



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ – UESC**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL – PPGCA**

**ELAÍNE CRISTINA FARIAS**

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DOS PRINCIPAIS AGENTES DA MASTITE  
SUBCLÍNICA EM VACAS E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS NA  
MICRORREGIÃO DE ILHÉUS – ITABUNA, BAHIA**

**ILHÉUS – BAHIA**  
**2013**

**ELAÍNE CRISTINA FARIAS**

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DOS PRINCIPAIS AGENTES DA MASTITE  
SUBCLÍNICA EM VACAS E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS NA  
MICRORREGIÃO DE ILHÉUS – ITABUNA, BAHIA**

Dissertação apresentada a Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Clínica e Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. Amauri Arias Wenceslau

**ILHÉUS – BAHIA**

**2013**

F224

Farias, Elaine Cristina.

Diagnóstico molecular dos principais agentes da mastite subclínica em vacas e fatores de risco associados na microrregião de Ilhéus-Itabuna, Bahia / Elaine Cristina Farias. – Ilhéus, BA: UESC, 2013. 60f.: il.

Orientador: Amauri Arias Wenceslau.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – PPGCA.

Inclui referências e apêndices.

1. Mastite. 2. Glândula mamária de animal.  
3. Reação em cadeia de polimerase. I. Título.

CDD 636.2089819

**ELAÍNE CRISTINA FARIAS**

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DOS PRINCIPAIS AGENTES DA MASTITE  
SUBCLÍNICA EM VACAS E FATORES ASSOCIADOS NA MICRORREGIÃO DE  
ILHÉUS – ITABUNA, BAHIA**

Dissertação apresentada a Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Ilhéus, 30 de Outubro de 2013.

---

Amauri Arias Wenceslau - DSc  
DCAA/UESC  
(Orientador)

---

Paulo Luiz Souza Carneiro - DSc  
DCB/UESB

---

Bianca Mendes Maciel – DSc  
DCB/UESC

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Senhor, Meu Deus, pelas bênçãos destinadas à minha vida me enchendo de paz, luz e sabedoria para ultrapassar os obstáculos em meu caminho. “O Senhor é o meu pastor, nada me faltará” (Salmo 23:1).

A minha amada mãe Valda Chagas Farias que sempre cuidou e cuida de mim, batalhando para me proporcionar a melhor educação possível, me ensinando a caminhar com meus próprios pés e, por todos os dias e orações dedicados ao meu bem.

A todos de minha família pela torcida a favor e orações pela minha vitória.

Aos meus fiéis e dedicados cães (Lua, Chiquinho e Sol) e gatos (Tica, Tico, Chaninha, Nina, Glute, Preto, Flor, Canelinha, Onça, Branca, Tigrão, Fofucha e Gazinha....quanto gato...kkk) agradeço por secarem minhas lágrimas com suas carinhas lindas como se dissessem: Eu estou aqui, ao seu lado!

Ao meu inteligente e admirado orientador professor Amauri Arias Wenceslau, que sempre aturou minhas chatices com tranquilidade e palavras de incentivo. Agradeço, principalmente pelos puxões de orelha, pois isso se traduz em cuidado, confiança e acreditar que eu posso mais.

A delicada professora Bianca Mendes Maciel, por suas doces palavras de carinho ao dirigir-se a mim. Aos ensinamentos e conselhos, me transmitindo força para seguir em frente. Sem esquecer de mencionar o cuidado comigo numa simples frase tão falada: “Conserta a postura, Elaine!”.

E, o que seria de mim, sem meus amigos! Muito obrigada a cada um de vocês, por TUDO!!! Eu não sobreviveria sem o companheirismo de Amanda Teixeira e Fernanda Tavares nem, tão pouco, sem as conversas instrutivas com Daniele Rocha. Ao Fábio Carvalho agradeço por tantos ensinamentos na vida acadêmica. E, a todos os outros amigos agradeço pela torcida e risadas em meio às conturbações.

Não posso deixar de agradecer aos vigilantes do Hospital Veterinário que me vigiam também, tomam conta de mim por longas horas de estudo e pesquisa nos laboratórios. Valeu meninos!!!

Aos meus amigos de todas as horas, incluindo os já citados, vou agradecer pelo resto de minha vida. E, olha que pretendo que se estenda bastante, assim vou poder abusar um tantinho mais....kkk.

A todos os professores da Medicina Veterinária por aumentarem a cada dia minha capacidade de raciocínio correto e de ser responsavelmente profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, especialmente ao Eduardo Góes Viana por toda atenção concedida.

E, por fim, as tranquilas e produtoras vaquinhas que abrilhantaram este trabalho, proporcionando todos esses resultados aqui descritos e discutidos. Sou imensamente grata a todas.

O meu muito obrigada!

*"A grandeza de uma nação pode ser julgada  
pelo modo que seus animais são tratados."  
(Mahatma Gandhi)*

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DOS PRINCIPAIS AGENTES DA MASTITE  
SUBCLÍNICA EM VACAS E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS NA  
MICRORREGIÃO DE ILHÉUS – ITABUNA, BAHIA**

**RESUMO**

Mastite é a inflamação da glândula mamária que pode afetar um ou mais tetos do úbere da vaca com característica contagiosa ou ambiental, causada por mais de 150 microrganismos diferentes. Este estudo objetivou caracterizar os principais patógenos causadores de mastite subclínica bovina pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e estudar os fatores de risco associados em rebanhos leiteiros da microrregião de Ilhéus-Itabuna, Bahia. Selecionou-se propriedades de criação de gado leiteiro totalizando 253 vacas positivas ao teste CMT (*California Mastitis Test*) com amostras de 10 mL de leite coletadas dos tetos positivos (*pool*). Utilizou-se o protocolo Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico para a extração de DNA. Das cinco espécies de patógenos estudados, o *Staphylococcus aureus* foi a espécie mais comum, com 58/96 (60,4%), seguida da *Escherichia coli* com 40/96 (41,6%), *Streptococcus agalactiae* com 34/96 (35,4%) e o *Streptococcus dysgalactiae* com 8/96 (8,3%). O *Staphylococcus simulans* não foi encontrado nesta pesquisa. Na análise estatística multivariada, o tipo de ordenha e a fase da lactação (terço final) foram os reais fatores de risco identificados neste estudo. Assim, é possível concluir que a mastite subclínica bovina é uma enfermidade bastante presente nos rebanhos leiteiros da microrregião de Ilhéus-Itabuna e que essa alta frequência (64,2%) está intimamente ligada aos fatores de risco associados gerando o aumento da porcentagem de amostras com alta contagem de células somáticas.

**Palavras-chave:** Glândula mamária. Infecção. Leite. Mastite. PCR.



**MOLECULAR DIAGNOSIS OF THE MAIN AGENTS OF SUBCLINICAL MASTITIS  
IN COWS AND ASSOCIATED RISK FACTORS IN THE MICRO-REGION OF  
ILHÉUS - ITABUNA, BAHIA**

**ABSTRACT**

Mastitis is inflammation of the mammary gland that can affect one or more ceilings of the udder of the cow with a contagious or environmental characteristic, caused by more than 150 different microorganisms. This study aimed to characterize the main pathogens that cause bovine subclinical mastitis by the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique and to study the associated risk factors in dairy herds in the micro region of Ilhéus-Itabuna, Bahia. Dairy farming properties were selected, totaling 253 cows positive to the CMT test (*California Mastitis Test*) with 10 mL samples of milk collected from the positive teats (*pool*). The Phenol / Chloroform / Isoamyl Alcohol protocol was used for DNA extraction. Of the five species of pathogens studied, *Staphylococcus aureus* was the most common species, with 58/96 (60.4%), followed by *Escherichia coli* with 40/96 (41.6%), *Streptococcus agalactiae* with 34/96 (35.4%) and *Streptococcus dysgalactiae* with 8/96 (8.3%). *Staphylococcus simulans* was not found in this research. In multivariate statistical analysis, the type of milking and the lactation phase (final third) were the real risk factors identified in this study. Thus, it is possible to conclude that bovine subclinical mastitis is a disease quite present in dairy herds in the Ilhéus-Itabuna micro-region and that this high frequency (64.2%) is closely linked to the associated risk factors, generating an increase in the percentage of samples with high somatic cell count.

**Keywords:** Infection. Mamite. Mammary gland. Milk. PCR.

## LISTA DE FIGURAS

|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – | Esquema do processo de contaminação bacteriana e instalação da infecção nos alvéolos da glândula mamária bovina (WATTIAUX, 2013, p.90).....                                                                                                                                                | 18 |
| Figura 2 – | Isolamento em placa de <i>Staphylococcus aureus</i> em meio Sal Manitol (Acervo do autor).....                                                                                                                                                                                             | 21 |
| Figura 3 – | Isolamento em placa de <i>Staphylococcus simulans</i> em meio Baird-Parker (Acervo do autor).....                                                                                                                                                                                          | 21 |
| Figura 4 – | Isolamento em placa de <i>Escherichia coli</i> em meio EMB - Eosin Methylene Blue Agar (Acervo do autor).....                                                                                                                                                                              | 23 |
| Figura 5 – | Mapa da microrregião de Ilhéus-Itabuna detalhando as cidades onde se localizam as propriedades visitadas no estudo.....                                                                                                                                                                    | 32 |
| Figura 6 – | Resolução em gel de agarose 1,5% apresentando amplificações da espécie <i>Staphylococcus aureus</i> . Coluna 1 marcador de peso molecular 1 Kb Plus; coluna 2 controle positivo; colunas 3 a 7 amostras positivas para a espécie <i>S. aureus</i> e coluna 8 controle negativo.....        | 40 |
| Figura 7 – | Resolução em gel de agarose 1,5% apresentando amplificações da espécie <i>Staphylococcus simulans</i> . Coluna 1 marcador de peso molecular 1 Kb Plus; coluna 2 controle positivo; colunas 3 a 7 amostras negativas para a espécie <i>S. simulans</i> e coluna 8 controle negativo.....    | 40 |
| Figura 8 – | Resolução em gel de agarose 1,5% apresentando amplificações da espécie <i>Escherichia coli</i> . Coluna 1 marcador de peso molecular 1 Kb Plus; coluna 2 controle positivo; colunas 3 a 7 amostras positivas para a espécie <i>E. coli</i> e coluna 8 controle negativo.....               | 41 |
| Figura 9 – | Resolução em gel de agarose 1,5% apresentando amplificações da espécie <i>Streptococcus agalactiae</i> . Coluna 1 marcador de peso molecular 1 Kb Plus; coluna 2 controle positivo; coluna 3 controle negativo; colunas 4 a 9 amostras positivas para a espécie <i>S. agalactiae</i> ..... | 41 |

Figura 10 – Resolução em gel de agarose 1,5% apresentando ampliações da espécie *Streptococcus dysgalactiae*. Coluna 1 marcador de peso molecular 1 Kb Plus; coluna 2 controle positivo; colunas 3 e 7 amostras negativas para *S. dysgalactiae*, colunas 4 a 6 e 8 amostras positivas para *S. dysgalactiae* e coluna 9 controle negativo.....

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – Mudanças na composição do leite associadas com elevada contagem de células somáticas (modificado de MÜLLER <i>et al.</i> , 2002, p.210).....                                                                    | 19 |
| Tabela 2 – Correlação entre dados de CCS, quarto mamário infectado, perda de produção e a prevalência de casos de mastite subclínica no rebanho leiteiro (modificado de WATTIAUX, 2013, p.94).....                         | 28 |
| Tabela 3 – Parâmetros microbiológicos, físicos, químicos, de resíduos químicos e de contagem de células somáticas (CCS) avaliados pelo controle de qualidade do leite cru de vacas (modificado de BRASIL, 2011, p.14)..... | 30 |
| Tabela 4 – Lista de <i>primers</i> utilizados no estudo (modificado de SILVA, 2008, p.18; SHOME <i>et al.</i> , 2011, p.1353; PEREIRA <i>et al.</i> , 2010, p.1396).....                                                   | 36 |
| Tabela 5 – Dados INCQS e ATCC dos controles positivos cedidos pela FIOCRUZ/RJ (Modificado de FIOCRUZ/RJ, 2013; SHOME <i>et al.</i> , 2011, p. 1351).....                                                                   | 36 |
| Tabela 6 – Escores de CMT das amostras de leite coletadas de acordo com a espessura de gel formado.....                                                                                                                    | 39 |
| Tabela 7 – Análise univariada dos fatores de risco associados à mastite subclínica em rebanhos bovinos leiteiros da microrregião de Ilhéus-Itabuna.....                                                                    | 43 |
| Tabela 8 – Análise multivariada dos fatores de risco associados à mastite subclínica em rebanhos bovinos leiteiros da microrregião de Ilhéus-Itabuna.....                                                                  | 43 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                   |                                                      |
|-------------------|------------------------------------------------------|
| %                 | Por cento                                            |
| ACTB              | $\beta$ -actina                                      |
| ASQ               | Analises semi-quantitativas                          |
| ATCC              | American Type Culture Collection                     |
| CS                | Células Somáticas                                    |
| CCS               | Contagem de Células Somáticas                        |
| CMT               | <i>Califórnia mastites test</i>                      |
| CO                | Região Centro-Oeste                                  |
| DNA               | Ácido desoxirribinucleico                            |
| dNTP's            | Desoxirribonucleotídeos trifosfatados                |
| EDTA              | Ácido etilenodiamino tetra-acético                   |
| EMB               | Eosin Methylene Blue Agar                            |
| EUA               | Estados Unidos da América                            |
| <i>g</i>          | Força da gravidade                                   |
| g                 | Gramma                                               |
| IBGE              | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística      |
| IgA               | Alfaglobulina                                        |
| IgD               | Deltaglobulina                                       |
| IgE               | Épsilonglobulina                                     |
| IgG               | Gamaglobulina                                        |
| IgM               | Muglobulina                                          |
| INCQS             | Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde |
| kg                | Quilograma                                           |
| Km <sup>2</sup>   | Quilômetro quadrado                                  |
| M                 | Molar                                                |
| Mg <sup>++</sup>  | Íons Magnésio                                        |
| MgCl <sub>2</sub> | Cloreto de magnésio                                  |
| mL                | Mililitro                                            |
| mM                | Milimolar                                            |
| N                 | Região Norte                                         |

|            |                                               |
|------------|-----------------------------------------------|
| NE         | Região Nordeste                               |
| nm         | Nanômetro                                     |
| °C         | Graus Celsius                                 |
| OR         | Odds Ratio                                    |
| PB         | Pares de base                                 |
| PBS        | Solução tampão fosfato- salino                |
| PCR        | Reação em Cadeia da Polimerase                |
| pH         | Potencial de hidrogênio                       |
| pmol       | Picomol                                       |
| REP-PCR    | <i>Repetitive Extragenic Palindromic</i>      |
| RNA        | Ácido ribinucleico                            |
| S          | Região Sul                                    |
| SDS        | Dodecil sulfato de sódio                      |
| SE         | Região Sudeste                                |
| SSI        | Surgical Site Infection                       |
| <i>Taq</i> | <i>Thermus Aquaticus</i>                      |
| Tris-HCl   | Cloridrato de tris-(hidroximetil)-aminometano |
| U          | Unidade                                       |
| UFC        | Unidade formadora de colônia                  |
| US\$       | United States <i>dólar</i>                    |
| µg         | Micrograma                                    |
| µL         | Microlitro                                    |
| µM         | Micromolar                                    |

## SUMÁRIO

|            |                                                                                                              |           |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>   | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                       | <b>15</b> |
| <b>2</b>   | <b>OBJETIVOS.....</b>                                                                                        | <b>17</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Objetivo geral.....</b>                                                                                   | <b>17</b> |
| <b>2.2</b> | <b>Objetivos específicos.....</b>                                                                            | <b>17</b> |
| <b>3</b>   | <b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                                                            | <b>17</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Caracterização e agentes causadores da mastite.....</b>                                                   | <b>17</b> |
| 3.1.1      | A mastite.....                                                                                               | 17        |
| 3.1.2      | Caracterização das espécies do gênero <i>Staphylococcus</i> .....                                            | 20        |
| 3.1.3      | Caracterização das espécies do gênero <i>Streptococcus</i> .....                                             | 22        |
| 3.1.4      | Caracterização da espécie <i>Escherichia coli</i> .....                                                      | 23        |
| <b>3.2</b> | <b>Processo inflamatório da glândula mamária e resposta imune.....</b>                                       | <b>24</b> |
| <b>3.3</b> | <b>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no diagnóstico etiológico da mastite.....</b>                        | <b>25</b> |
| <b>3.4</b> | <b>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a qualidade do leite.....</b>                                      | <b>26</b> |
| <b>3.5</b> | <b>Contagem de células somáticas e a qualidade do leite.....</b>                                             | <b>27</b> |
| <b>3.6</b> | <b>Perdas econômicas.....</b>                                                                                | <b>28</b> |
| <b>3.7</b> | <b>Fatores de risco associados à mastite subclínica.....</b>                                                 | <b>29</b> |
| <b>4</b>   | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                               | <b>31</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Localização e descrição das propriedades.....</b>                                                         | <b>31</b> |
| <b>4.2</b> | <b>Coleta das amostras de leite.....</b>                                                                     | <b>33</b> |
| <b>4.3</b> | <b>Preparo das amostras de leite para contagem de células somáticas.....</b>                                 | <b>33</b> |
| <b>4.4</b> | <b>Contagem de células somáticas (CCS).....</b>                                                              | <b>33</b> |
| <b>4.5</b> | <b>Preparo das amostras de leite para retirada de gordura e sujidades do leite: Pré-extração de DNA.....</b> | <b>34</b> |
| <b>4.6</b> | <b>Extração de DNA das amostras de leite.....</b>                                                            | <b>34</b> |
| <b>4.7</b> | <b>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....</b>                                                             | <b>35</b> |
| <b>4.8</b> | <b>Caracterização do gene constitutivo <math>\beta</math>-actina (ACTB).....</b>                             | <b>37</b> |
| <b>4.9</b> | <b>Fatores de risco associados à mastite subclínica.....</b>                                                 | <b>37</b> |

|      |                           |    |
|------|---------------------------|----|
| 4.10 | Análise estatística.....  | 38 |
| 5    | RESULTADOS.....           | 38 |
| 6    | DISCUSSÃO.....            | 44 |
| 7    | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 47 |
|      | REFERÊNCIAS.....          | 48 |
|      | APÊNDICES.....            | 56 |



## 1 INTRODUÇÃO

A pecuária leiteira no Brasil, atualmente, assumiu uma margem de crescimento anual de 5%, sendo que em 2010 produziu 30,7 bilhões de litros de leite/ano. O Nordeste é uma das regiões que mais se destacam, com uma contribuição de 13,0% dessa produção, totalizando 4,0 bilhões de litros de leite/ano. O estado da Bahia apresentou no ano de 2008 uma taxa de crescimento de 42%, destacando-se como sétimo maior produtor leiteiro do país, produzindo 952 milhões de litros de leite. Dentre as microrregiões, as maiores produtoras atingem cerca de 1,4 bilhão de litros anuais com um rebanho de, aproximadamente, 900 mil cabeças e, produção média/ano/vaca de 1.613 litros de leite. Entretanto, esses dados poderiam ser melhores, se não fosse a presença de enfermidades que levam a diminuição da produção (ZOCCAL *et al.*, 2012).

A mastite bovina é uma enfermidade de característica contagiosa ou ambiental causada por mais de 150 microrganismos diferentes. Dentro dessa grande diversidade bacteriana, apenas determinadas espécies dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e Coliformes são considerados agentes importantes, tanto epidemiologicamente, quanto economicamente. O *Staphylococcus aureus* é a espécie que apresenta maior significância em vários países, por tratar-se de um patógeno capaz de causar uma infecção intramamária contagiosa levando a contaminação em produtos lácteos (KUANG *et al.*, 2009; SHOME *et al.*, 2011).

Essa enfermidade é uma das mais importantes que afetam os rebanhos leiteiros, podendo apresentar-se sob as formas clínica e subclínica. A forma clínica ou infecciosa é transmitida de animal para animal e, caracteriza-se por apresentar sinais claros e evidentes, como: edemaciação e endurecimento do úbere, aumento da temperatura local, dor à palpação e aparecimento de grumos ou mudança na coloração nos jatos de leite (BRADLEY, 2002). Diferentemente, a forma subclínica não apresenta modificações aparentes no animal e sim, apenas, na composição do leite, tais como: elevada contagem de células somáticas (CCS) e de proteínas séricas, aumento de pH, queda nos teores de lactose, gordura, caseína e cálcio, com consequente diminuição de sua vida útil (CHANG *et al.*, 2004; DIAS, 2007).

A forma mais prevalente nos rebanhos leiteiros é a mastite subclínica (em média 15 casos clínicos para 40 subclínicos), sendo responsável por, aproximadamente, 70% das perdas gerando redução da secreção de leite em até

45% e, perdas de 5 a 25% com o descarte de leite de vacas em tratamento, gastos com medicação, rejeição de leite pelas indústrias de beneficiamento, perda de tetos das vacas e até mesmo, perda total do animal em caso de morte, causando grandes prejuízos econômicos (PHILPOT; NICKERSON, 2002).

Um dos métodos mais indicados para detecção a campo de casos de mastite subclínica num rebanho leiteiro é o CMT (*California Mastitis Test*) que é um teste basicamente simples, rápido e subjetivo de contagem de células somáticas (CCS) em amostras obtidas dos primeiros jatos de leite dos quartos mamários das vacas. O reagente do exame é um detergente com indicador de pH que, quando misturado ao leite, em partes iguais, rompe a membrana dos leucócitos (células somáticas de defesa) presentes no meio e, com isso, o material genético (DNA) dessa célula se espalha. A reação positiva forma uma espécie de gel que varia de concentração de acordo com a quantidade de leucócitos na amostra. E é negativa quando não há formação de gel (HOE, 2013).

A subjetividade do CMT gera diagnósticos corretos de mastite subclínica, mas não é adequada para identificar o microrganismo causador da doença. Para tal, a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) apresenta elevada sensibilidade, especificidade e rapidez para um diagnóstico preciso. Estas importantes características da PCR estão, intimamente, ligadas a fatores, como: o conjunto de *primers* desenhados, especificamente, para a amplificação do DNA alvo em estudo; a quantidade de cópias do DNA alvo a ser amplificado; a qualidade do método de extração de DNA; o tipo de material avaliado; e, a escolha do protocolo de PCR (SALAM *et al.*, 2010).

Vários são os estudos e pesquisas realizados com intuito de implantar medidas de prevenção e controle da mastite bovina. Entretanto, a doença ainda continua sendo um dos maiores problemas enfrentados pelos produtores, pelas indústrias processadoras e, também, pelos consumidores que sofrem com os prejuízos (FREITAS *et al.*, 2005). Isso torna o diagnóstico etiológico da mastite bovina, uma ferramenta fundamental para estabelecer as estratégias de controle, prevenção e monitoramento de rebanhos, que devem ser tomadas com a maior rapidez possível para obter sua maior eficiência (SILVA, 2008).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Identificar os principais patógenos causadores de mastite subclínica bovina através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e estudar os fatores de risco associados em rebanhos leiteiros da microrregião de Ilhéus-Itabuna, Bahia.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Identificar os animais positivos para mastite subclínica bovina utilizando o teste CMT;
- Identificar os principais agentes causadores da mastite bovina na bacia leiteira da microrregião de Ilhéus-Itabuna, Bahia, através da técnica de PCR;
- Realizar Contagem de Células Somáticas para detecção da intensidade da inflamação causada pela mastite subclínica;
- Estudar os fatores de risco associados à mastite subclínica bovina.

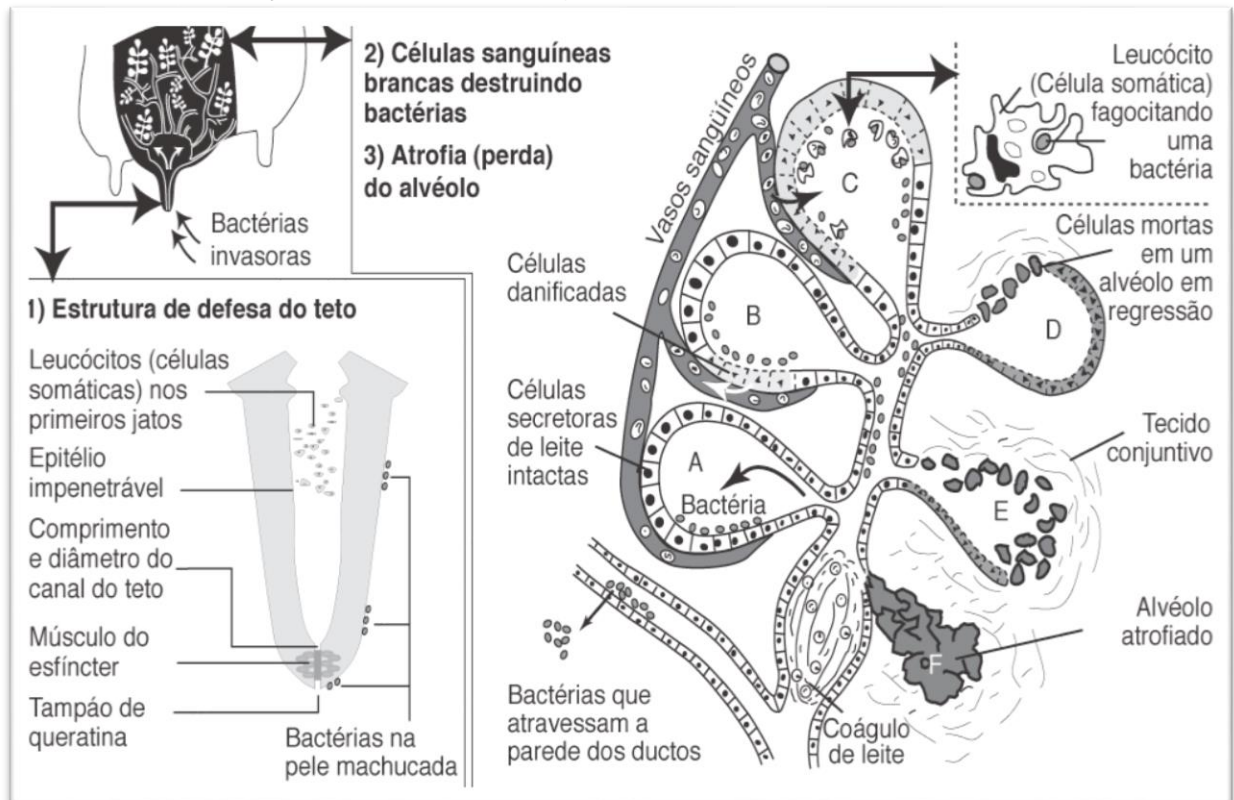
## **3 REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1 Caracterização e agentes causadores da mastite**

#### **3.1.1 A mastite**

Mastite é a doença infecciosa mais comum que afeta as vacas leiteiras, causada por diferentes tipos de injúrias, incluindo agentes infecciosos e suas toxinas, traumas físicos ou químicos. Constitui-se um processo inflamatório da glândula mamária (Figura 1), com evolução aguda a crônica, caracterizada pela redução de secreção de leite e mudança de permeabilidade da membrana dos ácinos (unidades secretoras da glândula mamária), o que ocasiona mudança na sua composição (SILVA; SILVA, 2005).

Figura 1 – Esquema do processo de contaminação bacteriana e instalação da infecção nos alvéolos da glândula mamária bovina.



Fonte: WATTIAUX, 2013, p.90.

A mastite ocorre devido a vários fatores, como os climáticos (temperatura e pluviosidade), sujidade de úbere e esfíncter de teto. Épocas de chuvas geram crescimento da incidência de mastite, pois ocorre a produção de lama neste período, com consequente aumento de matéria orgânica, favorecendo a possibilidade de contaminação e infecção da glândula mamária. O calor e a umidade também contribuem para a ocorrência de mastite ambiental, que é causada por bactérias presentes no ambiente em que vive o animal, particularmente no ambiente da pré e pós-ordenha, pela presença de lama, terra e dejetos (DOMINGUES *et al.*, 2008).

Outros fatores também são determinantes na susceptibilidade à mastite como o estágio da lactação, hereditariedade, idade do animal (depois da terceira lactação maior é a predisposição), espécie, infectividade e patogenicidade do agente etiológico, ordenha e manejo (merecem atenção especial em função do poder de difusão da doença que têm perante o rebanho) e a nutrição (PEREIRA *et al.*, 2013).

Existem dois padrões distintos na epidemiologia da mastite. O primeiro é contagioso (mastite infecciosa) e é transmitido pelo contato de um animal infectado para um animal susceptível, tendo como principais agentes infecciosos:

*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Mycoplasma bovis* e *Corynebacterium bovis*. O segundo padrão é através do ambiente, onde microrganismos oportunistas e fatores ambientais colocam em risco os animais. Os principais patógenos envolvidos neste padrão são *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus simulans* (coagulase negativo), fungos e leveduras (ELVINGER; NATZKE, 1992; LEIGH, 1999).

A mastite bovina pode apresentar-se na forma clínica, com os sinais da inflamação, como edema, hipertemia, dor e endurecimento da glândula mamária e, na forma subclínica, a qual é mais importante, pois permanece silenciosa no rebanho sem alterações macroscópicas no úbere, onde os animais portadores podem funcionar como fonte de infecção para o rebanho (RADOSTITS *et al.*, 2002).

A mastite subclínica caracteriza-se por alterações na composição do leite ocasionando aumento na contagem de células somáticas (CCS), nos teores de cloro, sódio e proteínas séricas, o pH passa do ligeiramente ácido (6,5 a 6,7) ao alcalino (7,0 a 7,5), presença de coágulos, descoloração, diminuição nos teores de caseína, lactose, gordura e cálcio do leite (BLOOD *et al.*, 1991; FONSECA; SANTOS, 2007). Estas alterações podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Mudanças na composição do leite associadas com elevada contagem de células somáticas.

| <b>Componentes do leite</b> | <b>CCS x 10<sup>3</sup> células/ mL</b> |                |                    |                  | <b>Alteração e Motivo</b>             |
|-----------------------------|-----------------------------------------|----------------|--------------------|------------------|---------------------------------------|
|                             | <b>&lt; 100</b>                         | <b>&lt;250</b> | <b>500 a 1.000</b> | <b>&gt;1.000</b> |                                       |
| <b>Gordura</b>              | 3,74                                    | 3,69           | 3,51               | 3,13             | Redução (g/100 mL)                    |
| <b>Lactose</b>              | 4,90                                    | 4,74           | 4,60               | 4,21             |                                       |
| <b>Caseína Total</b>        | 2,81                                    | 2,79           | 2,65               | 2,25             |                                       |
| <b>Cloro</b>                | 0,091                                   | 0,096          | 0,121              | 0,147            | Aumento. Passagem a partir do sangue. |
| <b>Sódio</b>                | 0,057                                   | 0,062          | 0,091              | 0,105            |                                       |
| <b>Potássio</b>             | 0,173                                   | 0,180          | 0,135              | 0,157            |                                       |
| <b>pH</b>                   | 6,6                                     | 6,6            | 6,8                | 6,9              |                                       |
| <b>Proteínas Séricas</b>    | 0,81                                    | 0,82           | 1,10               | 1,31             |                                       |
| <b>Soroalbuminas</b>        | 0,02                                    | 0,15           | 0,23               | 0,35             |                                       |
| <b>Imunoglobulinas</b>      | 0,12                                    | 0,14           | 0,26               | 0,51             |                                       |

Fonte: Modificado de MÜLLER *et al.*, 2002, p. 210.

### 3.1.2 Caracterização das espécies do Gênero *Staphylococcus*

São microrganismos procariontes, pertencentes à família Micrococcaceae, Gram-positivos em forma de cocos, catalase positiva, imóveis e anaeróbios facultativos. As espécies desse gênero são mesófilos, com temperatura ótima de crescimento e multiplicação à 35°C, podendo variar, em alguns casos, entre 10 e 45°C. A oscilação do pH de crescimento está entre 4,2 a 9,3 (CRUVINEL *et al.*, 2011; KLOSS; MUSSELWHITE, 1975).

Entre suas características, possui uma parede celular rica em peptidoglicanos e a capacidade de produzir uma grande variedade de toxinas extracelulares, enzimas e fatores de virulência, todos relacionados com sua patogenicidade e mecanismos de resistência a antimicrobianos (CARDOSO *et al.*, 2000; CRUVINEL *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2010).

Os *Staphylococcus* spp. são classificados em 35 espécies e 17 sub-espécies, onde as coagulase positivas como, por exemplo, o *Staphylococcus aureus*, possuem alta patogenicidade e, portanto, maior importância clínica (FONSECA; SANTOS, 2007).

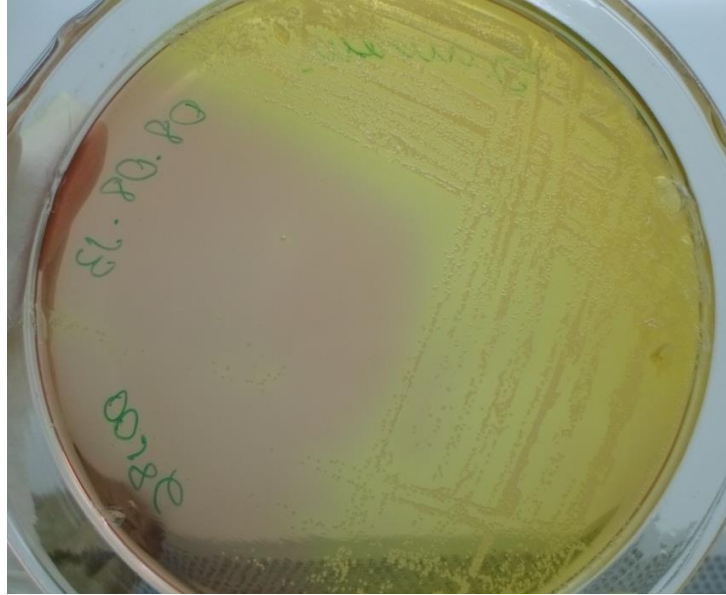
BENITES *et al.* (2001) pesquisaram mastites espontâneas em 35 vacas, onde cada teto destas foi considerado como amostra individual, totalizando 140 glândulas mamárias e, obtiveram um resultado, predominantemente, de microrganismos do gênero *Staphylococcus* (60,71%). Dessa porcentagem total, 54,29% foram positivos para *Staphylococcus* coagulase negativos e 6,43% para *Staphylococcus* coagulase positivos.

O *Staphylococcus aureus* é a principal bactéria do gênero, sendo Gram-positiva, coagulase positiva, facilmente encontrada na microbiota do corpo dos animais (Figura 2). Suas infecções podem variar entre superficiais ou disseminadas com elevada gravidade. Particularmente, pode ser aeróbio ou anaeróbio facultativo com morfologia esférica, apresentando-se ao microscópio, agrupados em forma de cachos de uvas (CRUVINEL *et al.*, 2011).

O *Staphylococcus simulans* classifica-se como uma bactéria coagulase negativa (Figura 3) encontrada normalmente na flora natural dos rebanhos leiteiros. Está associado à mastite subclínica por se tratar de um patógeno ambiental, sendo adquirido através do contato entre os animais e o ambiente em que vivem (KLINE, 2010). São de baixa patogenicidade, mas capazes de aumentar a contagem de

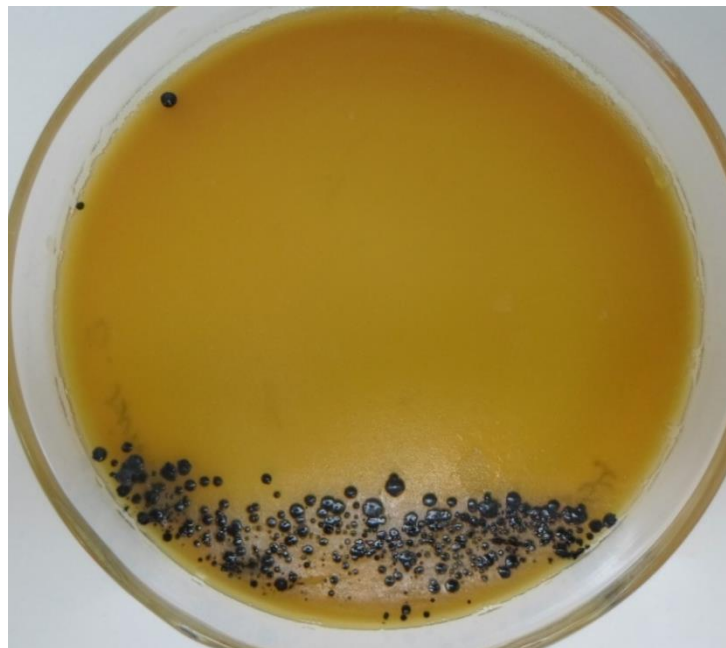
células somáticas (CCS), duas ou até três vezes acima dos valores normais. São encontrados com alta frequência em propriedades com baixa prevalência de infecções causadas por patógenos mais agressivos, como a espécie *S. aureus* e, acometem mais as vacas em primeira lactação (FONSECA; SANTOS, 2007).

Figura 2 – Isolamento em placa de *Staphylococcus aureus* em meio Sal Manitol.



Fonte: Próprio autor.

Figura 3 – Isolamento em placa de *Staphylococcus simulans* em meio Baird-Parker.



Fonte: Próprio autor.

### 3.1.3 Caracterização das espécies do Gênero *Streptococcus*

São microrganismos da família Streptococcaceae, Gram-positivos, catalase negativos em forma de cocos, dispostos em pares ou cadeias e anaeróbios estritos ou facultativos. Dentre suas espécies, duas destacam-se como agentes causadores de mastite bovina: o *Streptococcus agalactiae*, que é o de maior prevalência e o *Streptococcus dysgalactiae*. Em relação às necessidades de nutrição, os *Streptococcus* são as bactérias mais seletivas e exigentes em crescimento e multiplicação, tendo preferência por meios enriquecidos com sangue ou soro, como por exemplo, sangue de carneiro ou infuso de carne equina (FERNANDES, 2003; PHILPOT; NICKERSON, 2002).

O *Streptococcus agalactiae* é um patógeno contagioso com capacidade de aderência ao tecido da glândula mamária das vacas, sendo o úbere bovino microambiente necessário para o seu crescimento e multiplicação. Quanto maior a capacidade de se aderir ao epitélio da glândula mamária, maior sua virulência, causando, normalmente, mastites subclínicas tendendo a cronicidade. Sua transmissão ocorre principalmente no ato da ordenha sem higienização pelo equipamento de ordenha contaminando, conseqüentemente, as mãos dos ordenhadores e o material de desinfecção do úbere e, também por medicações intramamárias não eliminadas (KEEFE, 1997; WANGER; DUNNY, 1987).

O *Streptococcus agalactiae* raramente causa mastites agudas e, sobrevivem por um curto período de tempo fora do ambiente do úbere. Pode ser disseminado, também, para o úbere de novilhas pela boca de um bezerro que tenha mamado anteriormente leite contaminado em outra vaca e, na introdução de uma vaca infectada, recentemente comprada, no rebanho (WATTIAUX, 2013).

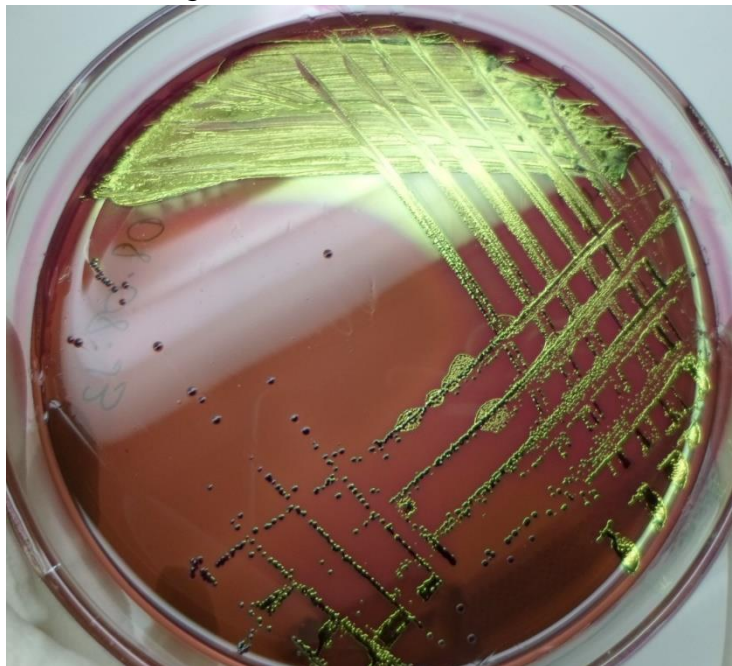
O *Streptococcus dysgalactiae* não tem a mesma necessidade do microambiente da glândula mamária, podendo ser isolado de tonsilas palatinas, facilitando assim a transmissão de mastite para novilhas e vacas secas pela lambadura dos tetos (FONSECA; SANTOS, 2007). É um patógeno considerado tanto contagioso como ambiental, o que lhe proporciona a possibilidade de ser transmitido de vaca para vaca no ato da ordenha e, também, serem difíceis de eliminar do rebanho por estarem presentes no ambiente natural. Sua taxa de infecção cresce de acordo com o aumento da umidade e durante os meses de chuva (PETERSSON-WOLFE; CURRIN, 2012; WATTIAUX, 2013).



### 3.1.4 Caracterização da espécie *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é um microrganismo procariota, Gram-negativo, simples, pequeno, apresentando forma de bastonete, sendo o patógeno mais importante e predominante nas infecções de causa ambiental (VELOSO, 2006). Constitui-se em nível de célula, por uma membrana citoplasmática recoberta por uma parede fina de mureína e uma membrana exterior. Entretanto, em certas condições, ainda pode conter uma camada viscosa de polissacarídeos, chamada de cápsula. Esta estrutura tem como função proteger a *E. coli* de adversas condições ambientais e também facilita sua adesão à superfícies. É um patógeno anaeróbio facultativo, mesófilo com temperatura ótima de crescimento e multiplicação à 39°C, podendo variar entre 21 e 37°C e, em alguns casos, pode apresentar característica extremista com variação entre 8 e 48°C (Figura 4). Com relação ao pH, cresce em ambientes próximos da neutralidade, ou seja, entre 6 e 8. Isso não impede seu crescimento com pH 5 e 9, porém mais lentamente (EL-SHAROUD, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2002; VELOSO, 2006).

Figura 4 – Isolamento em placa de *Escherichia coli* em meio EMB - *Eosin Methylene Blue Agar*.



Fonte: Próprio autor.

A *E. coli* é classificada entre os coliformes que habitam normalmente o solo e o intestino das vacas. Multiplicam-se e acumulam-se no esterco e na cama dos animais, podendo causar mastite apenas com o contato de partículas contaminadas do ambiente e o úbere. As infecções das glândulas mamárias causadas por *E. coli* ocorrem com maior prevalência em vacas com baixa contagem de células somáticas (CCS) e sem infecção concorrente na glândula. Vacas em início de lactação, mais velhas e com alta produção leiteira são as mais susceptíveis a mastites severas causadas por coliformes (FONSECA; SANTOS, 2007).

### **3.2 Processo inflamatório da glândula mamária e resposta imune**

As bactérias causadoras da mastite produzem toxinas que danificam as células secretoras de leite liberando substâncias que resultam no aumento da permeabilidade dos tecidos sanguíneos. Dessa forma, leucócitos adicionais, principalmente neutrófilos no caso da mastite, se movem para o lugar da infecção (ARAÚJO; GHELLER, 2005; CARNEIRO *et al.*, 2009).

A reação inflamatória que ocorre na glândula causa alterações na composição do leite, tanto em termos de qualidade, como de quantidade dos componentes. Essas alterações ocorrem porque durante o processo inflamatório com as paredes dos vasos sanguíneos mais permeáveis, diversas substâncias do sangue, como, íons de sódio e cloro, proteínas e células somáticas passam para o leite. A presença dos fagócitos (células somáticas), constituídas por leucócitos e células epiteliais, aumenta prontamente seguindo-se a invasão bacteriana, quando agem reconhecendo, ingerindo e destruindo o material estranho. A inflamação também torna as células das glândulas mamárias menos eficientes, com menor capacidade de produzir e secretar leite, resultando na diminuição da quantidade de leite produzido. Ocorre também a morte das células e a liberação de enzimas que agravam o processo inflamatório (PRESTES *et al.*, 2002; TRISTÃO, 2013).

A resposta imune humoral que ocorre envolve um antígeno, que estimula uma resposta imune específica, e um anticorpo constituído por uma proteína especial (sintetizada pelos linfócitos B e plasmócitos), capaz de se combinar ao antígeno específico. Os anticorpos são divididos em classes de proteínas denominadas de imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA, IgD e IgE), que tem a função de formar complexos antígeno-anticorpo, os quais intensificam a fagocitose, neutralizam o antígeno e

ativam o sistema de complemento. Esse sistema é composto por uma série de proteínas sanguíneas, com interação de uma cascata enzimática que funciona integrando as respostas inflamatórias em casos agudos como na mastite (PRESTES *et al.*, 2002).

### **3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no diagnóstico etiológico da mastite**

Os métodos comumente utilizados para diagnóstico etiológico dos casos de mastite estão baseados na cultura bacteriológica, através do isolamento e identificação das bactérias por técnicas bioquímicas. Esses métodos são limitados pela baixa sensibilidade e crescimento lento ou inviável do microrganismo. Além disso, vacas infectadas com a forma subclínica da mastite podem eliminar intermitentemente o patógeno. Desta forma, a cultura feita a partir do leite pode não revelar qual o principal microrganismo causador da doença naquele rebanho. Culturas negativas também podem ocorrer quando resíduos de antibióticos estão presentes na amostra, o que inibi o crescimento microbiano. A presença de leucócitos e alta contagem de células somáticas no leite também têm um potencial de inibição do crescimento (PHUERKTES *et al.*, 2001; CREMONESI *et al.*, 2005).

As limitações dos testes microbiológicos levaram ao uso de técnicas moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificar os agentes causadores das mastites. A PCR é uma técnica da biologia molecular que permite a replicação *in vitro* do DNA ou RNA de forma extremamente rápida a partir de quantidades mínimas de material genético, além de propiciar a detecção e identificação direta e específica dos microrganismos causadores da mastite (ROCHE, 2013).

Basicamente a técnica de PCR consiste em etapas que variam de temperatura para gerar a amplificação da cadeia de DNA ou RNA que se pretende pesquisar. A reação é composta por um conjunto de quatro nucleotídeos do DNA (dNTP's); dos iniciadores, os conhecidos *primers*; e para a amplificação da reação enzimática, a enzima *Taq* DNA Polimerase termoestável ou simplesmente *Taq* Polimerase que tem sua atividade dependente de íons magnésio (Mg<sup>++</sup>). A partir de uma fita molde de DNA, milhares de cópias de uma sequência específica são amplificadas (COSTA, 2013; ROCHE, 2013).

Para que essa amplificação ocorra de forma correta e segura, o DNA deve estar em condições ideais, principalmente, de concentração. Isso só pode ser garantido com um processo de extração de DNA definido e bem realizado, com o uso calculado de cada reagente necessário, pois não existe um protocolo fixo para todos os tipos de material (SILVA *et al.*, 2012).

A PCR apresenta vantagens se comparada aos métodos tradicionais de diagnóstico como maior poder de tipificação e discriminação, maior rapidez, maior seletividade, especificidade, bom limite de detecção, potencial para automação e possibilidade de trabalhar com bactérias inviáveis (provenientes de amostras mal preservadas) e que não são cultiváveis em meios de cultura normalmente utilizados (MARTINEZ *et al.*, 2001; PHUERKTES *et al.*, 2001).

Silva (2008) identificou e diferenciou patógenos causadores da mastite sem a necessidade de pré-tratamentos ou de isolamentos bacterianos, utilizando *primers* específicos através de reações de PCR individuais e multiplex.

### **3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a qualidade do leite**

Um dos parâmetros mais importantes para determinar a vida útil do leite e seus derivados é a avaliação da contaminação microbiológica, já que, diversos fatores contribuem para uma má qualidade na sua microbiota. É de suma importância o controle higiênico-sanitário do leite, desde a sua obtenção, ainda cru nas fazendas até a embalagem do produto final, sistemas de refrigeração adequado nas propriedades rurais e um controle sanitário do rebanho leiteiro sem deficiência. Por isso, a produção leiteira em condições inadequadas de higiene torna essa matéria prima um veículo de transmissão de doenças à população (PADILHA *et al.*, 2001; SILVA, 2008).

Os microrganismos do gênero *Staphylococcus*, por exemplo, constituem um grupo muito importante de bactérias Gram-positivas que se apresentam tanto na pele como nas mucosas dos humanos, sendo estes, portanto, um reservatório potencial de disseminação para animais de sangue quente. Isso caracteriza o manipulador ou tratador do rebanho leiteiro, na sala de ordenha, como peça chave da cadeia de transmissão epidemiológica das intoxicações alimentares (KLOOS, 1980; ROONEY *et al.*, 2004).

Chapaval *et al.* (2006), avaliou a técnica de REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic*) através do rastreamento de *Staphylococcus aureus* na linha de produção de leite para monitorar a qualidade deste. A técnica apresentou-se útil para investigar possíveis falhas no manejo e assim, métodos de controle mais eficientes podem ser elaborados com o intuito de evitar ou diminuir a disseminação de microrganismos causadores de sérias enfermidades que podem ser transmitidas através do leite e seus derivados.

Com a técnica de PCR é possível avaliar as mãos dos ordenhadores, as teteiras, os úberes dos animais e o próprio leite *in natura* como reais veículos de contaminação, além disso, esta técnica pode ser mais explorada para diversos estudos na área de epidemiologia molecular (CHAPAVAL *et al.*, 2006).

### **3.5 Contagem de células somáticas e a qualidade do leite**

A técnica de contagem de células somáticas é o método clássico no monitoramento do estado de saúde da glândula mamária, sendo considerada medida padrão de qualidade. Isso deve-se a relação da técnica de análise com a composição do leite, seu rendimento industrial e, principalmente, sua segurança alimentar. É, também, importante dentro das propriedades rurais, pois indica o real estado sanitário das glândulas mamárias, auxiliando na identificação dos possíveis problemas e evitando perdas significativas, tanto na produção, quanto na qualidade do leite (BUENO *et al.*, 2005; DOMINGUES *et al.*, 2008; HARMON, 1998).

Diversos fatores são responsáveis pela variação da contagem de células somáticas (CCS) do leite, como: a idade da vaca, o estágio da lactação em que se encontra, a época do ano que está relacionada com o grau de umidade ambiente, estresse, qualidade de nutrição e, o mais importante de todos os fatores que é a presença de mastite no rebanho leiteiro (MAGALHÃES *et al.*, 2006). Philpot; Nickerson (2002) em um de seus estudos afirmaram que a CCS está, intimamente, relacionada com temperatura e umidade elevadas, pois aumentam a probabilidade de ocorrência de mastite.

Células somáticas são os leucócitos do sangue, distribuídos em macrófagos, neutrófilos e linfócitos. Estas células apresentam duas funções principais no úbere das vacas, que são: o combate aos microrganismos invasores e o auxílio na reparação dos tecidos secretores do leite, cujos foram danificados pela infecção e

processo inflamatório causado pela mastite (PHILPOT, 2002). Segundo Harmon (1998), a contagem de células somáticas, considerada normal, por vaca, em quartos mamários sem infecção mastítica, geralmente, está abaixo de 200.000 células/mL, podendo ser inferior a 100.000 células/mL nos animais em primeira lactação.

De acordo com Wattiaux (2013), contagens de células somáticas acima de 200.000 células/mL por vaca, indicam casos de mastite subclínica. Já as contagens abaixo de 400.000 células/mL, a nível de tanque comunitário nas propriedades rurais, são características de rebanhos tratados dentro das medidas de boas práticas de manejo, porém, sem relevância no controle de mastite. Essa contagem, em tanque comunitário, acima de 500.000 células/mL indica a presença de infecção em, pelo menos, um terço das glândulas mamárias do rebanho e, a consequente perda de leite (10% pelo menos) por causa da mastite subclínica (Tabela 2).

Tabela 2 – Correlação entre os dados de CCS, quarto mamário infectado, perda de produção e a prevalência de casos de mastite subclínica no rebanho leiteiro.

| <b>CCS</b>                 | <b>Quarto mamário Infectado</b> | <b>Perda de produção (%)</b> | <b>Casos de mastite Subclínica</b> |
|----------------------------|---------------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| <b>&lt;200.000</b>         | 6%                              | 0 a 5                        | <i>Próxima de zero</i>             |
| <b>200.000 a 500.000</b>   | 16%                             | 6 a 9                        | <i>Poucos casos</i>                |
| <b>500.000 a 1.000.000</b> | 32%                             | 10 a 18                      | <i>Muitos casos</i>                |
| <b>&gt;1.000.000</b>       | 48%                             | 19 a 29                      | <i>Epidemia</i>                    |

Fonte: Modificado de WATTIAUX, 2013, p. 94.

A alta CCS, propriamente dita, no leite não é considerada como fator de risco à saúde do consumidor, devido à destruição dos patógenos causadores de infecções, pelo processo de pasteurização do leite. O que deve ser levado em consideração são as enzimas microbianas, produzidas pelos patógenos, que não são destruídas pelo processo, causando a diminuição da vida útil dos produtos de origem láctea (MAGALHÃES *et al.*, 2006; PHILPOT, 2002).

### 3.6 Perdas econômicas

O impacto econômico da mastite tem sido foco de vários estudos, porque trata-se da enfermidade que proporciona as maiores perdas econômicas para o setor leiteiro por sua alta frequência e os resultados vêm sendo amplamente divulgados como justificativas para a implantação de medidas de controle da mastite bovina (FREITAS *et al.*, 2005; PHUEKTES *et al.*, 2001; SILVA; SILVA, 2005).

Estima-se um prejuízo de cerca de US\$ 1,8 bilhão/ano nos EUA, em função da ocorrência da mastite (BRAMLEY *et al.*, 1996 apud SANTOS *et al.*, 2010). No Brasil, com a alta prevalência de mastite nos rebanhos, é esperada a perda de produção entre 12 e 15%, significando um total de 2,8 bilhões de litros de leite/ano em relação à produção anual de 21 bilhões de litros (FONSECA; SANTOS, 2007). Estudos realizados no Brasil mostraram que quartos mamários com mastite subclínica produziram, em média, 25 a 42% menos leite que quartos mamários normais (TRISTÃO, 2013).

Além da redução da quantidade de leite produzido, há ainda redução da qualidade do leite e derivados, descarte prematuro de animais acometidos, aumento dos custos com drogas, serviços veterinários e mão de obra (DIAS, 2007).

A presença da mastite no rebanho leiteiro eleva o gasto com medicamentos que são escolhidos, muitas vezes, de maneira aleatória, por isso, deve ser criteriosa a escolha de antibióticos adequados e eficientes e sempre que possível baseada em resultados de testes de sensibilidade (PRESTES *et al.*, 2002).

### 3.7 Fatores de risco associados à mastite subclínica

O leite é um alimento completo em sua composição composto por proteínas, gordura, água, minerais e vitaminas que ao ser produzido e secretado pelos alvéolos mamários do úbere da vaca é considerado estéril. A característica de alimento rico e completo torna o leite um excelente meio de crescimento para microrganismos infecciosos e oportunistas de origem interna da própria glândula mamária, da superfície do úbere e das tetas e, pode ainda ter como agravante, o uso do equipamento de ordenha e utensílios contaminados, além de manuseio e armazenamento inadequados (BRITO; BRITO, 2000; GUERREIRO *et al.*, 2005).

Vários são os fatores de risco associados à contaminação do leite cru por microrganismos causadores da mastite subclínica destacando-se, principalmente, os que contribuem com a perda da qualidade do leite, como: estado de saúde e higiene das vacas, má qualidade da água utilizada para a limpeza do ambiente e dos tetos das vacas, falta de higiene durante o processo de ordenha, ausência ou má higienização dos equipamentos de ordenha e utensílios, armazenamento e transporte do leite em condições impróprias de higiene e de temperatura (OLIVEIRA *et al.*, 2010; PALES *et al.*, 2005).

A população bacteriana contida no leite pode atingir números elevados se não houver sua refrigeração à temperatura de 4°C o mais rápido possível após a ordenha, gerando deterioração prematura do leite fluido e, conseqüentemente, de seus derivados lácteos com a redução da vida de prateleira podendo colocar a saúde dos consumidores em risco. Esse parâmetro de refrigeração do leite, tanto na fazenda como durante o processo de coleta e transporte até as indústrias beneficiadoras estão regulamentadas, no Brasil, pela Instrução Normativa nº 62 para as regiões Norte e Nordeste até junho de 2015 e para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste até junho de 2014 (Tabela 3) (BRITO; BRITO, 2000).

Tabela 3 – Parâmetros microbiológicos, físicos, químicos, de resíduos químicos e de contagem de células somáticas (CCS) avaliados pelo controle de qualidade do leite cru de vacas.

| <b>Índice medido<br/>(propriedade rural ou<br/>tanque comunitário)</b> | <b>Até 30.06.14 (S, SE, CO)</b> | <b>A partir de 01.07.14</b> |
|------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
|                                                                        | <b>Até 30.06.15 (N, NE)</b>     | <b>A partir de 01.07.15</b> |
| <b>Contagem Padrão em Placas (UFC/mL)</b>                              | Máximo de $6,0 \times 10^3$     | Máximo de $3,0 \times 10^3$ |
| <b>Contagem de Células Somáticas (CS/mL)</b>                           | Máximo de $6,0 \times 10^3$     | Máximo de $5,0 \times 10^3$ |

Fonte: Modificado de BRASIL, 2011, p.14.



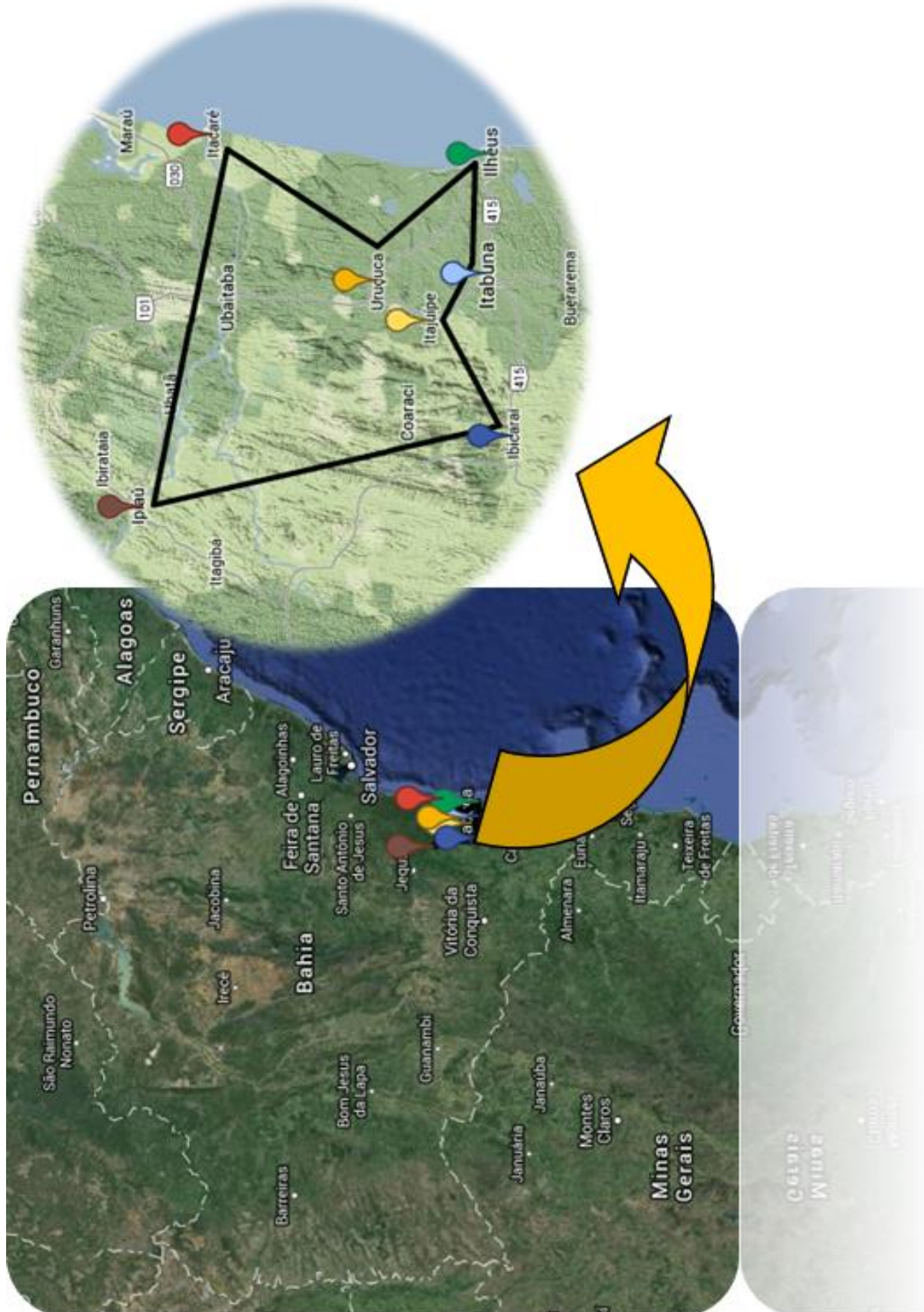
## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Localização e descrição das propriedades**

Para realização do trabalho foram selecionadas propriedades rurais de criação de gado leiteiro pertencentes a microrregião de Ilhéus-Itabuna, dentre as cidades de Itabuna, Ilhéus, Uruçuca, Itacaré, Itajuípe, Ibicaraí e Ipiaú (Figura 5). A microrregião faz parte da mesorregião do Sul Baiano e possui o maior número de cidades da Bahia, com um total estimado pelo IBGE em 2007, de 41 municípios, dentro de uma área total de 21.308,944 km<sup>2</sup> e população de 1.081.347 habitantes. O clima é considerado tropical úmido com chuvas distribuídas ao longo de todo o ano, principalmente, na estação do verão. Seus índices pluviométricos variam entre 2.000 e 2.400 milímetros por ano com temperatura média em torno de 24,7°C e umidade relativa do ar entre 80 e 88%.

As visitas foram realizadas de acordo com a autorização dos proprietários das fazendas contatadas, num total de 10 propriedades com sistemas de ordenha manual e mecânica, criadoras de animais das raças Girolando, Jersey e, em sua maioria, mestiços. Todas as vacas em estágio de lactação, num total de 396 animais, foram examinadas para posterior coleta do material. Durante cada visita coletou-se informações individuais dos animais e, também dados sanitários e zootécnicos das propriedades de acordo com os questionários aplicados (Apêndices 1, 2 e 3).

Figura 5 – Mapa da microrregião de Ilhéus-Itabuna detalhando as cidades onde se localizam as propriedades visitadas no estudo.



Fonte: Montado no Google Earth pelo próprio autor.

## 4.2 Coleta das amostras de leite

Todas as vacas em lactação de cada propriedade foram analisadas pelo *California Mastitis Test* (CMT) para seleção dos animais positivos à forma subclínica da mastite bovina. Com o resultado do CMT em mãos foram coletadas amostras de 10 mL de leite dos tetos positivos (*pool*) em tubos de vidro devidamente esterilizados e identificados com dados da vaca, propriedade e data do dia de coleta. As amostras acondicionadas nos tubos de vidro foram armazenadas sob refrigeração e transportadas para o Laboratório de Genética Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) para análises posteriores.

## 4.3 Preparo das amostras de leite para contagem de células somáticas

Do total de amostras de leite positivas para mastite subclínica bovina coletadas nas propriedades rurais, 100 foram selecionadas para um segundo tipo de processamento no Laboratório de Genética Animal da UESC. O processo se constituiu na agitação, em vortex, de cada uma das amostras trazidas diretamente das propriedades (leite íntegro) para posterior transferência de uma alíquota de 2 mL de leite, apenas refrigerado (manutenção da integridade das células somáticas), para microtubos de 2 mL. As alíquotas reservadas foram mantidas em refrigeração à temperatura de 8°C, sem congelamento, até o momento da realização da contagem de células somáticas.

## 4.4 Contagem de células somáticas (CCS)

As amostras reservadas sob refrigeração, com volume final de 2 mL de leite foram agitadas em vortex para completa homogeneização. Uma pequena quantidade de leite foi coletada com o cassete apropriado para o equipamento específico de leitura e contagem de células somáticas Cell Counter DCC (DeLaval), contendo os reagentes próprios para reação com o núcleo das células somáticas presentes na amostra de leite. Inicialmente, foi introduzida a ponta do cassete diretamente no leite e, em seguida, o mesmo (cassete) foi devidamente posicionado e inserido no local indicado para análise de CCS do equipamento. Todos os resultados foram obtidos em CCS/ $\mu$ L. O leite restante contido nos microtubos de 2

mL foram armazenados à temperatura de 4°C para congelamento e estocagem de cada amostra de leite coletada nas propriedades.

#### **4.5 Preparo das amostras de leite para retirada de gordura e sujidades do leite: Pré-extração de DNA**

No Laboratório de Genética Animal da UESC, o leite coletado passou por um processo de pré-extração de DNA que se constituiu pela lavagem de cada uma das amostras para retirada de gordura e sujidades. O processo dividiu-se em duas lavagens com respectivas centrifugações das amostras a 5.500 g por 10 minutos. Na primeira lavagem foi diluído 3 mL de leite de cada amostra em 9 mL de solução tampão fosfato-salino (PBS) 1x, pH 7,4 (refrigerada) na proporção de 1:3 dentro de tubos de 15 mL. Após a primeira centrifugação, a camada de gordura superior formada foi retirada com o auxílio de chumaços de algodão estéril e, em seguida, parte do sobrenadante contido no tubo foi descartado, deixando um total restante de 6 mL. Na segunda lavagem foi realizada nova diluição na proporção 1:3 no mesmo tubo, adicionando 6 mL de PBS 1x para a segunda centrifugação (CALDART *et al.*, 2011). Terminada a segunda lavagem das amostras foi feito o descarte do sobrenadante, deixando uma alíquota de 500 µL (sobrenadante + *pellet*) no fundo do tubo. Fez-se a resuspensão do meio com posterior transferência da amostra lavada de leite para microtubos de 2 mL e, conservação a 4°C para processo subsequente de extração de DNA.

#### **4.6 Extração de DNA das amostras de leite**

As amostras, já lavadas, com volume final de 500 µL foram descongeladas à temperatura ambiente para a extração de DNA. Após descongelamento foi adicionado a cada amostra de leite 250 µL de 50 mM EDTA, pH 8,0; 250 µL de 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 µL de Triton e, 5 µL de Proteinase K (120 µg/mL) com agitação em vortex por, aproximadamente, 1 minuto para homogeneizar os reagentes completamente. Essa mistura foi para o banho-maria à temperatura de 60°C por 50 minutos. Posteriormente, foi adicionado 200 µL de SDS 1% com agitação manual lenta e, retorno ao banho-maria à 60°C por 30 minutos. Retiradas as amostras do banho-maria foi realizado o protocolo de extração Fenol-Clorofórmio-

Álcool Isoamílico (25:24:1), em cada tubo, com agitação em vortex por 1 minuto e centrifugação a 14.000 *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e, a precipitação do DNA feita com adição de 1 mL de etanol 100% e 200  $\mu$ L de acetato de amônio 5 M com refrigeração a 4°C por 20 minutos e, subsequente centrifugação a 12.000 *g* por 10 minutos. Por fim, o *pellet* foi lavado com etanol 85%, suspenso em 50  $\mu$ L de água ultrapura (Milli-Q®) e, quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop 2000) com absorvância de 260 nm e 280 nm.

#### 4.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras foram amplificadas individualmente para cada par de *primer* específico das espécies dos agentes infecciosos causadores da mastite bovina em estudo (Tabela 4). A reação de PCR foi composta por 200  $\mu$ M dNTP, 3,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (Ludwig Biotec Brasil), e 1,6x tampão de amplificação, com volume final de 25  $\mu$ L. Todos os *primers* foram utilizados em concentração de 10 pmol. As amplificações no termociclador seguiram protocolos com temperatura de anelamento específica para cada *primer*. Foi realizada uma desnaturação inicial a temperatura de 94°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto para as espécies *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Streptococcus agalactiae*, 59°C para *Streptococcus dysgalactiae*, 50°C para *Staphylococcus simulans* e 53°C para o gene constitutivo  $\beta$ -actina, seguidos de extensão a 72°C por 1 minuto e, extensão final a 72°C por 7 minutos no termociclador MJ96G (Biocycler®). A visualização das bandas ocorreu por separação em gel de agarose 2% com revelação em brometo de etídio. A maioria dos controles positivos foi adquirida de culturas puras cedidas pela FIOCRUZ - RJ (Tabela 5), apenas o controle positivo para *S. dysgalactiae* foi produzido por isolamento bacteriológico diretamente de amostras de leite contaminado no Laboratório de Bactérias Anaeróbias da Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC.

Tabela 4 – Lista de *primers* utilizados no estudo.

| <b>Primer</b>                       | <b>Sequência 5' – 3'</b>                                                 | <b>Identificação do primer</b>    | <b>PB*</b> | <b>Referência</b>            |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|------------|------------------------------|
| <b>STAA-AuI</b><br><b>STAA-AuII</b> | TCT TCA GAA GAT GCG GAA TA<br>TAA GTC AAA CGT TAA CAT ACG                | <i>Staphylococcus aureus</i>      | 420        | SILVA, 2008                  |
| <b>SSMF</b><br><b>SSMR</b>          | AGC TTC GTT TAC TTC TTC GAT<br>TGT<br>AAA AGC ACA AGC TCA CAT<br>TGA C   | <i>Staphylococcus simulans</i>    | 472        | SHOME <i>et al.</i> , 2011   |
| <b>STRD-DyI</b><br><b>STRD-DyII</b> | GAA CAC GTT AGG GTC GTC<br>AGT ATA TCT TAA CTA GAA AAA<br>CTA TTG        | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | 264        | SILVA, 2008                  |
| <b>STRA-AgI</b><br><b>STRA-AgII</b> | AAG GAA ACC TGC CAT TTG<br>TTA ACC TAG TTT CTT TAA AAC<br>TAG AA         | <i>Streptococcus agalactiae</i>   | 270        | SILVA, 2008                  |
| <b>ECPF</b><br><b>ECPR</b>          | GGT AAC GTT TCT ACC GCA<br>GAG TTG<br>CAG GGT TGG TAC ACT GTC<br>ATT ACG | <i>Escherichia coli</i>           | 468        | SHOME <i>et al.</i> , 2011   |
| <b>ACTBF</b><br><b>ACTBR</b>        | GAC ATC CGC AAG GAC CTC TA<br>ACA TCT GCT GGA AGG TGG AC                 | $\beta$ -actina                   | 205        | PEREIRA <i>et al.</i> , 2010 |

Legenda: \*Pares de base.

Tabela 5 – Dados INCQS e ATCC dos controles positivos cedidos pela FIOCRUZ/RJ.

| <b>Microrganismo</b>                   | <b>INCQS*</b> | <b>Origem</b>           | <b>Referência</b>          |
|----------------------------------------|---------------|-------------------------|----------------------------|
| <b><i>Staphylococcus aureus</i></b>    | 00186         | SSI <sup>&amp;</sup> I  | FIOCRUZ – RJ, 2013         |
| <b><i>Staphylococcus simulans</i></b>  | 00254         | ATCC <sup>#</sup> 27851 | FIOCRUZ – RJ, 2013         |
| <b><i>Streptococcus agalactiae</i></b> | 00128         | ATCC <sup>#</sup> 13813 | SHOME <i>et al.</i> , 2011 |
| <b><i>Escherichia coli</i></b>         | 00033         | ATCC <sup>#</sup> 25922 | SHOME <i>et al.</i> , 2011 |

Legenda: \*Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; <sup>&</sup>Surgical Site Infection; <sup>#</sup>American Type Culture Collection.

#### **4.8 Caracterização do gene constitutivo $\beta$ -actina (ACTB)**

A  $\beta$ -actina (ACTB) é uma proteína que se encontra ligada ao citoesqueleto no citoplasma celular que desempenha uma enorme variedade de funções intracelulares envolvidas com a morfologia e trabalho da célula, incluindo a citocinese, endocitose, divisão celular, motilidade, migração, formação de junção, regulação da transcrição, remodelação de cromatina e, também processos de adesão celular (AYSCOUGH, 2004; PERRIN; ERVASTI, 2010).

Vários tecidos corporais expressam genes constitutivos, assegurando as funções de desempenho celular. E, para maiores conhecimentos de seus padrões de expressão gênica, vários estudos são realizados em diversos tipos de tecidos de espécies mamíferas, de acordo com cada processo evolutivo (ZHANG *et al.*, 2004).

Uma das principais utilizações do gene da  $\beta$ -actina é nos diagnósticos moleculares, pois aumenta a confiabilidade dos resultados através da possível eliminação de resultados falso-negativos em casos de erro de pipetagem das enzimas reagentes ou do DNA e, ainda, por contaminação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Além dessa possibilidade, o gene constitutivo pode ser utilizado como ponto referencial, em análises semi-quantitativas (ASQ), para outros genes de interesse que se deseja amplificar nas reações de PCR em parâmetro comparativo. (VIEIRA; TEIXEIRA; NOGUEIRA, 2006; ZHAO *et al.*, 2005).

#### **4.9 Fatores de risco associados à mastite subclínica**

Todos os procedimentos e cuidados tomados durante a coleta do leite no processo de ordenha nas fazendas influenciam diretamente na qualidade do leite que chega às indústrias de beneficiamento. Devido a este ponto, vários fatores de risco associados à mastite subclínica foram analisados durante as visitas às propriedades. Procedimentos de controle e prevenção da enfermidade como a manutenção da saúde e higiene das vacas, a higienização do ambiente do curral ou da sala de ordenha, limpeza e desinfecção dos equipamentos de ordenha e do tanque de refrigeração, desinfecção de todos os utensílios que tenham contato com o leite coletado, além das mãos dos manipuladores e ordenhadores foram avaliados visualmente no primeiro momento.

O segundo passo seguido para obtenção dos dados foi a aplicação de questionários epidemiológicos e zootécnicos juntamente ao proprietário ou responsável técnico da propriedade presente no local e, também com os ordenhadores e manipuladores dos animais e do leite coletado. Foram questionários contendo perguntas sobre os dados gerais das fazendas, de suas instalações e os individuais com os dados de cada vaca (Apêndices 1, 2 e 3). Como:

- Número de animais atualmente na propriedade;
- Produção média por vaca kg/dia;
- Número de vacas em estágio de lactação;
- Raça dos animais relacionando com o clima da região;
- Número de ordenhas por dia;
- Ordenha manual ou mecânica, com ou sem bezerro ao pé;
- Realização de testes preliminares como CMT e Caneca Telada;
- Momento da alimentação é antes, durante ou depois da ordenha;
- Condição das camas ou piquetes;
- Manutenção e desinfecção dos equipamentos utilizados na ordenha, etc.

#### **4.10 Análise estatística**

As variáveis fatores de risco foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado ou Exato de Fisher. Posteriormente, foi realizada a análise multivariada pelo método de regressão logística com as variáveis de influência nos resultados. Ambas com nível de significância de 5%.



## 5 RESULTADOS

Pelo teste CMT foram identificadas 253 (64,2%) vacas positivas para mastite subclínica dentro das 396 analisadas no estudo. Na avaliação do escore do número de cruces do teste CMT, a maior frequência foi de 46,6% para resultados com apenas uma cruz (+), seguindo de 29,2% para duas cruces (++) e de 20,5% para três cruces (+++) (Tabela 6).

Tabela 6 – Escores de CMT das amostras de leite coletadas de acordo com a espessura de gel formado.

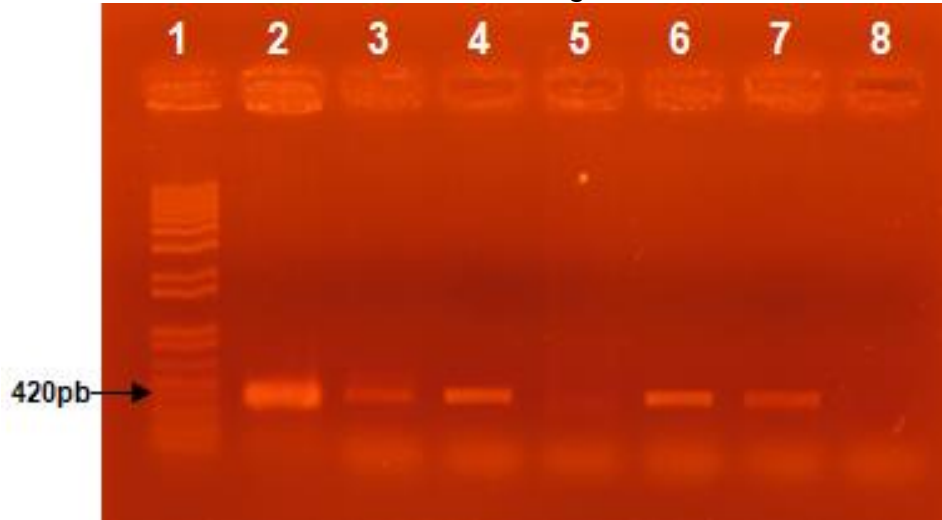
| <b>Escore de CMT</b>     | <b>Espessura do gel</b>           | <b>Nº de Animais Analisados (%)</b> |
|--------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Nenhuma +</b>         | <i>Reação Negativa</i>            | <b>143 (0%)*</b>                    |
| <b>+ (uma cruz)</b>      | <i>Reação fracamente positiva</i> | <b>118 (46,6%)</b>                  |
| <b>++ (duas cruces)</b>  | <i>Reação Positiva</i>            | <b>74 (29,2%)</b>                   |
| <b>+++ (três cruces)</b> | <i>Reação fortemente positiva</i> | <b>52 (20,5%)</b>                   |
| <b>Acima de +++</b>      | <i>Mastite Clínica</i>            | <b>7 (2,8%)#</b>                    |

Fonte: Próprio autor.

Legenda: \*Porcentagem não calculada por descarte dos animais negativos nesta pesquisa. #Leite coletado de tetos com mastite clínica não fizeram parte do pool de amostras.

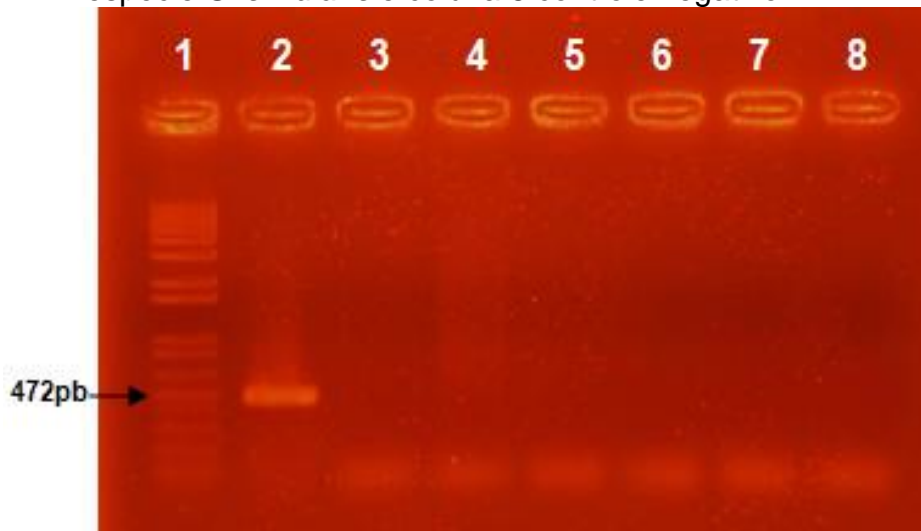
Com a técnica de PCR todas as 253/396 amostras positivas ao teste CMT passaram por análise da qualidade de extração do DNA utilizando *primer* específico para o gene constitutivo da  $\beta$ -actina. Esse teste possibilitou provar a presença de DNA da vaca em cada amostra de leite, confirmando a eficácia da técnica de extração de DNA escolhida. Ainda fazendo uso da técnica de PCR, as cinco espécies de patógenos selecionadas para o estudo foram analisadas (Figuras 6 a 10), obtendo um total de 96/253 (37,9%) vacas positivas para pelo menos uma das espécies. O *Staphylococcus aureus* foi a espécie mais comum com 58/96 (60,4%), seguida da *Escherichia coli* com 40/96 (41,6%), *Streptococcus agalactiae* com 34/96 (35,4%) e o *Streptococcus dysgalactiae* com 8/96 (8,3%). O *Staphylococcus simulans* não foi encontrado dentre as amostras de leite analisadas.

Figura 6 – Resolução em gel de agarose 1,5% apresentando ampliações da espécie *Staphylococcus aureus*. Coluna 1 marcador de peso molecular 1 Kb Plus; coluna 2 controle positivo; colunas 3 a 7 amostras positivas para a espécie *S. aureus* e coluna 8 controle negativo.



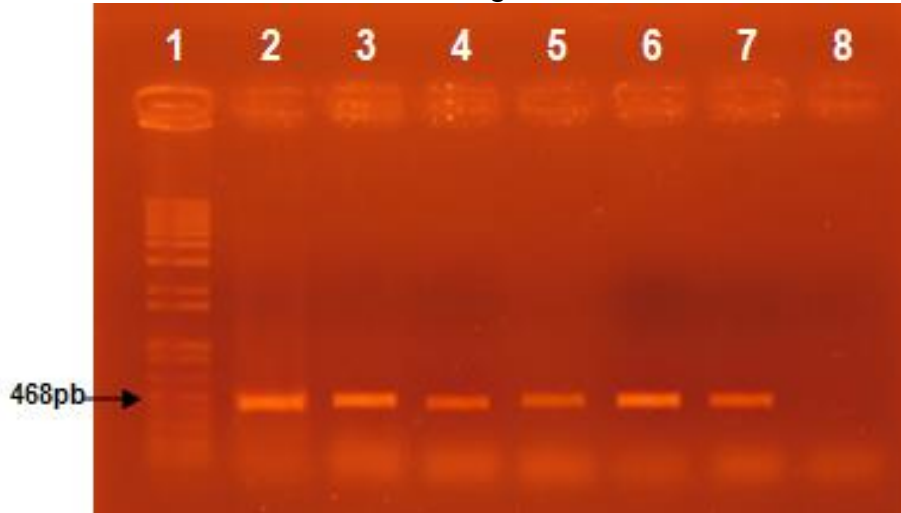
Fonte: Próprio autor.

Figura 7 – Resolução em gel de agarose 1,5% apresentando ampliações da espécie *Staphylococcus simulans*. Coluna 1 marcador de peso molecular 1 Kb Plus; coluna 2 controle positivo; colunas 3 a 7 amostras negativas para a espécie *S. simulans* e coluna 8 controle negativo.



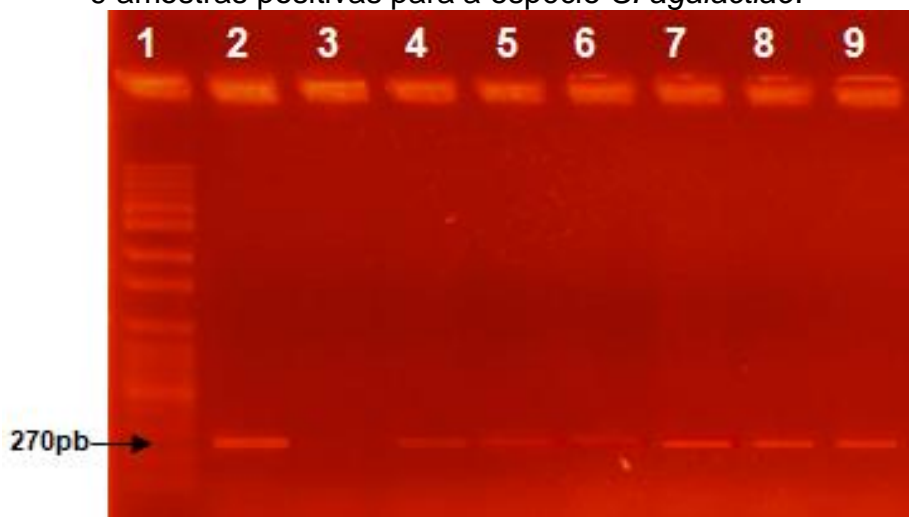
Fonte: Próprio autor.

Figura 8 – Resolução em gel de agarose 1,5% apresentando amplificações da espécie *Escherichia coli*. Coluna 1 marcador de peso molecular 1 Kb Plus; coluna 2 controle positivo; colunas 3 a 7 amostras positivas para a espécie *E. coli* e coluna 8 controle negativo.



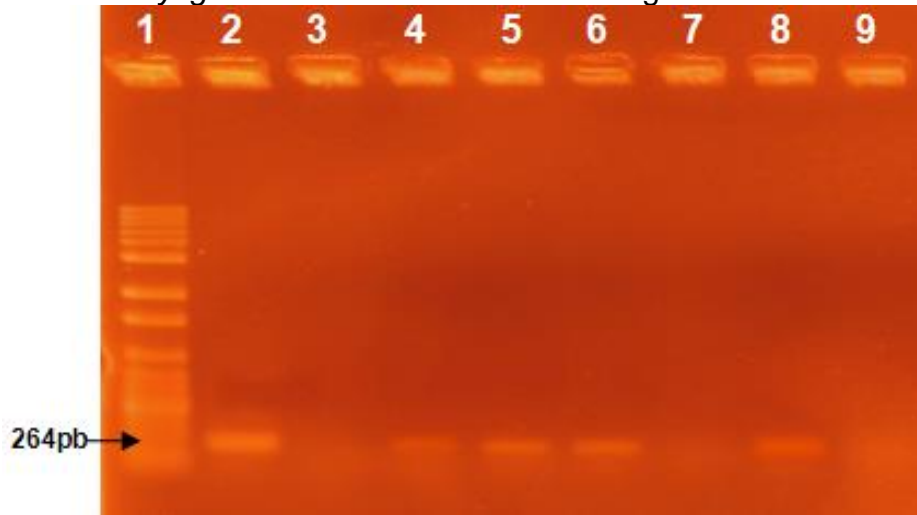
Fonte: Próprio autor.

Figura 9 – Resolução em gel de agarose 1,5% apresentando amplificações da espécie *Streptococcus agalactiae*. Coluna 1 marcador de peso molecular 1 Kb Plus; coluna 2 controle positivo; coluna 3 controle negativo; colunas 4 a 9 amostras positivas para a espécie *S. agalactiae*.



Fonte: Próprio autor.

Figura 10 – Resolução em gel de agarose 1,5% apresentando amplificações da espécie *Streptococcus dysgalactiae*. Coluna 1 marcador de peso molecular 1 Kb Plus; coluna 2 controle positivo; colunas 3 e 7 amostras negativas para *S. dysgalactiae*; colunas 4 a 6 e 8 amostras positivas para *S. dysgalactiae* e coluna 9 controle negativo.



Fonte: Próprio autor.

A análise dos fatores de risco associados à mastite subclínica foram identificados pelas análises estatísticas univariada e multivariada (Tabelas 7 e 8). Na análise bivariada foram testadas amostras positivas e negativas ao teste CMT associados com higienização de tetos, número de lactações por vaca, número de ordenhas por dia, fase da lactação, fornecimento de suplementação alimentar, o tipo de ordenha, presença de outros animais, existência ou não de sala de ordenha. Na análise multivariada, o tipo de ordenha e a fase da lactação no terço final em relação ao inicial foram os reais fatores de risco identificados neste estudo.

Avaliando, individualmente, a fase da lactação foi possível visualizar que as vacas no terço final atingiram 44,7% de positividade à mastite subclínica contra 25,3% em início de lactação dentro da variável teste CMT positivo ( $p = 0,0012$ ). Este fator de risco associado foi determinante para os resultados aumentando a probabilidade ( $OR = 2,6668$ ) de casos de mastite subclínica.

Com a análise do tipo de ordenha realizado nas propriedades foi calculado que 83% das vacas com CMT positivo eram ordenhadas com sistema mecânico e apenas 17% para ordenha manual ( $p = 0,0026$ ).

Tabela 7 – Análise univariada dos fatores de risco associados à mastite subclínica em rebanhos bovinos leiteiros da microrregião de Ilhéus-Itabuna.

| <i>Variáveis</i>       | <i>Animais</i>      |          |                     |          | $\chi^2$ | <i>P-Value</i> | <i>OR</i> | <i>CI 95%</i> |
|------------------------|---------------------|----------|---------------------|----------|----------|----------------|-----------|---------------|
|                        | <i>CMT Positivo</i> |          | <i>CMT Negativo</i> |          |          |                |           |               |
|                        | <i>N</i>            | <i>%</i> | <i>N</i>            | <i>%</i> |          |                |           |               |
| <b>Higiene tetos</b>   |                     |          |                     |          | 0,71     | 0,3980         | 0,79      | 0,50-1,26     |
| Sim                    | 189                 | 74,7     | 99                  | 70,2     |          |                |           |               |
| Não                    | 64                  | 25,3     | 42                  | 29,8     |          |                |           |               |
| <b>Nº de lactações</b> |                     |          |                     |          | 3,41     | 0,0646         | 1,59      | 0,99-2,55     |
| Até 4 lactações        | 170                 | 67,2     | 108                 | 76,6     |          |                |           |               |
| Acima de 4             | 83                  | 32,8     | 33                  | 23,4     |          |                |           |               |
| <b>Nº de ordenhas</b>  |                     |          |                     |          | 2,15     | 0,1424         | 1,43      | 0,91-2,23     |
| Uma/dia                | 67                  | 26,5     | 48                  | 34,0     |          |                |           |               |
| Duas/dia               | 186                 | 73,5     | 93                  | 66,0     |          |                |           |               |
| <b>Fase lactação</b>   |                     |          |                     |          | 32,43    | ---*           | ---       | ---           |
| Início                 | 64                  | 25,3     | 40                  | 28,4     |          |                |           |               |
| Meio                   | 76                  | 30,0     | 76                  | 53,9     |          |                |           |               |
| Final                  | 113                 | 44,7     | 25                  | 17,7     |          |                |           |               |
| <b>Suplementação</b>   |                     |          |                     |          | 15,69    | 0,0000*        | 2,73      | 1,67-4,48     |
| Faz                    | 215                 | 85,0     | 95                  | 67,4     |          |                |           |               |
| Não faz                | 38                  | 15,0     | 46                  | 32,6     |          |                |           |               |
| <b>Tipo de ordenha</b> |                     |          |                     |          | 14,97    | 0,0001*        | 2,60      | 1,61-4,19     |
| Manual                 | 43                  | 17,0     | 49                  | 34,8     |          |                |           |               |
| Mecânica               | 210                 | 83,0     | 92                  | 65,2     |          |                |           |               |
| <b>Outros animais</b>  |                     |          |                     |          | 0,83     | 0,3608         | 0,76      | 0,45-1,27     |
| Sim                    | 195                 | 77,1     | 115                 | 81,6     |          |                |           |               |
| Não                    | 58                  | 22,9     | 26                  | 18,4     |          |                |           |               |
| <b>Sala ordenha</b>    |                     |          |                     |          | 12,64    | 0,0003*        | 2,48      | 1,51-4,07     |
| Com sala               | 214                 | 84,6     | 97                  | 68,8     |          |                |           |               |
| Sem sala               | 39                  | 15,4     | 44                  | 31,2     |          |                |           |               |

Fonte: Próprio autor.

Legenda: \*( $p \leq 0,05$ ).

Tabela 8 – Análise multivariada de fatores de risco associados à mastite subclínica em rebanhos bovinos leiteiros da microrregião de Ilhéus-Itabuna.

| <i>Variável</i>                | <i>OR</i> | <i>CI 95%</i> | <i>P-Value</i> |
|--------------------------------|-----------|---------------|----------------|
| <b><i>Fase da lactação</i></b> |           |               |                |
| <b>Terço inicial</b>           | 2,66      | 1,47 – 4,82   | 0,0012*        |
| <b>Terço final</b>             |           |               |                |
| <b><i>Tipo de ordenha</i></b>  |           |               |                |
| <b>Manual</b>                  | 2,14      | 1,30 – 3,53   | 0,0026*        |
| <b>Mecânica</b>                |           |               |                |

Fonte: Próprio autor.

Legenda: \*( $p \leq 0,05$ ).

## 6 DISCUSSÃO

O resultado deste estudo em rebanhos leiteiros em relação ao teste CMT (*California Mastitis Test*) demonstra que mesmo com toda a evolução das medidas e práticas de manejo, controle e prevenção desenvolvidas, a mastite subclínica ainda se apresenta com altos índices nas vacas. Bandeira *et al.* (2013) fizeram a mesma afirmação em seu estudo realizado no sul do Rio Grande do Sul sobre a frequência de casos de mastite subclínica provocados por *Staphylococcus aureus*.

Vários outros estudos também confirmam este resultado, como: Ferreira *et al.* (2007) no município de Teresina no estado do Piauí, Oliveira *et al.* (2009) em rebanhos bovinos de Sergipe, Mota *et al.* (2012) na etiologia das mastites em Pernambuco e Chagas *et al.* (2012) no município de Indianópolis em Minas Gerais. Os estudos demonstraram alta prevalência da mastite em vacas ligada, principalmente, a fatores de risco associados a condições inadequadas de higiene do ambiente e do ordenhador, bem como dos úberes e tetos antes, durante e após a ordenha. Fontana *et al.* (2012) num estudo feito no município de Jataí, estado de Goiás admite que a alta prevalência da mastite se deve ao tipo de manejo escolhido pelos criadores na propriedade, a ordenha manual com poucos recursos higiênico-sanitários e por falta de adoção de medidas e programas para controle da mastite.

Os dados encontrados neste estudo nos resultados da PCR demonstraram numa ordem decrescente de frequência os patógenos *Staphylococcus aureus* (60,4%), *Escherichia coli* (41,6%), *Streptococcus agalactiae* (35,4%) e *Streptococcus dysgalactiae* (8,3%) seguido do *Staphylococcus simulans* que não obteve resultado positivo. A alta frequência do *S. aureus* foi encontrada também por Fontana *et al.* (2012) que desenvolveram um estudo dentre várias espécies de *Staphylococcus* e, segundo suas revisões as principais fontes de contágio do patógeno são os próprios quartos mamários infectados, a pele do úbere e tetos, as mãos dos ordenhadores e os bocais da ordenhadeira mecânica.

A confirmação também é feita por Bandeira *et al.* (2013) e Schlegelová *et al.* (2003), que apontaram o *S. aureus* como um dos patógenos mais frequentes e responsável por grandes perdas econômicas nos rebanhos leiteiros em todo o mundo. Vieira *et al.* (2013) apresentaram um resultado de 85% das amostras positivas em pesquisa desenvolvida no estado do Espírito Santo e Oliveira *et al.* (2009) num experimento em Sergipe comprovaram a alta frequência dos

microrganismos contagiosos com uma porcentagem de 70% para *S. aureus*, apenas 9,6% acima do encontrado neste estudo que foi de 60,4%. Diferentemente, Mota *et al.* (2012) no estado de Pernambuco encontraram apenas 39,3% de *S. aureus*.

Patógenos ambientais como a *E. coli*, normalmente, apresentam alta frequência nos resultados dos estudos desenvolvidos em regiões com alta umidade. Os microrganismos Gram negativos ambientais são os mais prováveis de serem encontrados pela alta exposição das vacas a esses patógenos devido aos procedimentos inadequados de higiene do ambiente em que vivem. Giannecchini *et al.* (2002) afirmam que os patógenos que mais acometem as vacas são o *S. aureus* (37,5%) e a *E. coli* (12,5%). Os *Streptococcus* aparecem logo na sequência de importância, o que coincide com os resultados de Ferreira *et al.* (2007) e de Mahzounieh *et al.* (2003) com maior prevalência do *S. agalactiae*.

O fator de risco tipo de ordenha foi uma das variáveis com maior associação estatística significativa dentre as causas associadas de mastite subclínica, onde o tipo de ordenha mecânica influenciou mais nos resultados que o manual. Barbosa *et al.* (2009) encontraram resultado semelhante em sua pesquisa na região do Triângulo Mineiro, afirmando que o leite coletado manualmente apresenta valores de CCS menores em relação a coleta mecânica. Entretanto, Junior *et al.* (2012) não encontraram diferença estatística significativa entre os tipos de ordenha na pesquisa desenvolvida em Garanhuns, Pernambuco.

O resultado similar encontrado por Barbosa *et al.* (2009) pode ser justificado pela ocorrência de práticas inadequadas de manejo e higiene dos rebanhos da mesma forma que as encontradas neste estudo. Segundo Ferreira *et al.* (2007) havendo manejo higiênico-sanitário inadequado durante a ordenha juntamente com a falta de profissionalização dos manipuladores e ordenhadores, principalmente, em linhas de ordenha mecânica a elevação da quantidade de casos de mastite subclínica é favorecida. Com relação ao resultado encontrado por Junior *et al.* (2012), a falta de significância estatística pode ter ocorrido por diferenças raciais dos rebanhos e também por características de produção.

A realização do procedimento de higienização dos tetos antes e/ou depois da ordenha não apresentou diferença estatística como fator de proteção para mastite, o que condiz com os resultados encontrados por Junior *et al.* (2012) e Oliveira *et al.* (2010) na mesma variável. Contudo, Souza *et al.* (2005) que estudou rebanhos

leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais, identificaram a importância do pré e pós-*dipping* como preventivo no aumento de CCS.

Com relação às variáveis, momento do fornecimento de alimentação concentrada e de ter ou não sala de ordenha houve diferença estatística, mas do ponto de vista negativo, pois as propriedades com sala de ordenha equipada e que forneciam suplementação antes ou durante a ordenha apresentaram maiores índices de contaminação por mastite subclínica. Souza *et al.* (2005), citado anteriormente, relataram a associação estatística positiva por ambas variáveis serem contribuintes para prevenção do aumento da CCS.

Seguindo a mesma linha de diferença estatística do ponto de vista negativo, o número de ordenhas realizadas por dia apresentou um resultado em que as vacas ordenhadas duas vezes/dia foram mais acometidas pela mastite subclínica, provavelmente pela influência do fornecimento de alimentação para as vacas no momento errado. Isso contradiz o encontrado nos resultados de Ferreira *et al.* (2007) que afirmam a eficiência da dupla ordenha diária com a justificativa da importância da ejeção do leite por parte da vaca, onde o fato da não permanência prolongada do leite no úbere agir como preventivo da mastite.

A justificativa para a não diferença estatística da higienização dos tetos e para não significância para as variáveis sala de ordenha, suplementação antes e durante a ordenha e, número de ordenhas por dia pode se dar por erros no manejo de produção do rebanho leiteiro, por falhas no manejo higiênico-sanitário e a falta de desinfecção do ambiente (FERREIRA *et al.*, 2007). Segundo Netto *et al.* (2006) as vacas devem receber alimentação após a ordenha pelo fato do esfíncter e do canal do teto permanecerem abertos por um período de duas horas. Esse procedimento faz com que a vaca permaneça de pé se alimentando enquanto o fechamento do esfíncter ocorre, evitando a penetração de microrganismos patogênicos no úbere.

A falta de cuidado com higiene e manejo adequados aumenta a presença de patógenos no ambiente com consequente contaminação de úbere, tetos e do próprio leite e, segundo Carvalho *et al.* (2013) vacas durante as duas primeiras lactações da vida devem receber alimentos em quantidades superiores por ainda continuarem crescendo, portanto possuem necessidades nutricionais maiores. Isso pode justificar a alta frequência de vacas mais jovens (menos lactações) detectadas como positivas ao teste CMT neste estudo, pelo fato delas serem menos resistentes ao desafio e necessitarem de maiores cuidados.



E, por fim, o fator de risco vacas em final de lactação apresentou grande influência nos casos de infecção mastítica e, a justificativa mais plausível para tal acontecimento pode ser dada pela afirmação de Almeida (2013) que relata o fato das células secretoras do leite no estágio final da lactação se encontram desgastadas e o balanço energético dessas vacas se encontra fracamente positivo.

Sendo assim, é importante desenvolver e aplicar rotinas de prevenção e controle da enfermidade dentro das linhas de ordenha e em outras instalações da propriedade que as vacas tenham acesso com a intenção de evitar contaminações no leite, já que se trata de um alimento para a subsistência, principalmente, nas zonas rurais que tem costume de consumir o leite na forma *in natura* sem pasteurização ou fervura.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A mastite subclínica é considerada um dos principais problemas com alta frequência dentre as doenças de rebanhos leiteiros. Diante dos fatos existentes, torna-se importante a identificação de animais positivos no rebanho para prevenção e controle das infecções intramamárias com o intuito de melhorar a saúde dos animais e, conseqüentemente, a qualidade do leite e de seus derivados oferecidos à população. A identificação correta e ágil dos agentes patogênicos da mastite através da técnica de PCR é de fundamental importância para a realização dos tratamentos de forma eficaz evitando assim, a resistência das bactérias.

O conhecimento dos fatores de risco associados à mastite subclínica são de fundamental importância para a manutenção de uma boa produção, com qualidade e em condições de saúde adequadas para as vacas e, a contagem de células somáticas (CCS) como parâmetro para a detecção da intensidade da inflamação. Também é possível evitar danos à saúde pública que podem ser provocados pela possibilidade das toxinas dos microrganismos patogênicos serem excretadas no leite e permanecerem estáveis nos produtos destinados ao consumidor.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. **Manejo e alimentação de vacas em lactação**. Disponível em: <http://www.bovinos.ufpr.br/Aula%2009.pdf>. Acesso em: 30 set. 2013.

ARAÚJO D. K. G.; GHELLER V. A. Aspectos morfológicos, celulares e moleculares da imunidade da glândula mamária de búfalas (*Bubalus bubalis*): revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n.2, p. 77-83, abr./jun. 2005.

AYSCOUGH, K. R. Endocytosis: Actin in the driving seat. **Current Biology**, v.14, n.3, p. 124-126. 2004.

BANDEIRA, F. S.; PICOLI, T.; ZANI, J. L.; da SILVA, W. P.; FISCHER, G. Frequência de *Staphylococcus aureus* em casos de mastite bovina subclínica, na região sul do Rio Grande do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.80, n.1, p.1-6, jan./mar. 2013.

BARBOSA, C. P.; BENEDETTI, E.; GUIMARÃES, E. C. Incidência de mastite em vacas submetidas a diferentes tipos de ordenha em fazendas leiteiras na região do Triângulo Mineiro. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, n. 6, p. 121-128, nov./dec. 2009.

BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; COSTA, E. O. Modificação da técnica de contagem de células somáticas de Prescott e Breed utilizando-se a coloração hematoxilina e eosina. **Revista Napgama**, v. 4, n.3, p. 6-9. 2001.

BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M.; ARUNDEL, J. H.; GAY, C. C. **Clínica Veterinária**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 1263p.

BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: In evolving disease. **The Veterinary Journal**, v. 163, p.1-13. 2002.

BRASIL, 2011. **IN 62**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Disponível em: <https://www.apcbrh.com.br/files/IN62.pdf>. Acesso em: 08 jul. 2013.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F. **Qualidade do leite**. 2000. Disponível em: [http://www.fernandomadalena.com/site\\_arquivos/903.pdf](http://www.fernandomadalena.com/site_arquivos/903.pdf). Acesso em: 12 jul. 2013.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; NICOLAU, E. S.; OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, J. P.; NEVES, R. B. S.; MANSUR, J. R. G. M.; THOMAZ, L. W. Contagem celular somática: Relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p. 848-854, jul./ago. 2005.

CALDART, E. T.; CHIAPPETTA, C. M.; LOPES, E. F.; RAVAZZOLO, A. P. Análise comparativa de métodos de extração de DNA genômico de células do sangue e do leite de pequenos ruminantes. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n.1, p. 1-8. 2011.

CARDOSO, H. F. T.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 1, p. 07-10, fev. 2000.

CARNEIRO, D. M. V. F.; DOMINGUES, P. F.; VAZ, A. K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.6, p. 1934-1943, set. 2009.

CARVALHO, L. A. C.; NOVAES, L. P.; MARTINS, C. E.; ZOCCAL, R.; MOREIRA, P.; RIBEIRO, A. C. C. L.; LIMA, V. M. B. **Manejo sanitário**: Embrapa gado de leite. 2013. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/manejo/mamite.html>. Acesso em: 22 set. 2013.

CHAGAS, L. G. S.; MELO, P. C.; BARBOSA, N. G.; GUIMARÃES, E. C.; BRITO, D. D. Ocorrência de mastite bovina causada por *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. e *Candida* sp. em uma propriedade rural no município de Indianópolis – Minas Gerais, Brasil. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 6, p. 1007-1014, nov./dec. 2012.

CHANG, Y. M.; GIANOLA, D.; HERINGSTAD, B.; KLEMETSDAL, G. Longitudinal analysis of clinical mastitis at different stages of lactation in Norwegian Cattle. **Livestock Production Science**, v. 88, p. 251-261. 2004.

CHAPAVAL, L.; MOON, D. H.; GOMES, J. E.; DUARTE, F. R.; TSAI, S. M. Aplicação da técnica de REP-PCR no rastreamento de *Staphylococcus aureus* em sala de ordenha, para o monitoramento da qualidade do leite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.43, n.3, p. 309-320. 2006.

COSTA, R. J. **Técnica de biologia molecular: PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)**. Disponível em: [https://siteantigo.portaleducacao.com.br/conteudo/artigos/farmacia/tecnica-de-biologia-molecular-pcr-\(reacao-em-cadeia-da-polimerase\)/8577](https://siteantigo.portaleducacao.com.br/conteudo/artigos/farmacia/tecnica-de-biologia-molecular-pcr-(reacao-em-cadeia-da-polimerase)/8577). Acesso em: 23 ago. 2013.

CREMONESI, P.; LUZZANA, M.; BRASCA, M. *et al.* Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Molecular and Cellular Probes**, v.19, p. 299-305. 2005.

CRUVINEL, A. R.; SILVEIRA, A. R.; SOARES, J. S. Perfil antimicrobiano de *Staphylococcus aureus* isolado de pacientes hospitalizados em UTI no Distrito Federal. **Cenarium Farmacêutico**, ano 4, n.4, p. 1-11, mai./nov. 2011.

DIAS, R. V. C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.1, n.1, p. 23-27. 2007.

DOMINGUES, P. F.; FERREIRA, B. L. S.; GALDINO, M. C. *et al.* Mastite em bezerra por *Arcanobacterium pyogenes*: relato de caso. **Revista Veterinária e Zootecnia**, v.15, n.2, p. 257-262. 2008.

- EL-SHAROUD, W. **Bacterial physiology: A molecular approach**. Berlin Heidelberg: Springer, 2008. 371p.
- ELVINGER, F.; NATZKE, R. P. Elements of mastitis control. In: VAN HORN, H. H.; WILCOX, C. J. **Large Dairy Herd Management**. Champaign: American Dairy Science Association, p. 440-447. 1992.
- FERNANDES, D. **Diagnóstico laboratorial em mastites bovinas: Sua real importância e aplicação prática**, 2003. Disponível em: [http://www2.pfizersaudeanimal.com.br/bov\\_atualizacoes15.asp](http://www2.pfizersaudeanimal.com.br/bov_atualizacoes15.asp). Acesso em: 22 set. 2013.
- FERREIRA, A. M. S. C.; COSTA, J. N.; PEIXOTO, A. P. C.; BRITO, O. S.; CASSETARI, M. L.; NETO, A. O. C. Suplementação com vitamina E (acetato de DL-alfa-tocoferol) e a ocorrência de mastites em vacas da raça Jersey. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, n.2, p. 71-82, 2007.
- FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2007. 175p.
- FONTANA, V. L. D. S.; GIANNINI, M. J. S. M.; FONTANA, C. A. P.; LEITE, C. Q. F.; STELLA, A. E. Caracterização molecular de Estafilococos isolados de vacas com mastite subclínica e ordenhadores. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.79, n.4, p. 469-476, out./dez. 2012.
- FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; STAMFORD, T. L. M.; RABELO, S. S. A.; SILVA, D. R.; SILVEIRA FILHO, V. M.; SANTOS, F. G. B.; SENA, M. J.; MOTA, R. A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.2, p. 171-177. 2005.
- GIANNECCHINI, R.; CONCHA, C.; RIVERO, R.; DELUCCI, I.; MORENO LÓPEZ, J. Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 43, n.4, p. 221-230. 2002.
- GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A. S. M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 216-222, jan./fev. 2005.
- HARMON, R. J. Fatores que afetam a contagem de células somáticas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba: UFPR, 1998. p. 7-15.
- HOE, F. **Boas práticas no controle de mastite com o uso do CMT**. Disponível em: <http://rehagro.com.br/plus/modulos/noticias/ler.php?cdnoticia=724>. Acesso em: 13 out. 2013.

JUNIOR, M. B. O.; VANDERLEI, D. R.; MORAES, W. S.; BRANDESPIM, D. F.; MOTA, R. A.; OLIVEIRA, A. A. F.; MEDEIROS, E. S.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W. Fatores de risco associados à mastite bovina na microrregião Garanhuns, Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n.5, p. 391-395. 2012.

KEEFE, G. P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: A review. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 38, p. 429-437. 1997.

KLIN, A. L. *Staphylococcus simulans* osteomyelitis of the foot: A case report. **The Foot and Ankle Online Journal**, v. 3, n.1, p. 1-3, jan. 2010.

KLOOS, W. E. Natural populations of the genus *Staphylococcus*. **Annual Review of Microbiology**, v. 34, p. 559-592. 1980.

KLOOS, W. E.; MUSSELWHITE, M. S. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria in human skin. **Applied Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 381-395. 1975.

KUANG, Y.; TANI, K.; SYNNOTT, A. J.; OHSHIMA, K.; HIGUCHI, H.; NAGAHATA, H.; TANJI, Y. Characterization of bacterial population of raw milk from bovine mastitis by culture-independent PCR–DGGE method. **Biochemical Engineering Journal**, v.45, p. 76-81. 2009.

LEIGH, J. A. *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis? **The Veterinary Journal**, v.157, n.3, p. 225-238. 1999.

MAGALHÃES, H. R.; FARO, L. E.; CARDOSO, V. L.; PAZ, C. C. P.; CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F. Influência de fatores de ambiente sobre a contagem de células somáticas e sua relação com perdas na produção de leite de vacas da raça Holandesa. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.2, p.415-421. 2006.

MAHZOUNIEH, M.; ZADFAR, G.; GHAEM MAQAMI, S.; SHAMS, N. Bacteriological and epidemiological aspects of mastitis in arak area dairy herds (Iran). **Acta Veterinaria Scandinavica**. 2003. Disponível em: <http://www.actavetscand.com/content/pdf/1751-0147-44-s1-p92.pdf>. Acesso em: 25 jul. 2013.

MARTINEZ, G.; HAREL, J.; GOTTSCHALK, M. Specific detection by PCR of *Streptococcus agalactiae* in milk. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.65, p. 68-72. 2001.

MARTINS, R. P.; SILVA, J. A. G.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; FILHO, E. S. A. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 1, p. 181-187, jan./mar. 2010.

MOTA, R. A.; MEDEIROS, E. S.; SANTOS, M. V.; JÚNIOR, J. W. P.; MOURA, A. P. B. L.; COUTINHO, L. C. A. Participação dos *Staphylococcus* spp na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de Pernambuco (Brasil). **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.13, n.1, p. 124-130, jan./mar. 2012.

MÜLLER, E. E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. In: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, 2002, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM/CCA/DZO – NUPEL, 2002. p. 206-217.

NETTO, F. G. S.; BRITO, L. G.; FIGUEIRÓ, M. R. **A ordenha da vaca leiteira.** Embrapa: comunicado técnico. 2006. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/710711/1/cot319ordenhadavacaleiteira.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2013.

OLIVEIRA, A. A.; MELO, C. B.; AZEVEDO, H. C. Diagnóstico e determinação microbiológica da mastite em rebanhos bovinos leiteiros nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 226-230, jan./mar. 2009.

OLIVEIRA, U. V.; GALVÃO, G. S.; PAIXÃO, A. R. R.; MUNHOZ, A. D. Ocorrência, etiologia infecciosa e fatores de risco associados à mastite bovina na microrregião Itabuna-Ilhéus, Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.11, n.3, p.630-640, jul/set. 2010.

PADILHA, M. R. F.; FERNANDES, Z. F.; ARCANJO, T. C.; LEAL, N. C.; ALMEIDA, A. M. P. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 167-171, mar./abr. 2001.

PALES, A. P.; SANTOS, K. J. G.; FIGUEIRAS, E. A.; MELO, C. S. A importância da contagem de células somáticas e contagem bacteriana total para a melhoria da qualidade do leite no Brasil. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, Goiás, v.1, n.2, p. 162-173, nov. 2005.

PEREIRA, M. M.; COSTA, F. Q.; OLIVEIRA, A. P.; SERAPIÃO, R. V.; MACHADO, M. A.; VIANA, J. H.; CAMARGO, L. S. A. Quantificação de transcritos maternos em oócitos bovinos submetidos a diferentes condições de maturação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.6, p.1394-1400. 2010.

PEREIRA, N. M.; CLAUS, M. P.; CARNEIRO, E. W.; CARNEIRO, D. M. V. F. **Influência de variações climáticas, escore de eversão de esfíncter de tetos e de sujidade de úbere sobre a ocorrência de mastite em vacas leiteiras, em Araquari - SC.** Disponível em: <http://eventos.ifc.edu.br/micti/wp-content/uploads/sites/5/2014/09/CAZ-28.pdf>. Acesso em: 24 ago. 2013.

PERRIN, B. J.; ERVASTI, J. M. The actin gene family: Function follows isoform. **Cytoskeleton**, p. 630-634. 2010.

PETERSSON-WOLFE, C. S.; CURRIN, J. **Streptococcus dysgalactiae**: A practical summary for controlling mastitis. 2012. Disponível em: [http://pubs.ext.vt.edu/DASC/DASC-5P/DASC-5P\\_pdf.pdf](http://pubs.ext.vt.edu/DASC/DASC-5P/DASC-5P_pdf.pdf). Acesso em: 14 jul. 2013.

PHILPOT, W. N. Qualidade do leite e controle de mastite: passado, presente e futuro. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE, 2., 2002, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: Instituto Fernando Costa, 2002. p. 23-38.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Vencendo a luta contra a mastite**. 1. ed. Campinas: Westfalia, 2002. 192 p.

PHUEKTES, P.; MANSELL, P. D.; BROWNING, G. F. Multiplex Polymerase Chain Reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and Streptococcal causes of bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.84, p. 1140-1148. 2001.

PRESTES, D. S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam - uma revisão. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v.9, n.1, p.118-132. 2002.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Caprinos e Equinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1172p.

RIBEIRO, M. G.; COSTA, E. O.; LEITE, D. S.; FERREIRA, A. J. P.; SILVA, A. S.; DELLA COLLETA, H. H. **Fator necrosante citotóxico em *Escherichia coli* isolada de mastite clínica bovina**. 2002. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-9352002000600015&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-9352002000600015&script=sci_arttext). Acesso em: 24 abr. 2013.

ROCHE, Portugal. **Introdução à PCR**. Disponível em: <http://www.roche.pt/portugal/>. Acesso em: 17 jul. 2013.

ROONEY, R. M.; CRAMER, E. H.; MANTHA, S.; NICHOLS, G.; BARTRAM, J. K.; FARBER, J. M.; BENEMBAREK, P. K. A Review of Outbreaks of foodborne disease associated with passenger ships: Evidence for risk management. **Public Health Reports**, v. 119, p. 427-434, jul./ago. 2004.

SALAM, M. A.; MONDAL, D.; KABIR, M.; EKRAM, A. R. M. S.; HAQUE, R. PCR for diagnosis and assessment of cure in kala-azar patients in Bangladesh. **Acta Tropica**, v. 113, p. 52-55. 2010.

SANTOS, L. L.; PEDROSO, T. F. F.; GUIRRO, E. Perfil etiológico da mastite bovina na bacia leiteira de Santa Izabel do Oeste, Paraná. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n.4, p. 860-866, out./dez. 2010.

SCHLEGELOVÁ, J.; DENDIS, M.; BENEDÍK, J.; BABÁK, V.; RYSÁNEK, D. *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows and humans on a farm differ in coagulase genotype. **Veterinary Microbiology**, v. 92, p. 327-334. 2003.

SHOME, B. R.; MITRA, S. D.; BHUVANA, M.; KRITHIGA, N.; VELU, D.; SHOME, R.; ISLOOR, S.; BARBUDDHE, S. B.; RAHMAN, H. Multiplex PCR assay for species identification of bovine mastitis pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 1349-1356. 2011.

SILVA, E. R.; SILVA, N. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.69, n.4, p.260- 264. 2005.

SILVA, M. A. **Utilização de PCR multiplex para o diagnóstico etiológico da mastite bovina**. Minas Gerais: UFMG, 2008. 32 f. Dissertação (mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2008.

SILVA, P. M. A.; PORFIRIO-PASSOS, G.; PORFIRIO, C. L.; ZANINI, M. S. **Comparação de protocolos de extração do DNA de tecido animal para diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana canina**. 2012. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2012b/ciencias%20biologicas/Comparacao%20de%20protocolos.pdf>. Acesso em: 04 ago. 2013.

SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F.; MOREIRA, E. C.; BRITO, M. A. V. P.; BASTOS, R. R.; Fatores de risco associados à alta contagem de células somáticas do leite do tanque em rebanhos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n.2, p.251-260. 2005.

TRISTÃO, P. **Mastite x qualidade do leite**. Disponível em: <http://www.cpt.com.br/artigos/mastite-qualidade-leite>. Acesso em: 28 ago. 2013.

VELOSO, A. C. A. **Otimização de estratégias de alimentação para a identificação de parâmetros de um modelo de *E. coli*. Utilização do modelo em monitorização e controle**. 2006. Disponível em: [https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/1049/1/Tese\\_vf\\_2007.pdf](https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/1049/1/Tese_vf_2007.pdf). Acesso em: 15 ago. 2013.

VIEIRA, B. C. R.; LORENZONI, L. S.; SOUZA, M. H.; ALFAIATE, M. B.; XAVIER, T. M. T. Etiologia infecciosa associada à mastite subclínica em bovinos de propriedades rurais no município de Alegre-ES. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.6; p. 1154-1172. 2013.

VIEIRA, J.; TEIXEIRA, A. B.; NOGUEIRA, M. F. G. **Especificidade e sensibilidade dos primers para sequência genômica de  $\beta$ -actina na reação em cadeia da polimerase para *Canis lupus familiaris* (Linnaeus, 1758) (Carnivora, Canidae)**. 2006. Disponível em: [http://fio.edu.br/cic/anais/2008\\_vii\\_cic/Artigos/Ciencias\\_Biologicas/023-ESPECI.pdf](http://fio.edu.br/cic/anais/2008_vii_cic/Artigos/Ciencias_Biologicas/023-ESPECI.pdf). Acesso em: 18 set. 2013.

WANGER, A. R.; DUNNY, G. M. Identification of a *Streptococcus agalactiae* protein antigen associated with bovine mastitis isolates. **Infection and Immunity**, v. 55, n.5, p. 1170-1175. 1987.

WATTIAUX, M. A. Mastite: A doença e sua transmissão. **Babcock Institute** - University of Wisconsin-Madison, n. 23, p. 89-92. Disponível em: [http://professor.pucgoias.edu.br/SiteDocente/admin/arquivosUpload/4383/material/23\\_mastite\\_a\\_doenca\\_e\\_sua\\_transmissao.pdf](http://professor.pucgoias.edu.br/SiteDocente/admin/arquivosUpload/4383/material/23_mastite_a_doenca_e_sua_transmissao.pdf). Acesso em: 18 jul. 2013.

WATTIAUX, M. A. Mastite: Prevenção e detecção. **Babcock Institute** - University of Wisconsin-Madison, n. 24, p. 93-96. Disponível em: [https://federated.kb.wisc.edu/images/group226/52752/19-25/de\\_24.pt.pdf](https://federated.kb.wisc.edu/images/group226/52752/19-25/de_24.pt.pdf). Acesso em: 18 jul. 2013.



ZHANG, L.; LI, W. H. Mammalian housekeeping genes evolve more slowly than tissue-specific genes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n.2, p. 236-239. 2004.

ZHAO, F.; SHEN, T.; KAYA, N.; LU, S. G.; CAO, Y.; HERNESS, S. Expression, physiological action, and coexpression patterns of neuropeptide Y in rat taste-bud cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n.31. 2005.

ZOCCAL, R.; ALVES, E. R.; GASQUES, J. G. **Diagnóstico da pecuária de leite nacional: Contribuição para o plano pecuário 2012**. Disponível em: <https://www.bibliotecaagpatea.org.br/zootecnia/bovinocultura/livros/DIAGNOSTICO%20DA%20PECUARIA%20DE%20LEITE%20NACIONAL.pdf>. Acesso em: 15 set. 2013.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE I

### QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

#### IDENTIFICAÇÃO DA PROPRIEDADE

Nome da propriedade: \_\_\_\_\_

Proprietário: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Contato: \_\_\_\_\_

#### DADOS DA PROPRIEDADE

Quantidade de animais na propriedade: \_\_\_\_\_

Produção leiteira:

Produção média/vaca: \_\_\_\_\_

Nº vacas em lactação: \_\_\_\_\_ Nº vacas secas: \_\_\_\_\_

Raça dos animais: \_\_\_\_\_

#### ROTINA DE ORDENHA

➤ Número de ordenhas/dia:

Uma             Duas             Mais

➤ Tipo de ordenha:

Com bezerro             Manual             Mecânica

➤ Ajuste correto do equipamento (caso ordenha mecânica):

Sim             Não

➤ Secagem adequada dos tetos:

Sim             Não

➤ Alimentação:

Antes da ordenha     Durante ordenha     Após ordenha

➤ Testes preliminares:

Caneca telada             CMT             Pré-dipping             Pós-dipping

➤ Presença de outros animais:

Equídeos     Cães     Gatos     Aves     Suínos     Outros \_\_\_\_\_

➤ Condições da cama:

Cama seca             Cama úmida

#### HIGIENE E LIMPEZA

➤ Limpeza adequada do equipamento de ordenha (caso mecânica):

Sim             Não

➤ Uso de sanitizante antes das ordenhas:

Sim             Não            Qual \_\_\_\_\_

➤ Uso de toalha de pano nos tetos:

Sim             Não            Outro: \_\_\_\_\_

➤ Condições higiênicas da sala de ordenha:

Adequada             Suja             Muito suja

## APÊNDICE II

### QUESTIONÁRIO INDIVIDUAL

Nome da propriedade: \_\_\_\_\_

#### DADOS DO ANIMAL

Identificação do animal: \_\_\_\_\_ Idade do animal: \_\_\_\_\_

➤ Número de lactações:

Primeira     Duas     Três     Mais    Quantas \_\_\_\_\_

➤ Estágio da lactação:

Primeiro terço     Segundo terço     Terço final

➤ Número de gestações:

Uma     Duas     Três     Mais    Quantas \_\_\_\_\_

➤ Condição corporal:

Magra     Normal     Gorda

➤ Mastites anteriores:

Sim     Não

➤ Tratamento para mastite:

Efetuado     Não efetuado    Qual? \_\_\_\_\_

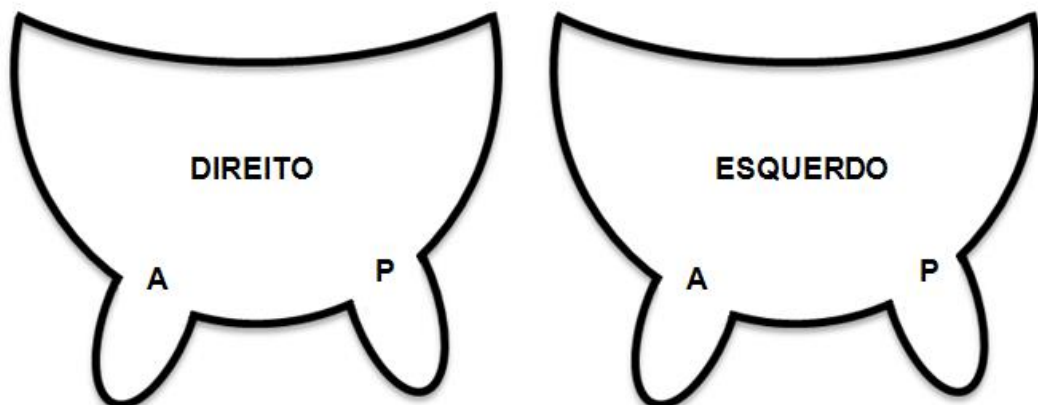
➤ Tipos de tetos:

Longos     Intermediários     Curtos

➤ Conformação do esfíncter:

Normal     Com protrusão     Outros    O quê? \_\_\_\_\_

#### DESENHO ESQUEMÁTICO

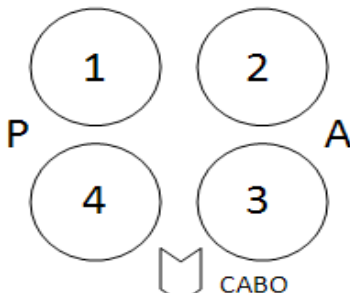


### APÊNDICE III

Nome da Propriedade: \_\_\_\_\_

Proprietário: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Identificação Animal: \_\_\_\_\_ Nº crias: \_\_\_\_\_



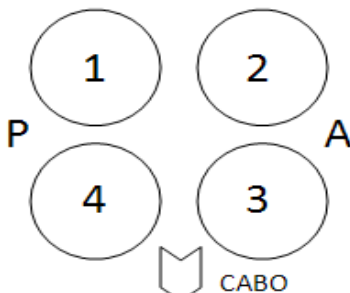
1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

4. \_\_\_\_\_

Identificação Animal: \_\_\_\_\_ Nº crias: \_\_\_\_\_



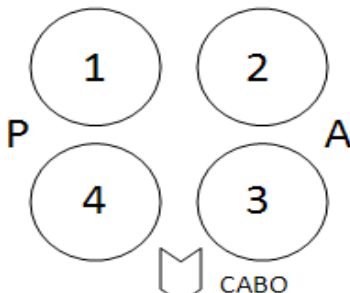
1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

4. \_\_\_\_\_

Identificação Animal: \_\_\_\_\_ Nº crias: \_\_\_\_\_



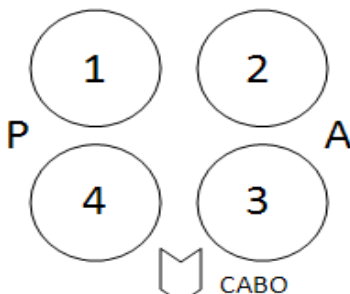
1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

4. \_\_\_\_\_

Identificação Animal: \_\_\_\_\_ Nº crias: \_\_\_\_\_



1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

4. \_\_\_\_\_