadas, com redução na contagem de células somáticas e aumento no teor de sólidos totais.
4. Apesar de diminuir significativamente o número de casos de mastites, a vacinação semanal não foi capaz de impedir totalmente a ocorrência da doença no rebanho, comprovando que apenas a vacinação não substitui as boas práticas de manejo.
5. A vacina aplicada semanalmente pode ajudar a controlar as mastites em rebanhos onde a prevalência do *Staphylococcus aureus* coagulase positiva for importante.
6. A aplicação subcutânea da vacina na região do linfonodo mamário é fácil de ser executada devido à posição dos animais no *free stall*. Isto, aliado à ausência de reações locais, recomendam-na como prática de rotina para administração desta vacina anti-mastite.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, L. A. *Aspectos Epidemiológicos da mastite bovina*. In: III Encontro de Pesquisadores em Mastites (3:1999, Botucatu FMVZ/UNESP). Anais... Botucatu. 1999. 185 p. 19-26p.
- BIBERSTEIN, E. L. Estafilococos. In. BIBERSTEIN, E.L. *Tratado de Microbiologia Veterinária*, Zaragoza Acríbia S. A, 1990. p.167-73.
- BLOOD, D.C.; RADOSTITIS, O.M. *Veterinary Medicine*. 7 ed. Londres: Baillière Tindall, 1991 p.501-59.
- BROCK, J. H.; STEEL, E.D. *The effect of intramuscular and intramammary vaccination of cows on antibody levels and resistance to intramammary infections by Staphylococcus aureus*. Res. Vet. Sci., 19:152. 1975.
- BRAMLEY, A. J. e DODD, F.H. *Reviews of the progress of dairy science: mastitis control – progress and prospects*. J. Dairy Res., 51:481-512. 1984
- COSTA, E.O.; BENITES, N.R.; MELVILLE, P.A. et al. *Estudo etiológico da mastite bovina*. Rev. Bras. Med. Vet. v.17, p.156-8. 1995a.
- COSTA, E.O.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; WHITE, C.R.; PARDO, R.B. *Índices de mastite bovina clínica e subclínica nos estados de São Paulo e Minas Gerais*. Rev. Bras. Med. Vet., v.17, p.215-7. 1995b.
- COSTA, E. O e E.T, WATANABE. *Tratamento de mastite*. In: III Encontro de Pesquisadores em Mastites (3:1999, Botucatu FMVZ/UNESP). Anais... Botucatu. 1999. 185 p. 87-100 p.

- COULON, J.B.; P.PRADEL; T. COCHARD AND B. POUTREL. *Effect of extreme walking conditions for dairy on milk yield, chemical composition, and somatic cell count.* J. Dairy Sci. 81: 994. 1998.
- DOHOO, I.R. and A. H. MEEK. *Somatic cell counts in bovine milk.* Can. Vet. J. 23:119. 1982.
- DONATELE, D.M.; FOLLY, M.M.; MOTTA, O.V.; TEIXEIRA, G.N. *Identificação e perfil de sensibilidade de Staphylococcus aureus coagulase positiva no gado de leite das regiões Norte/Noroeste de Estado do Rio de Janeiro.* In: III Encontro de Pesquisadores em Mastites (3:1999, Botucatu FMVZ/UNESP). *Resumo...* Botucatu. 1999. 185 p.156.
- ELVINGER, F.; P.J. HANSEN, and R.P. NATZKE. *Modulation of function of bovine polymorphonuclear leucocytes and lymphocytes by high temperature in vitro and in vivo.* Am. J. Vet. Res. 52:1692. 1991.
- FERNANDES, J.C.T. *Agentes etiológicos de mastite bovina no RS no período de 1972-1989.* Arq. Fac.Vet. UFRGS, Porto Alegre, 20 p151-163. 1992.
- FRIEDRICH, A; CHEMELLO, D.; RIBEIRO, S.P. ; SCROFERNEKER, M.L. *Imunidade a bactérias* In: SCROFERNEKER, M.L. *Imunologia Básica Aplicada.* 1998. p.327-335.
- GIRAUDO, J. A.; A. CALZOLARI; H. RAMPONE et al. *Field trials of vaccine against bovine mastitis.* J. Dairy Sci. 80:845-853. 1998.
- GRONH, Y.T. ; EICKER-SW; DUCROCQ-V, HERTIJA. *Effect of diseases on the culling of Holstein dairy cows in New York state.* J.Dairy Science, 81:4,966-978. 1998.

- GUIDRY, A.J.; M.J.PAAPE, and R.E. PEARSON. *Effects of estrus and estrogenous on circulating neutrophils na milk somatic cell concentrations, neutrophil phagocytosis and occurrence of clinical mastitis in cows.* Am.J.Vet.Res. 36:1555. 1975.
- HARMON, R.J. and C.W. HEALD. *Migration of polymorphonuclear leukocytes into the bovine mammary gland during experimentally induced Staphylococcus aureus mastitis.* Am.J.Vet. Res. 43:992. 1982.
- HARMON, R.J. and B.E. LANGLOIS. *Prevalence of minor pathogens and associated somatic cell counts.* In: Mtg. Natl. Mastitis Counc. Annais... p.24.1986.
- HARMON, R.J. *Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts.* J. Dairy Sci. 77:2103. 1994.
- HARMON, R.J. *Aspectos econômicos da mastite bovina.* In: i Simpósio Internacional Sobre a Qualidade do Leite. (1:1998,Curitiba). Anais...Curitiba. 1998.36-9 p.
- HILLERTON, J.E; SHEARS, M.F.H.; TEVERSON, R.M.; LANDRIDGE S.; BOOTH, J.M. *Effect of pre milking teat on clinical mastitis on dairy farms in England.* J. Dairy Res., v.60, p.31-41. 1993.
- KLOSS, W.E. *Natural populations of the genes Staphylococcus.* An.Ver. Microb. 34: 559-592. 1980.
- LAEVENS, H.; H.DELUYKER; Y.H. SCHUKKEN. *Influence of parity and stage of lactation on somatic cell count in bacteriologically negative dairy cows.* J. Dairy Sci. 80:3219. 1997.
- LANGONI, H.; PINTO, M.P.; DOMINGUES, P.F. et al. *Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica.* Arq. Bras. Vet. Zootec., v.43,p.507-15. 1991.

- LANGONI, H.; KUNG, D.C. ; DA SILVA, A.V.; DOMINGUES, P.F. *Etiologia e sensibilidade a antibacterianos na mastite bovina*. In: III Encontro de Pesquisadores em Mastites (3:1999, Botucatu FMVZ/UNESP). *Resumo...* Botucatu. 1999. 185 p.154 p.
- LEE, C.S.; F.B.P. WOODING, and P. KEMP. *Identification properties and diferential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows*. J. Dairy Res. 47:39. 1980
- LOGUE, D.N. *Mastitis organisms and high somatic counts*. Cattle Praticce, 5:2,p.67-77. 1997.
- MIHAIU,M. et al. *Studies on the correlation between milk somatic cell count and microbial flora*. Bulletinul Univ. Stiinte Agricole Napoca; seria Zootehnie si Med. Veterinara. 50:89-92. 1996.
- MILLER, R.H. and M.J. PAAPE. *Relationship beteween milk somatic cell count and milk yield*. Proc. Ann. Mtg. Natl. Mastitis Counc., p.60. 1985.
- MÜLLER, E. E. *Profilaxia e controle da mastite*. In: III Encontro de Pesquisadores em Mastites (3:1999, Botucatu FMVZ/UNESP). *Anais...* Botucatu. 1999. 185 p.57- 61 p.
- NADER FILHO, A. *Intoxicação alimentar estafilocócica*. In: III Encontro de Pesquisadores em Mastites (3:1999, Botucatu FMVZ/UNESP). *Anais...* Botucatu. 1999. 185 p.113- 118 p.
- NICKERSON, S.C. *O papel das vacinas no controle da mastite*. In: I Simpósio Internacional Sobre a Qualidade do Leite.(1:1998, Curitiba). *Anais...*Curitiba. 1998. 88 p 44-53 p.

- OWENS, W.E. *Comparison of success of antibiotic therapy during lactacion and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis.* Journal of Dairy Science, 80:2, p.313-317. 1997.
- PAAPE, M.J.; SCHULTZE W.D.; R.H. MILLER, and J.W. SMITH. *Thermal stress and circulating erythrocytes, leukocytes, and milk somatic cells.* J. Dairy Sci. 56:84. 1973.
- PHILPOT, W.N e PANKEY, J.W. *Review of microorganisms that reportedly cause mastitis.* In: Dairy Res. Report, Hill Farm Res. Station, Homer, L.A, 118-120. 1975.
- PHILPOT, W.N. *Importância da contagem de células somáticas e outros fatores que afetam a qualidade do leite..* In: I Simpósio Internacional Sobre a Qualidade do Leite.(1:1998, Curitiba). *Anais...Curitiba.* 1998. 88 p 28-35 p.
- RENEAU, J.K. *Using DHI somatic cell counts.* Proceedings. Mtg. Natl. Mastitis Counc. *Annais...* p 73. 1985.
- RENEAU, J.K. *Efective use of dairy herd improvement somatic cell counts in mastitis control.* J. Dairy Sci. 69:1708. 1986.
- SANDHOLM,M., KORHONEM, H. *Antibacterial defence mechanisms of the udder.* In: SANDHOLM,M., HONKANKEN-BUZALSKI, T. KAARTINEN, L., PYÖRÄLÄ, S. *The bovine udder in mastitis.* Helsinki: University of Helsinki Faculty of Veterinary Medicine, 1995.
- SANDHOLM,M., KAARTINEN, L, PYÖRÄLÄ, S. *Bovine mastitis – why does antibiotic therapy not always work? An overview.* J. Vet. Pharmacol. Ther., v. 13, 0.248-60,1990.

- SCHULTZ, L. H. *Somatic cells in milk – Physiological aspects and relationship to amount and composition of milk*. J. Food Protect. 40; 125. 1977.
- SEDDEK, S.R. *Bovine Mastitis (age,causes and control) en assint governovate*. Assint Veterinary Medical Journal, 36 71,149-162. 1997.
- SHALM, O.W. *Bovine Mastitis, U.S.A*, Philadelphia: 1971 Lea & Febiger
- SHANKS, R.D.; FREEMAN, A D.; DICKINSON, F.N.. *Postpartum distribution of costs and disords of helth*. J. Dairy Sci, v.64, p.683-8. 1981.
- SILVA, N. *Diagnóstico de mamite em animais de importância econômica*. In: III Encontro de Pesquisadores em Mastites (3:1999, Botucatu FMVZ/UNESP). *Anais...* Botucatu. 1999. 185 p.51 - 55 p.
- SMITH, K.L.; D.A. TODHUNTER, and P.S SCHOENBERGER. *Environmental mastitis cause, prevalence, prevention*. J. Dairy Sci. 68:1531. 1998.
- SORDILLO, L. M. *Imunobiology of the mammary gland*. J. of Dairy Science vol 80, 8, p 1851-1865. 1997.
- SWAMI, M.C., KRISHNA MURTHY. *Prevalence of Staphylococcus species in Califórnia Mastitis Test positive cows*. Indian Veterinary Journal, 75:2,101-103p. 1998.
- THIEL, C.C.; COUSINS,C.L.; WEST GARTH, D.R.; NEAVE,F.K. *The influence of some physical characteristics of the milking machine on the rate of new mastitis infections*. Journal of Dairy Research, Cambridge., v.40,p117-129.

- THIERS, F.O.; COSTA, E.O.; GARINO JR,F.; BENITES, N.R. *Conteúdo Celular do leite de bovinos em diferentes fases de lactação*. In: III Encontro de Pesquisadores em Mastites (3:1999, Botucatu FMVZ/UNESP). *Resumo...* Botucatu. 1999a. 185 p 145.
- THIERS, F.O.; COSTA ,E.O.; WATANABE, E.T., et al. *Avaliação do nível de células somáticas de animais de 10 propriedades leiteiras correlacionando-se com os exames de CMT e microbiológicos*. In: III Encontro de Pesquisadores em Mastites (3:1999, Botucatu FMVZ/UNESP). *Resumo...* Botucatu. 1999b. 185 p 139.
- TIZARD, I. R. *Imunologia veterinária*. São Paulo: Roca, 1998. 545p.
- VIANNI, M,C, 1992. *Freqüência de isolamento de Staphylococcus coagulase-positiva e coagulase-negativa na mastite subclínica em bovinos e sua influência na produção láctea*. Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de J. Itaguaí, 15(2): 187-192. 1992.
- WATTS, J.L. *Impact of new Staphylococcus species descripton on mastitis research*. Kiel Milchwirst . Forschungsber. 37: 549-553. 1986.
- WATTS, J.L. *Etiological agents of bovine mastitis*. Vet. Microb.,16:41-66. 1988.
- WATSON, D.L.; M.L. McCOLL, and H. I. DAVIES. *Field trial of a staphylococcal mastitis vaccine in dairy herds: clinical, subclinical and microbiological assessments*. Aust. Vet. J. 74:448-450. 1996.
- WEGNER, T.N.; J.D. SCHUC; F.E. NELSON, and G.H. STOTT. *Effect of stress on blood leucocyte and milk somatic cell counts in dairy cows*. J. Dairy Sci. 59:949. 1976.
- YOSHIDA,K.; Y. ICHIMAN, and S. NARIKAWA. *Staphylococcal capsular vaccine for preventing mastitis in two herds in Georgia*. J. Dairy Sci. 67:620-627. 1984.

ZECCONI, A. *Staphylococcus aureus* intramammary infections as a model to investigate the relationship between immunity and bacterium. *Microbiology Journal* 7:1,51-53. 1998.