

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA, MOLECULAR E
CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS POR CITOMETRIA DE
FLUXO (SOMACOUNT 300[®]) E POR CONTAGEM
MICROSCÓPICA (PRESCOTT E BREED, 1910) DO LEITE
CAPRINO MASTÍTICO**

GUSTAVO PUGLIA MACHADO

Botucatu – SP
Junho/2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA, MOLECULAR E
CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS POR CITOMETRIA DE
FLUXO (SOMACOUNT 300®) E POR CONTAGEM
MICROSCÓPICA (PRESCOTT E BREED, 1910) DO LEITE
CAPRINO MASTÍTICO**

GUSTAVO PUGLIA MACHADO

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária para
obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Helio Langoni

Botucatu – SP
Junho/2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Machado, Gustavo Puglia.

Caracterização microbiológica, molecular e contagem de células somáticas por citometria de fluxo (Somacount 300[®]) e por contagem microscopia (Prescott e Breed, 1910) do leite caprino mastítico / Gustavo Puglia Machado. - Botucatu, 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Helio Langoni

Capes: 50502000

1. Caprino - Criação. 2. Mastite - Epidemiologia. 3. *Staphylococcus aureus*. 4. Leite - Contaminação. 5. Citometria de fluxo.

Palavras-chave: Caprinocultura; Diagnóstico; Epidemiologia; Leite; Mastite.

Nome do Autor: Gustavo Puglia Machado

Título: Caracterização microbiológica, molecular e contagem de células somáticas por citometria de fluxo (Somacount 300®) e por contagem microscópica (Prescott e Breed, 1910) do leite caprino mastítico.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Helio Langoni

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Paulo Francisco Domingues

Membro Titular

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu

Prof. Dr. José Carlos de Figueiredo Pantoja

Membro Titular

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu

Prof. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera

Membro Titular

Departamento de Clínica Médica

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP - São Paulo

Prof. Dr. Nilson Roberti Benites

Membro Titular

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP - São Paulo

Prof. Dra. Simone Baldini Lucheis

Membro Suplente

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu

Prof. Dra. Elizabeth Oliveira da Costa Freitas Guimarães

Membro Suplente

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP - São Paulo

Prof. Dra. Ana Maria Centola Vidal Martins

Membro Suplente

Departamento de Medicina Veterinária

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - USP - Pirassununga

Data da Defesa: 27 de junho de 2013.

EPÍGRAFE

Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.

Cora Coralina

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a *Deus*, por ter segurado em minhas mãos e guiado os meus passos para não cair nas ciladas desta vida. Guardou-me várias vezes da morte e dos caminhos tortuosos. Obrigado Deus, pois a minha vida está nas tuas mãos.

A minha mãe *Ana Maria Puglia Machado*, além de mãe é a minha melhor amiga. Eu te amo e agradeço por toda paciência, ensinamentos e dedicação para tornar-me um homem de caráter. Sei que teve de abrir mão de muitas coisas na vida para poder gerar-me com saúde dentro do seu ventre. A senhora é minha heroína!

Ao meu pai *Aparecido Munhoz Machado*, além de pai é o meu melhor amigo. Eu te amo e tenho muito orgulho do senhor. Agradeço pela paciência que teve comigo, ensinando-me e trabalhando arduamente juntamente com a mamãe para termos algo na vida, não só material, mas principalmente espiritual. O senhor é o meu herói! Somos uma família abençoada por Deus.

Ao meu irmão *Arthur Puglia Machado*, ao qual tenho muito amor e admiração. Você é uma pessoa brilhante e o seu futuro será muito próspero espiritualmente e materialmente. Tenho muito orgulho de ser seu irmão.

A minha avó *Maria Ferreira Puglia*, pelo exemplo de mulher e por ser a minha segunda mãe. Obrigado por tudo e desculpa pelo trabalho que dei durante a infância.

AGRADECIMENTOS

Ao professor *Helio Langoni* ao qual tenho imensa admiração e respeito, pela confiança, paciência, ensinamentos e por ser um excelente educador e líder. Muito obrigado por ter aceitado me orientar e peço desculpas se em algum momento não correspondi as suas expectativas. Agradeço a sua esposa *Aparecida Rossi Langoni* por ter me ajudado e feito o papel de mãe em um momento difícil que passei em Botucatu. A sua família sempre estará presente nas minhas orações.

A toda *equipe* do Núcleo de Pesquisa de Mastites (NUPEMAS), do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada às Zoonoses e ao Laboratório do Serviço de Diagnóstico de Zoonoses (SDZ).

Ao professor *José Carlos de Figueiredo Pantoja* pela atenção dispensada na realização das análises estatísticas e pela contribuição com inúmeras sugestões que enriqueceram este trabalho. Admiro sua dedicação no ensino da estatística.

Aos amigos da pós-graduação: *Rodrigo Costa da Silva, Felipe de Freitas Guimarães, Lucilene Granuzzio Camossi, Carla Janeiro Coiro, João Marcelo Azevedo de Paula Antunes, Susan Dora Allendorf, Marina Geas Pereira, Felipe Fornazarí, Ubirajara Leoncy de Lavor, Daniela Barbosa da Silva, Marcella Zampoli Troncarelli, Pâmela Merlo Marson, Marcela de Pinho Manzi, Laís Moraes Paiz, Diego Borin Nóbrega e Guido Gomes Wanderley.*

Ao meu amigo *Rodrigo Costa da Silva*, obrigado pela ajuda na realização da multiplex-PCR. Agradeço por todo auxílio na minha tese de doutorado. Você é um grande amigo e uma das pessoas mais determinadas e inteligentes que já conheci.

Ao meu amigo *Felipe de Freitas Guimarães*, amigo fiel e verdadeiro, obrigado por toda ajuda nas colheitas das amostras, nos cultivos microbiológicos e nas provas bioquímicas. Aprendi muito com você sobre mastite e qualidade do leite.

A minha amiga *Lucilene Granuzzio Camossi*, amiga para todas as horas, obrigado por toda ajuda na minha tese de doutorado.

Aos funcionários e bolsistas de treinamento técnico do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública: *Benedito Donizete Menozzi, Adilson Aparecido Romeiro, Roberto Martins, Adriana Cristina Pavan Vieira, Adriana de Fátima David, José Wanderlei Furlin, Rita Souza Lima, Luiz Marcos Frediani Portela, Jéssica Almeida Soares e Anelise Salina*.

A todos os professores do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública – DHVSP, em especial os professores: *Paulo Francisco Domínguez, Márcio Garcia Ribeiro, Antonio Carlos Paes e Jane Megid*.

A *Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Botucatu*, por toda ajuda com os seus funcionários e instalações.

A todos os meus professores da graduação em medicina veterinária do Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP, muito obrigado por todo carinho e aprendizado. Em especial: *Tatiana Morosini de Andrade Cruvinel, Ana Sílvia Dagnone, Rodrigo Stort Pereira, Daniel Bartoli de Sousa, Ana Maria Centola Vidal Martins, Antonio Carlos Cunha Lacreta Júnior, Estevam Guilherme Lux Hoppe, Alexandre Schmaedecke, Carla Daniela Dan de Nardo, Karina Ferreira de Castro, Raphaella Barbosa Meirelles Bartoli, João Morelli Júnior,*

Luís Paulo Martins Filho, Alfredo Maia Filho, Everton Regonato e Aline Mesquita Galvão Moura.

A *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)* pela concessão de bolsa de doutorado (2010/17254-7) e de auxílio à pesquisa (2011/07107-0).

Aos *Produtores rurais*, por permitirem o acesso e colheita das amostras de leite nas propriedades.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos patógenos isolados de casos de mastite caprina no Brasil.	12
Tabela 2. Prevalência de mastite caprina subclínica e clínica no Brasil.	18
Tabela 3. Interpretação dos escores do California Mastitis Test (CMT) em leite caprino.....	23
Tabela 4. Número de propriedades rurais de acordo com os municípios, número total de cabras em lactação e número de cabras amostradas. Botucatu, SP, 2013.....	37
Tabela 5. Primers utilizados para a amplificação do DNA de <i>S. aureus</i> , <i>S. agalactiae</i> e <i>E. coli</i> em amostras de leite caprino pela técnica de multiplex-PCR. Botucatu, SP, 2013.....	49
Tabela 6. Resumo das principais características de manejo do rebanho, produção e instalações das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013....	54
Tabela 7. Resumo das principais características de manejo do rebanho, produção e instalações das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013....	55
Tabela 8. Resumo das principais características de manejo do rebanho, produção e instalações das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013....	56
Tabela 9. Resultados do CMT das metades mamárias e dos tanques de expansão das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.....	57
Tabela 10. Média, Mediana e Desvio Padrão da CCS automática e microscópica por escore do CMT das amostras de leite das metades mamárias das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.	58
Tabela 11. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo do CMT das metades mamárias tendo como referência o cultivo microbiano das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013	59
Tabela 12. Prevalência de mastite subclínica com base na CCS automática e microscópica nas amostras de leite compostas das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.	59

Tabela 13. Prevalência de mastite subclínica segundo a CCS automática das amostras de leite compostas das cabras e das metades mamárias das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.	60
Tabela 14. Prevalência de mastite subclínica segundo a CCS microscópica das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013	61
Tabela 15. CCS automática, microscópica, CBT e CMT das amostras de leite dos tanques de expansão das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.	62
Tabela 16. Prevalência de mastite subclínica pela CCS automática em amostras de leite compostas em nível de cabra e CC automática do tanque de expansão das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.	63
Tabela 17. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo da CCS automática das metades mamárias das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013	64
Tabela 18. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo da CCS microscópica das metades mamárias das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013	65
Tabela 19. Prevalência de mastite caprina pelo cultivo microbiano das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013	68
Tabela 20. Frequência dos patógenos isolados nas metades mamárias das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013	69
Tabela 21. Distribuição dos patógenos isolados no cultivo microbiano das amostras de leite das metades mamárias das 10 propriedades. Botucatu, SP, 2013.....	71
Tabela 22. Média, Mediana e Desvio Padrão da CCS automática por patógenos isolados das amostras de leite das metades mamárias das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013	73
Tabela 23. Média da CCS automática das metades mamárias por grupo de patógenos isolados das amostras de leite das metades mamárias das 10 propriedades estudadas, Botucatu, SP, 2013.	74

Tabela 24. Distribuição de <i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus</i> spp. e Enterobacteriaceae isolados no cultivo microbiano e prevalência pela multiplex-PCR de <i>S. aureus</i> , <i>S. agalactiae</i> e <i>E. coli</i> nas metades mamárias das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013..	83
Tabela 25. Prevalência de <i>S. aureus</i> , <i>S. agalactiae</i> e <i>E. coli</i> no tanque de expansão pela multiplex-PCR das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.....	84
Tabela 26. Análise univariada dos fatores de risco para mastite subclínica nas 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013..	85
Tabela 27. Razão das chances (<i>Odds Ratio</i>) para mastite subclínica ajustadas por propriedade. Botucatu, SP, 2013.	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição e coordenadas geográficas das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.....	38
Figura 2. Contagem automática de células somáticas.	41
Figura 3. Contagem microscópica de células somáticas.....	42
Figura 4. Elementos celulares do leite usados como referência para a contagem microscópica das células somáticas no leite caprino mastítico.....	43
Figura 5. Limiar de detecção (10^8 a 10^0) utilizando-se isoladamente os primers SAU1 e SAU2, SAGA1 e SAGA2, Ecol1 e Ecol2 a para a detecção de <i>S. aureus</i> , <i>S. agalactiae</i> e <i>E. coli</i> , respectivamente, em água, de acordo com o protocolo de Chótar et al. (2006). M: padrão de peso molecular (100 pares de bases).....	75
Figura 6. Limiar de detecção (10^9 a 10^0) utilizando-se isoladamente os primers SAU1 e SAU2, SAGA1 e SAGA2, Ecol1 e Ecol2 a para a detecção de <i>S. aureus</i> , <i>S. agalactiae</i> e <i>E. coli</i> , respectivamente, em amostra de leite caprino, de acordo com o protocolo de Chótar et al. (2006). M: padrão de peso molecular (100 pares de bases)..	76
Figura 7. Gradiente de temperatura utilizando-se somente os primers STAUR4 e STAUR6 (10 μ M) para a detecção de <i>S. aureus</i> em amostra de leite caprino. M: padrão de peso molecular (100 pares de bases).....	77
Figura 8. Gradiente de temperatura utilizando-se somente os primers SIP1 e SIP2 (10 μ M) para a detecção de <i>S. agalactiae</i> . M: padrão de peso molecular (100 pares de bases).....	77
Figura 9. Gradiente de temperatura utilizando-se somente os primers Ecol1 e Ecol2 (10 μ M) para a detecção de <i>E. coli</i> em amostra de leite caprino. M: padrão de peso molecular (100 pares de bases)..	78
Figura 10. Gradiente de temperatura utilizando-se os primers STAUR4 e STAUR6, SIP1 e SIP2, e Ecol1 e Ecol2 (10 μ M) para a detecção em multiplex-PCR de <i>S. aureus</i> , <i>S. agalactiae</i> e <i>E. coli</i> , respectivamente,	

em amostra de leite caprino. M: padrão de peso molecular (100 pares de bases)..... 78

Figura 11. Limiar de detecção (10^7 a 10^0) utilizando-se isoladamente os primers STAUR4 e STAUR6, SIP3 e SIP4, Ecol1 e Ecol2 em concentrações diferentes (10 μ M, de acordo com Straub et al., 1999; 25 μ M, de acordo com Chótar et al., 2006), em amostra de leite caprino, utilizando-se o protocolo de PCR descrito por Straub et al (1999). M: padrão de peso molecular (100 pares de bases).. 80

Figura 12. Multiplex-PCR com os primers STAUR4 e STAUR6, SIP3 e SIP4, Ecol1 e Ecol2 isolados e em conjunto, utilizando-se diferentes concentrações de primers: 10 μ M, de acordo com Straub et al. (1999); 25 μ M, de acordo com Chótar et al. (2006), em amostra de leite caprino. M: padrão de peso molecular (100 pares de bases).. 81

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Sensibilidade e especificidade para diferentes pontos de corte da CCS automática para diagnóstico de infecção intramamária..... 64
- Gráfico 2.** Sensibilidade e especificidade para diferentes pontos de corte da CCS automática para diagnóstico de infecção intramamária..... 65
- Gráfico 3.** Regressão linear da CCS automática e microscópica. A linha sólida central indica concordância perfeita entre as variáveis. 66

LISTA DE ABREVIATURAS

µL	microlitros
ATCC	American type culture collection
BHI	Infusão de cérebro coração
bp	Pares de base
CAEV	Artrite encefalite caprina viral
CBT	Contagem bacteriana total
CCS	Contagem de células somáticas
CMT	California Mastitis Test
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
ECN	Estafilococos coagulase negativo
ECP	Estafilococos coagulase positivo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAO	Food and agriculture organization
FDA	Food and drug administration
H₂S	Ácido sulfídrico
L-TD	L-triptofano-desaminase
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitros
NaCl	Cloreto de sódio
NAGase	N-acetil-β-D-glucosaminidase
nm	Nanômetros
PBS	Solução salina tamponada
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
TBE	Tris borato EDTA
UFC	Unidade formadora de colônia
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	3
ABSTRACT.....	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1 Etiologia	11
2.2 Epidemiologia.....	16
2.3 Patogenia.....	20
2.4 Sinais clínicos	21
2.5 Diagnóstico	21
2.6 Impacto econômico	27
2.7 Potencial zoonótico e riscos para a saúde pública.....	28
2.8 Prevenção e controle	30
3. OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo geral.....	35
3.2 Objetivo específico.....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 População e amostragem	37
4.2 Colheitas das amostras.....	38
4.3 Variáveis estudadas.....	39
4.4 California Mastitis Test (CMT).....	39
4.5 Contagem eletrônica e microscópica de células somáticas	40
4.6 Análise microbiológica e caracterização bioquímica	44
4.6.1 Caracterização de <i>S. aureus</i>	45
4.6.2 Caracterização de <i>S. intermedius</i>	45
4.6.3 Caracterização de <i>S. hyicus</i>	45
4.6.4 Caracterização de <i>S. agalactiae</i>	46
4.6.5 Caracterização de <i>E. coli</i>	46
4.7 Técnicas de biologia molecular para a pesquisa de <i>S. aureus</i> , <i>S. agalactiae</i> e <i>E. coli</i>	46
4.7.1 Extração de DNA	47
4.7.2 Determinação do limiar de detecção.....	47

4.7.3 Reação em cadeia pela polimerase (multiplex-PCR).....	47
4.8 Análise estatística	50
5. RESULTADOS.....	51
5.1 Análise descritiva das propriedades.....	52
5.2 California Mastitis Test (CMT)	57
5.3 Contagem eletrônica e microscópica de células somáticas	59
5.4 Lactocultura.....	66
5.5 Micro-organismos isolados.....	69
5.6 Multiplex-PCR	75
5.7 Fatores de Risco	85
6. DISCUSSÃO	89
6.1 California Mastitis Test (CMT).....	90
6.2 Contagem eletrônica e microscópica de células somáticas	92
6.3 Lactocultura.....	95
6.4 Micro-organismos isolados.....	97
6.5 Multiplex-PCR	99
6.6 Fatores de Risco	102
7. CONCLUSÕES.....	107
8. REFERÊNCIAS.....	110
9. TRABALHOS CIENTÍFICOS	130
9.1 Artigo 1.....	131
9.2 Artigo 2.....	152
9.3 Artigo 3.....	165
10. ANEXOS	175
10.1 Atestado de aprovação na comissão de ética no uso de animais (CEUA) da FMVZ-UNESP-Botucatu	176
10.2 Questionário epidemiológico.....	177
10.3 Molde para preparo das lâminas de microscopia para realização da técnica de Prescott e Breed (1910)	180
10.4 Esquematização da técnica de Prescott e Breed (1910) e coloração das lâminas de microscopia segundo Zeng (1996).....	181
10.5 Normas para publicação	182
10.5.1 Small Ruminant Research	182
10.5.2 Pesquisa Veterinária Brasileira.....	197

MACHADO, G.P. **Caracterização microbiológica, molecular e contagem de células somáticas por citometria de fluxo (Somacount 300®) e por contagem microscópica (Prescott e Breed, 1910) do leite caprino mastítico.** Botucatu, 2013. 201p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Foram realizadas caracterizações microbiológicas dos estafilococos coagulase-positivo - ECP (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus hyicus*), a pesquisa de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli* pela multiplex-PCR, California Mastitis Test (CMT), a contagem de células somáticas (CCS) automática pelo Somacount 300® calibrado para o leite bovino e CCS microscópica padronizada por Prescott e Breed (1910) em amostras de leite de 257 cabras, 513 metades mamárias e 10 tanques de expansão, além da aplicação de questionário epidemiológico nas 10 propriedades estudadas do estado de São Paulo. A prevalência de mastite subclínica em nível de cabra pela lactocultura foi de 43,6% e de mastite clínica 5,84%. Das 178 metades mamárias positivas na lactocultura, os patógenos mais prevalentes foram: Estafilococos coagulase-negativo - ECN (70%), *S. aureus* (13,5%), *S. intermedius* (7,9%) e Enterobacteriaceae (4%). Nenhuma das amostras mostrou-se negativa ao CMT, sendo a distribuição dos escores nas metades mamárias: 1+ (42,69%), 2+ (29,63%) e 3+ (27,68%). As prevalências dos patógenos na multiplex-PCR das metades mamárias foram: *S. aureus* (9,7%), *S. agalactiae* (5,5%) e *E. coli* (16,6%) e nos tanques de expansão: *S. aureus* (60%), *S. agalactiae* (10%) e *E. coli* (40%). Os resultados encontrados indicam que o CMT apresenta baixa sensibilidade e especificidade nos escores 2+ e 3+ para o diagnóstico de mastite subclínica. O Somacount 300® calibrado para o leite bovino superestima em 2,1 vezes a CCS microscópica, sendo que ambas não apresentaram nenhum ponto de corte eficiente para maximização simultânea da sensibilidade e especificidade. A multiplex-PCR apresenta boa acurácia para detecção de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* no leite caprino mastítico. Houve algumas diferenças estatísticas significantes nas análises univariadas dos fatores de risco para mastite subclínica, no entanto, quando a análise foi ajustada por propriedade, as associações desapareceram pelo fato das propriedades serem um fator de confusão para análise dos dados.

Palavras-chave: Caprinos, mastite, estafilococos coagula-positivo, multiplex-PCR, CMT, CCS automático e microscópico.

MACHADO, G.P. **Microbiological and molecular characterization, and somatic cell count by flow cytometry (Somacount 300®) and microscopic count (Prescott and Breed, 1910) from mastitic caprine milk.** Botucatu, 2013. **201p.** Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Microbiological characterizations of the coagulase-positive staphylococci - CPS (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus hyicus*), the research of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli* by multiplex-PCR, California Mastitis Test (CMT), the automatic somatic cell count (SCC) by Somacount 300® equipment calibrated for bovine milk and the microscopic SCC standardized by Prescott and Breed (1910) in milk samples from 257 goats, 513 half-udders and 10 bulk tanks were carried out beyond the application of the epidemiological questionnaire in 10 properties studied of São Paulo State. The prevalence of subclinical and clinical mastitis by microbiological culture was 43.6% and 5.84% respectively. 178 half-udders were positive by microbiological culture, and coagulase-negative staphylococci - CNS (70%), *S. aureus* (13.5%), *S. intermedius* (7.9%) e Enterobacteriaceae (4%) were the most prevalent pathogens. No sample was negative to CMT. The distribution of scores CMT in half-udders were: 1+ (42.69%), 2+ (29.63%) and 3+ (27.68%). The prevalence of pathogens in multiplex-PCR in half-udders were: *S. aureus* (9.7%), *S. agalactiae* (5.5%) and *E. coli* (16.6%) and in bulk tanks: *S. aureus* (60%), *S. agalactiae* (10%) and *E. coli* (40%). The results indicate that the CMT scores 2+ and 3+ showed low sensitivity and specificity for the diagnosis of subclinical mastitis. The Somacount 300® calibrated to bovine milk overestimated the microscopic SCC in 2.1 fold, being that both showed no efficient cut-off point for simultaneous maximization of the sensitivity and the specificity. The multiplex-PCR presented good accuracy for the detection of *S. aureus*, *S. agalactiae* and *E. coli* in the mastitic caprine milk. There were some significant differences in the univariate analysis of risk factors for subclinical mastitis, however, when the analysis was adjusted for property, the associations disappeared because of the properties are a confounding factor for data analysis.

Keywords: Goats, mastitis, coagulase-positive staphylococci, multiplex-PCR, CMT, automatic and microscopic SCC.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, mais de 95% dos produtos lácteos consumidos no mundo foram derivados do leite bovino, exceção para os países do Mediterrâneo, onde os lácteos caprinos formam parte da herança cultural (MICHAELIDOU, 2008). Os lácteos caprinos são parte vital da economia de muitos países, especialmente no Oriente Médio e Mediterrâneo, possuindo atividades bem organizadas na França, Itália, Espanha e Grécia (PARK e HAENLEIN, 2006), sendo consumido por mais da metade da população mundial (VILLALOBOS, 2005).

Em 2009 a produção de leite caprino no Brasil foi 143.768 toneladas, quando o país ocupou o 20º lugar mundial (FAO, 2009). A região Nordeste concentra 94% do rebanho caprino brasileiro, sendo grande parte do leite produzido em pequena escala e, muitas vezes, processado, em condições artesanais, no próprio capril, onde é pasteurizado e/ou congelado para facilitar a distribuição e garantir o abastecimento na entressafra (ANDRADE et al., 2008). A industrialização do leite de cabra no Brasil ainda é restrita por várias razões: pequena produção, hábito alimentar da população, desconhecimento dos valores nutricionais, preconceito e alto preço comparado ao leite bovino (RESENDE e TOSETTO, 2004).

A importância do leite de cabra na alimentação humana não reside apenas no valor biológico de seus nutrientes, mas também em suas características de hipoalergenicidade, o que o torna um alimento diferenciado. Segundo Langoni et al. (2006), com o aprimoramento da criação de caprinos e o aumento na produção leiteira, tem surgido uma maior preocupação com a qualidade do leite, o que requer o controle de doenças que possam alterar suas características, sendo a principal delas a mastite.

A mastite é uma enfermidade complexa, resultante da interação entre o agente, animal e o ambiente, associada à presença de micro-organismos na maioria dos casos. Constitui-se em importante problema de saúde animal e de saúde pública, com grande repercussão econômica em praticamente todos os países do mundo (SMITH e SHERMAN, 2009).

A mastite pode ser classificada como clínica ou subclínica. Os animais com mastite clínica podem apresentar edema, aumento da temperatura,

endurecimento e dor na glândula mamária, além da presença de grumos, pus ou outras alterações nas características físicas do leite, bem como alterações sistêmicas podendo ocorrer perda da glândula mamária e até a morte do animal. O diagnóstico é realizado pela prova de Tamis, com a visualização de alterações macroscópicas do leite (FONSECA e SANTOS, 2001; RIBEIRO et al., 2003). Na forma subclínica não ocorrem alterações macroscópicas e sim alterações na composição do leite, não evidenciando sinais de inflamação nas metades mamárias. A mastite subclínica apresenta resultado positivo ao CMT ou outros testes indicativos, confirmando-se pelo isolamento microbiano. Ela pode ser detectada pela contagem direta ou indireta de células somáticas no leite (CULLOR et al., 1994; RIBEIRO et al., 2003).

Os agentes etiológicos identificados na sua maioria, são semelhantes aos encontrados na mastite bovina, como estafilococos coagulase-positivos (ECP), estafilococos coagulase-negativos (ECN), *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Corynebacterium* spp., *Pseudomonas* sp. e algumas espécies de fungos menos frequentes (LANGONI et al., 1998; CONTRERAS et al., 2007).

As mastites caprinas relacionadas à *S. aureus* são as de maior importância para saúde animal e pública, sendo na maioria das vezes atribuídas à higiene inadequada durante a ordenha, pela sucção excessiva do cabrito ou pelo contato com pastagens contaminadas, podendo levar a quadros de mastites gangrenosas, devido às toxinas específicas responsáveis por lesões graves na mama, como a α -toxina que produz necrose dos alvéolos (ANDERSON et al., 2004).

Considerando as fontes de infecção e vias de transmissão, os agentes causadores de mastite foram convencionalmente classificados como contagiosos e ambientais. Os contagiosos estão presentes na microbiota da pele das metades mamárias, nas mucosas e conjuntivas dos animais, bem como nos equipamentos de ordenha, em panos utilizados na limpeza e secagem dos tetos e nas próprias mãos dos ordenhadores. As moscas podem participar como vetores mecânicos de agentes contagiosos, sendo importantes em propriedades com elevada infestação, contribuindo na transmissão dos micro-organismos às cabras no pré-parto (BRADLEY, 2002).

As infecções pelos agentes contagiosos ocorrem predominantemente durante a ordenha, e os micro-organismos, de forma oportunista, invadem a glândula mamária, causando resposta inflamatória imediata. Dentre os principais patógenos contagiosos destacam-se *S. aureus* e *S. agalactiae*, que ocorrem com elevada prevalência e geralmente causam mastite subclínica, de longa duração e com elevada CCS (HORTET e SEEGER, 1998).

O grupo de agentes ambientais estão presentes na matéria orgânica como solo e fezes, na cama dos animais, na água e no ar. A infecção ocorre principalmente no período entre-ordenhas, mas pode ocorrer também durante a ordenha. Fungos, leveduras, algas e as enterobactérias são os principais patógenos ambientais, tendo especial importância neste grupo *E. coli*. Apesar da menor prevalência das mastites causadas por estes agentes, geralmente causam quadros clínicos severos, superagudos, podendo levar os animais a óbito (RADOSTITS et al., 2007).

A prevenção e o controle são pontos de partida para adoção de medidas sanitárias dentro da propriedade. Essas medidas aplicadas simultaneamente devem reduzir as taxas de infecções subclínicas e clínicas no rebanho, estando relacionadas aos aspectos higiênicos dos animais, da ordenha e das pessoas envolvidas na ordenha. A higiene da ordenha é um dos pontos chave para o êxito de um programa de controle de mastite (LANGONI, 2007).

A detecção precoce dos animais com mastite, o tratamento dos casos clínicos, a ordenha iniciando a partir dos animais sadios colocando para o final aqueles que estejam em tratamento, a higiene e desinfecção durante todo processo de ordenha, com a utilização de pré e pós-dipping, a manutenção em níveis adequados dos parâmetros de vácuo e pulso das ordenhadeiras e o tratamento a secagem são as medidas mais importantes para a prevenção e controle das mastites (DOMINGUES e LANGONI, 2001), além do descarte de animais com mastites crônicas e recidivantes.

O bem estar animal e a qualidade do leite estão diretamente associados à saúde, nutrição e manejo do rebanho, bem como à capacitação da mão-de-obra, manejo adequado das instalações e equipamentos utilizados durante a ordenha e transporte até a indústria (LANGONI et al., 2012).

Tendo em vista a importância da caprinocultura para a região Sudeste do Brasil, as perdas econômicas ocasionadas pela mastite e a escassez de

informações sobre essa doença em caprinos, objetivou-se nesse trabalho a realização do diagnóstico microbiológico e caracterização bioquímica dos ECP (*S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*) no leite caprino mastítico, a comparação entre os métodos de CCS automático (Somacount 300[®]) calibrado para o leite bovino com a CCS microscópica padronizada por Prescott e Breed (1910), estabelecendo correlação com os resultados obtidos no CMT, e determinando a ocorrência de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* pela multiplex-PCR nas amostras de leite das metades mamárias e do tanque de expansão, além da análise dos fatores de risco para ocorrência de mastite subclínica, associando os resultados dos exames laboratoriais com as variáveis obtidas pela aplicação de questionário epidemiológico.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Etiologia

A etiologia da mastite é complexa e multivariada (tóxica, traumática, alérgica, metabólica ou infecciosa) tornando fundamental a identificação do agente causal, tanto para prevenção e controle, quanto para o monitoramento dos rebanhos (ANDERSON et al., 2004).

Os patógenos identificados nas mastites caprinas são: *Staphylococcus* spp. (*S. aureus*, *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. simulans*, *S. equorum*, *S. capitis*, *S. lentus*, *S. gallinarum* e *S. xylosus* (VERNOZY et al., 1996; MARIANO, 2000; FERNANDES, 2002; FOSCHINO et al., 2002; LANGONI et al., 2006; PEIXOTO et al., 2012), *Streptococcus* spp. (*S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *S. zooepidemicus*, *S. bovis* e, mais recentemente, *S. equi* subespécie *ruminantium* (SANTOS et al., 2007; ALMEIDA et al., 2009) e com menor frequência *Mycoplasma agalactiae*, *M. mycoides* subsp. *mycoides*, *M. capricolum*, *M. putrefaciens* e *M. mycoides* subsp. *capri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Brucella* spp., *Mycobacterium* spp., *Yersinia pseudotuberculosis*, *Coxiella burnetti*, *Mannheimia haemolytica*, *Corynebacterium* spp., *Yersinia pseudotuberculosis* e *Nocardia* spp., bem como os fungos e leveduras: *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula glutinis* e *Geotrichum candidum* (ANDERSON et al., 2004; AZEVEDO et al., 2006; RADOSTITS et al., 2007; CONTRERAS et al., 2007; NICHOLAS et al., 2008), além de algas (SMITH e SHERMAN, 2009).

Os principais patógenos isolados dos casos de mastite em caprinos no Brasil pertencem ao gênero *Staphylococcus* spp. (MOTA et al., 2000; SILVA et al., 2004; LANGONI et al., 2006; ALMEIDA, 2009; NEVES et al., 2010; PEIXOTO et al., 2012) (**Tabela 1**). Uma das principais características da mastite diz respeito à diversidade de agentes com potencial patogênico. Dentre estes, destacam-se os ECN, que para outras espécies animais são considerados patógenos menores. Têm-se ainda as bactérias dos gêneros *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Mannheimia* e algumas

espécies de fungos, porém menos frequentes (BERGONIER et al., 2003; CONTRERAS et al., 2004; CONTRERAS et al., 2007). Alguns estudos com infecção experimental vêm demonstrando o potencial patogênico de alguns micro-organismos relevantes, a exemplo do *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que é responsável pelo desencadeamento de quadros agudos, acompanhados de alterações no leucograma (PINHEIRO JUNIOR et al., 2006).

TABELA 1. Distribuição dos patógenos isolados de casos de mastite caprina no Brasil.

Patógenos	Mota et al. (2000)	Silva et al. (2004)	Langoni et al. (2006)	Almeida (2009)	Neves et al. (2010)	Peixoto et al. (2012)
<i>Staphylococcus</i> spp.	76,3	10,0	-	73,3	-	26,27
<i>S. aureus</i>	1,7	-	11,4	-	16,66	16,1
<i>S. intermedius</i>	-	-	-	-	-	11,2
<i>S. hyicus</i>	-	-	-	-	-	6,78
ECN ^a	-	60,0	-	-	83,33	-
<i>S. warneri</i>	-	12,8	-	-	-	-
<i>S. caprae</i>	-	10,0	-	-	-	9,32
<i>S. sciuri</i>	-	7,1	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	-	40,0	50,0	-	-	5,08
<i>S. simulans</i>	-	-	-	-	-	2,54
<i>Streptococcus</i> spp.	-	-	-	5,9	-	2,74
<i>S. agalactiae</i>	-	-	13,6	-	-	-
<i>Micrococcus</i> spp.	1,7	-	-	-	-	12,71
<i>Corynebacterium</i> spp.	-	-	-	-	-	2,54
<i>Corynebacterium bovis</i>	3,4	-	8,6	-	-	-
<i>Bacillus</i> spp.	-	-	2,8	-	-	-
Enterobactérias	-	-	-	-	-	5,08
<i>Pasteurella multocida</i>	-	-	4,6	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> spp.	-	-	-	2,9	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	1,8	1,9	-	-
<i>Klebsiella</i> spp.	-	-	-	1,9	-	-
<i>Serratia</i> spp.	1,7	-	-	-	-	-

^aECN: *Staphylococcus* coagulase negativa.

Fonte: Adaptado de Peixoto et al. (2010).

Segundo estudos realizados por Bergonier et al. (2003), *S. aureus* é o agente de maior prevalência na mastite clínica caprina. Em ordem decrescente de frequência aparecem os ECN, que são patógenos maiores em pequenos ruminantes, *Streptococcus* spp., Enterobactérias, *Arcanobacterium pyogenes* (atualmente *Trueperella pyogenes*), *Corynebacterium* spp., *Pasteurella* spp. e *Pseudomonas* spp. Em relação às mastites subclínicas, Bergonier et al. (2003) relatam que os principais agentes isolados são: ECN, *S. aureus*, bacilos Gram-negativos (BGN), *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp.

Dentre as espécies de ECN prevalentes, *S. caprae* e *S. epidermidis* apresentam maior frequência de isolamento em cabras. Segundo Bergonier et al. (2003), estudos demonstram maior ocorrência de *S. caprae*, no entanto, *S. epidermidis* está associado, na maioria das vezes, com elevada CCS, não sendo o mesmo fato observado para o *S. caprae*.

As espécies de ECP prevalentes na espécie caprina são: *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*, estando inclusive associados a surtos de intoxicação alimentar (EUZÉBY, 1997; KLOOS e BANNERMAN, 1999).

Staphylococcus aureus é o agente infeccioso mais patogênico para a glândula mamária da cabra, tanto sob a forma de infecção subclínica como clínica, sendo evidente sua importância para saúde pública. As toxinas produzidas provocam trombose vascular, gangrena e desprendimento de tecidos subjacentes (ANDERSON et al., 2004). Silva et al. (2005) relataram que *S. aureus* produz grande variedade de hemolisinas (alfa, beta e delta), as quais contribuem para invasão bacteriana e inibição da resposta imune do hospedeiro. Della Libera et al. (2007) observaram que o mesmo hospedeiro pode apresentar quadros diferentes em cada teto. Os autores relataram um quadro de mastite por *S. aureus* em uma cabra nulípara com os dois tetos infectados, sendo que o teto esquerdo evoluiu para mastite catarral aguda e a direita para mastite gangrenosa, com desprendimento do mesmo.

Sousa et al. (2007) caracterizaram *S. aureus* isolados de casos de mastite subclínica nas espécies bovina, bubalina, caprina e ovina de diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro. Este estudo demonstrou que apenas um clone foi responsável pela maioria dos casos de mastite subclínica em várias regiões do estado do Rio de Janeiro. Além disso, observou-se que este

clone não representa hospedeiros específicos, tendo a capacidade de colonizar e causar infecção nas diferentes espécies animais.

Estudos visando a detecção de genes codificadores de enterotoxinas A, B e C em isolados de *S. aureus* obtidos de amostras de leite de rebanhos caprino e bovino no Brasil, mostraram que os isolados provenientes de leite de cabra com mastite, tiveram alto potencial enteropatogênico, sendo superior àqueles obtidos de bovinos, além disso, sugere-se que *S. aureus* produtores de enterotoxinas tipo C sejam os principais envolvidos na patogenia da mastite caprina (SILVA et al., 2005).

Streptococcus spp. podem provocar mastite individual ou na forma de surto, sendo de maior ocorrência nas cabras: *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. agalactiae* e *S. zooepidemicus*. As espécies *S. dysgalactiae* e *S. uberis* são causas mais comuns de mastite, disseminando-se em decorrência de higienização inadequada das ordenhadeiras ou do ordenhador. Esporadicamente, o *S. agalactiae* causa mastite em cabras. A infecção por esse patógeno pode resultar em fibrose e queda na produção de leite, porém frequentemente não está associado com sinais sistêmicos. A formação de abscessos nos tetos, mastite crônica e atrofia pode ser observada nos casos de mastite por *S. zooepidemicus* (ANDERSON et al., 2004).

As mastites por coliformes parecem ser menos comuns em pequenos ruminantes que em bovinos. As principais bactérias causadoras de mastites por coliformes são *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp.. A ocorrência é mais comum no período pós-parto e está associada com enfermidade sistêmica grave, podendo manifestar-se como infecção persistente ou transitória (SMITH e SHERMAN, 2009).

Arcanobacterium pyogenes, atualmente denominado *Trueperella pyogenes* (YASSIN et al., 2011) pode causar infecção em animais não lactantes. Desenvolvimento e ruptura de abscessos na glândula mamária são típicos dessa infecção. O leite torna-se purulento e apresenta odor fétido. Embora susceptível a vários antibióticos, a taxa de cura é baixa, devido à formação de abscessos no tecido mamário. Por conseguinte, esses animais atuam como fontes de infecção no rebanho. Os animais acometidos devem ser descartados para evitar a contínua contaminação do material de ordenha e/ou infecção de outros animais no rebanho (BERGONIER et al., 2003). Garino

Junior et al. (2012) relataram no Brasil a ocorrência de mastite caprina por *A. pyogenes* no estado da Paraíba, sendo o diagnóstico confirmado pelos sinais clínicos e cultivo microbiológico. No Brasil, há poucos estudos e relatos de casos de mastite em pequenos ruminantes por esse patógeno. Este fato pode ser devido a sua baixa incidência, ou mesmo a doença pode estar sendo subdiagnosticada.

O gênero *Pseudomonas* spp. também têm sido associado com a mastite caprina, geralmente relacionado a falta de higiene de equipamentos e instalações e/ou fornecimento de água contaminada. A infecção mamária pode ser grave o suficiente para causar sintomas sistêmicos, inclusive septicemia e leite sanguinolento, sendo isoladas *P. aeruginosa* e *P. pseudomallei* em animais com mastite clínica (ROWE, 1998). Em outro estudo, *P. aeruginosa* foi associada com a ocorrência de mastite purulenta que evoluiu para gangrena e morte de algumas cabras (TURNER, 1942). A inoculação experimental com a bactéria isolada provocou mastite hemorrágica em algumas cabras e secreção aquosa esverdeada em outras; constatando grave inflamação mamária. Almeida (2009) encontrou em amostras de leite de cabra *in natura* de 11 propriedades do estado do Rio de Janeiro e Minas Gerais, 2,97% de positividade para *Pseudomonas* spp., mostrando que esses micro-organismos podem acometer os tetos das cabras tanto no momento da ordenha como nas entre-ordenhas.

Na espécie caprina, a agalaxia contagiosa é caracterizada por uma síndrome plurietiológica causada por vários micoplasmas: *Mycoplasma agalactiae*, *M. mycoides* subsp. *mycoides* e *M. capricolum*. Os aspectos clínicos estão bem caracterizados por uma tríade de sintomas localizados na glândula mamária, articulações e olhos. Há outras espécies que mesmo sem provocar esta tríade característica, determinam alterações clínicas similares, especialmente mastites e artrites: *M. putrefaciens* e *M. mycoides* subsp. *capri*. (NICHOLAS et al., 2008). Azevedo et al. (2006) relataram o primeiro surto de agalaxia contagiosa por *M. agalactiae* em pequenos ruminantes no Brasil. O surto aconteceu na região Nordeste, sendo observado um quadro de mastite, agalaxia e poliartrite em cabras, contudo, a origem da doença não foi conhecida. Os autores discutem que a enfermidade pode ter sido introduzida

no Brasil por meio da importação de animais infectados visando à melhoria dos índices de produção leiteira.

Os lentivírus também são conhecidos como agentes infecciosos para pequenos ruminantes, no entanto, não são considerados patógenos clássicos das mastites pelo elevado número de animais assintomáticos (TURIN et al., 2005). Birgel Junior et al. (2007) estudaram a influência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina viral (CAEV) nas características físico-químicas e celulares do leite, sendo evidenciada significativa influência na composição do leite, na eletrocondutividade, nos teores de cloretos e na CCS das cabras infectadas.

Atualmente, o estudo das mastites micóticas adquire uma importância cada vez maior devido ao fato de que muitas espécies de leveduras, fungos leveduriformes e filamentosos, anteriormente considerados não patogênicos, têm atuado como agentes oportunistas, causando enfermidades nos animais (SPANAMBERG et al., 2009). A maior parte dos casos ocorre na forma de surtos localizados e/ou após tratamento com antimicrobianos (JENSEN et al., 1996). Os principais gêneros envolvidos nas mastites micóticas em ruminantes são *Candida* e *Cryptococcus*, além de outros como *Geotrichum*, *Pichia* e *Trichosporon*. Segundo Anderson et al. (2004) os patógenos isolados de casos de mastite em pequenos ruminantes são: *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula glutinis* e *Geotrichum candidum*.

2.2 Epidemiologia

O desencadeamento de mastite é influenciado por inúmeros fatores, relacionados ao animal, patógeno e meio ambiente. Os fatores determinantes que influenciam na susceptibilidade à mastite incluem: resistência natural da glândula mamária, estágio de lactação, hereditariedade, idade do animal, espécie, infectividade e patogenicidade do agente (PRESTES et al., 2002).

As fontes de infecção da mastite caprina são as cabras com mastite clínica ou subclínica, e outras espécies de animais que estão inseridas no mesmo ambiente. Os patógenos podem ser eliminados pelo leite, fezes, urina e secreções oronasais, tendo como via de transmissão as mãos do ordenhador,

equipamento de ordenha, vetores e fômites de uma forma geral. A porta de entrada na maioria das vezes é pela via galactogênica, podendo ocorrer de forma sistêmica pela via hematôgena. Todos os animais são susceptíveis, aumentando a predisposição principalmente segundo a idade e número de lactações (RADOSTITS et al., 2007).

A mastite subclínica predomina nos rebanhos de pequenos ruminantes, apresentando prevalência entre 5% e 30%. A mastite clínica apresenta prevalência em níveis abaixo de 5%, podendo alcançar taxas elevadas em determinadas situações de manejo (CONTRERAS et al., 2007).

Segundo Barcellos et al. (1987) a prevalência de mastite subclínica em rebanhos criados próximos ao município de Belo Horizonte, Minas Gerais, é de 25,5%. Já no estado do Rio de Janeiro a prevalência oscilou entre 22% e 75%, sendo a ocorrência maior em cabras senis ou em fase final de lactação (LIMA JÚNIOR et al. 1995). Na região Nordeste, sinais clínicos foram relatados em 51,2% dos rebanhos, mostrando a precariedade da exploração leiteira nessa região (PINHEIRO et al., 2000). No Rio Grande do Sul, Muricy (2003) encontrou prevalência de 30,8% para mastite subclínica em oito propriedades no Vale do Taquari. No estado da Paraíba, Neves et al. (2010) encontraram prevalência de 11,49% para mastite subclínica, sendo detectados no rebanho inúmeros fatores de risco para a doença. No mesmo estado, Bianchini et al. (2010) investigaram 15 propriedades da região do Cariri Paraibano, encontrando prevalência de 6,88% para mastite subclínica e 0,15% para mastite clínica. Langoni et al. (2012) estudaram rebanhos dos estados de São Paulo e Minas Gerais e encontraram prevalência de 12,5% para mastite subclínica. No estado da Bahia, Peixoto et al. (2012) analisaram amostras de leite de 13 propriedades do sertão Baiano, encontrando prevalência de 29,06% para mastite subclínica (**Tabela 2**).

TABELA 2. Prevalência de mastite caprina subclínica e clínica no Brasil.

Estado	Prevalência		Autor/Ano
	Subclínica	Clínica	
MG	25,5%	-	Barcellos et al. (1987)
RJ	22%-75%	-	Lima Júnior et al. (1995)
CE	-	51,2%	Pinheiro et al. (2000)
PE	22%-75%	-	Mota et al. (2000)
RS	30,8%	-	Muricy (2003)
PB	11,49%	-	Neves et al. (2010)
PB	6,88%	0,15%	Bianchini et al. (2010)
SP e MG	12,5%	-	Langoni et al. (2012)
BA	29,06%	-	Peixoto et al. (2012)

Nos rebanhos caprinos tanto o contágio vertical como horizontal são passíveis de acontecer, no entanto, o contágio vertical apresenta baixíssima ocorrência. A instauração da mastite encontra-se favorecida principalmente pelos fatores que intervêm na transmissão horizontal dos patógenos. Isto se deve às particularidades de defesa da glândula mamária caprina, que proporciona uma maior resistência às infecções ambientais devido a um maior nível fisiológico de células somáticas no leite, assim como um percentual de polimorfonucleares neutrófilos superior ao da vaca (PAAPE e CAPUCO, 1997). Contreras et al. (1998) relataram ainda, que a cabra se diferencia dos outros ruminantes domésticos por seu particular tipo de secreção, predominantemente apócrina, e pelo fato de que nesta espécie ocorre uma grande variação na contagem de células somáticas relacionada com grau de infecção, idade, volume de leite produzido e período da lactação. O principal risco de infecção é determinado pelos micro-organismos que colonizam o óstio do teto, assim como pelas operações que favorecem a penetração desses por meio do canal do teto. Diante desta situação, o momento da ordenha representa um ponto crítico para o controle das mastites. Além disso, devem-se considerar aqueles fatores individuais e ambientais que predispõem a instalação da infecção intramamária, neste último caso, intimamente ligados aos sistemas de exploração (MOTA, 2008).

Dentre os principais fatores determinantes da mastite, destaca-se que no período de lactação há maior susceptibilidade do animal quanto à mastite do tipo contagiosa, enquanto que no período seco, observa-se maior frequência da mastite ambiental. A fase de desmame proporciona uma série de mudanças no tecido mamário, dando-se início ao período de involução mamária (PRESTES et al. 2002; PEIXOTO et al., 2010).

Ameh e Tari (2000) estudaram os fatores predisponentes para mastite caprina, e encontraram uma associação positiva entre a mastite e a presença de ferimentos no teto, porém não foram encontradas associações entre o diâmetro do teto, distância entre o teto e o solo e a prevalência de mastite. Moroni et al. (2005) realizaram um estudo sobre os fatores de risco para as infecções intramamárias em rebanhos de cabras leiteiras, sendo observado que a mastite foi mais frequente entre as fêmeas de terceira e quarta ordem de parto, e quanto ao estágio de lactação, observou-se maior positividade para animais que estavam há vários dias em lactação.

Apesar da enfermidade manifestar-se em diferentes sistemas de exploração e manejo, a maior ocorrência está no sistema intensivo, determinando maior predisposição. Na epidemiologia das mastites duas situações são muito mencionadas: uma com caráter extremamente contagioso, que rapidamente transforma-se em epidemia no rebanho, afetando quase a totalidade dos animais, com grande taxa de mortalidade por septicemia. E outra esporádica, onde se observa uma tendência cíclica de casos clínicos que se alternam com anos de aparente desaparecimento da doença. Nestes casos, a evolução da doença é bem lenta e um dos maiores problemas é a diminuição da produção e atrofia progressiva da glândula mamária, levando o produtor ao descarte precoce dos animais. Em relação aos mecanismos de infecção, existem três vias de penetração que são capazes de infectar os animais: via digestiva, galactófora e respiratória. Outras vias como intradérmica e subcutânea também vêm sendo estudadas, onde se suspeitam de espécies de ácaros que podem ser vetores de patógenos (MOTA, 2008).

Os índices de prevalência das mastites no rebanho ajudam a quantificar o estado de saúde da glândula mamária dos animais, demonstrando de forma precisa o risco de infecção. A estimativa do risco de infecção permite desenhar

os programas de controle e vigilância, reduzindo o impacto econômico ocasionado pela doença (THURMOND, 1993).

2.3 Patogenia

Para estabelecer a infecção, o agente etiológico deve ultrapassar a porção terminal do teto, pois a integridade do teto é a primeira linha de defesa (NICKERSON, 1993). Após a penetração, o micro-organismo multiplica-se no canal galactóforo e atinge a cisterna do teto, onde se multiplica ativamente e distribui-se pelo parênquima mamário (LANGONI, 2007). A segunda linha de defesa é o sistema imunológico que inclui leucócitos nos ductos do teto e na glândula (WHITE et al., 1980; HARMON e HEALD, 1982). Observa-se imediatamente grande aporte de leucócitos polimorfonucleares, particularmente neutrófilos, como resposta do sistema imunológico. O processo inflamatório intensifica e observa-se leve alcalinização da secreção láctea em virtude do extravasamento de líquido celular e íons, a exemplo de carbonato de sódio e cloretos. Ocorrem então, em virtude da grande multiplicação bacteriana: acidificação do leite, produção de toxinas, danos teciduais e presença de secreção purulenta e sangue no leite (LANGONI, 2007).

As alterações provocadas pela mastite no tecido mamário não se refletem somente na produção do leite, mas também nas características físico-químicas, com alteração de seus componentes principais. A mastite interfere na composição do leite pela ação de lipases leucocitárias e, em decorrência, a concentração de gordura no leite proveniente de tetos com elevada CCS tende a diminuir (HARMON, 1994; BRITO e DIAS, 1998).

Paralelamente, ocorrem alterações na CCS que variam em função da etiologia e da virulência do agente etiológico envolvido no processo infeccioso (RADOSTITS et al., 2007). As células somáticas compreendem a maioria das células do sistema imune da glândula mamária, na proporção de 80% nas glândulas mamárias híginas e 99% nas mastíticas. Tais células são constituintes do mecanismo de defesa natural e incluem linfócitos, macrófagos, leucócitos polimorfonucleares e algumas células epiteliais (SORDILLO et al., 1997; PILLAI et al., 2001; SCHUKKEN et al., 2003).

2.4 Sinais clínicos

Na mastite clínica aguda observa-se o aparecimento súbito de febre (40° a 42°C), edema e consistência firme da glândula mamária, perda de apetite, apatia, dispnéia, aumento dos linfonodos retro-mamários e relutância em se locomover. A claudicação é um sinal clínico comum, onde os pequenos ruminantes movimentam suas pernas de forma a não tocarem na glândula mamária inflamada (KIRK e GLENN, 1996). A secreção láctea tem uma coloração alterada, podendo variar desde a presença de grumos (mastite catarral), pus (mastite apostematosa) à secreção serosa ou sero-sanguinolenta (mastite flegmonosa) (ANDERSON et al., 2004; BLAGITZ, 2007; SANTOS et al., 2007). No entanto, na mastite subclínica os animais não apresentam sinais clínicos e sim alterações na composição do leite, não evidenciando sinais de inflamação nos tetos, apenas resultados positivos ao CMT ou outros testes indicativos (CULLOR et al., 1994; RIBEIRO et al., 2003).

As cabras apresentam com maior frequência que as outras espécies, o quadro mais grave da mastite, a mastite gangrenosa. Este tipo de mastite é causado por *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Clostridium perfringens*. Na fase inicial os animais apresentam quadro sistêmico com febre seguida de hipotermia, inapetência, desidratação, sensibilidade local que leva o animal à claudicação e relutância ao andar e deitar, congestão das mucosas oculares, taquicardia, hipomotilidade à atonia ruminal, fezes diarreicas, perda de peso e até a morte do animal. A pele da glândula mamária apresenta-se eritematosa, com aumento de temperatura, o edema poderá ser local ou mesmo atingir a região abdominal ou xifoide, para posteriormente tornar-se cianótica (CULLOR et al., 1994; MENZIES e RAMANNON, 2001; ANDERSON et al., 2004; RIBEIRO et al., 2007; SANTOS et al., 2007).

2.5 Diagnóstico

O diagnóstico inicia-se com a inspeção do úbere, pela palpação para a detecção de anormalidades no tecido mamário, como a presença de nódulos difusos no parênquima, consistência endurecida da glândula e aumento da

temperatura local, assim como pela inspeção visual do leite, realizada pelo uso da caneca de fundo preto ou telada para a visualização de alterações macroscópicas no leite, como grumos, pus, estrias de sangue ou coloração alterada (NMC, 1999).

A mastite clínica pode ser diagnosticada a partir dos sinais clínicos da doença, no entanto, o diagnóstico da mastite subclínica pode ser realizado por meio do California Mastitis Test (CMT) de acordo com Schalm e Noorlander (1957), que estima o número de células somáticas presentes na amostra de leite ou pela contagem eletrônica ou microscópica de células somáticas. Ambos avaliam o grau de sanidade da glândula mamária, pois as células somáticas são células de defesa do organismo, sendo constituídas principalmente por leucócitos polimorfonucleares que migram da corrente circulatória para o foco de infecção na glândula mamária (MOTA, 2008).

O CMT é um exame subjetivo, que deve ser realizado antes da ordenha, logo após o descarte dos primeiros jatos de leite. Trata-se de um kit, que consta de uma raquete com quatro receptáculos, onde são misturados ao redor de dois mililitros de leite com dois mililitros do reagente que acompanha o kit, que é um detergente aniônico, preparado com a púrpura de bromocresol que é um indicador de pH, que no caso de amostras alcalinas, ou seja, positivas, virarão a cor do indicador, mostrando-se de coloração violácea. A ação do detergente é lisar os leucócitos liberando o material genético das células, ocorrendo uma viscosidade proporcional ao número de células presentes na amostra de leite (LANGONI, 2007).

Segundo Schalm e Noorlander (1957), considerando-se como positivas as reações com escore a partir de uma cruz, a saber: 1+ (formação de grumos), 2+ (gelificação discreta) e 3+ (gelificação total), similar a catarro. No entanto, Silva et al. (2001) classificaram as reações em escores aritméticos sendo 0: negativo (sem reação entre o reagente e o leite), 1: traços (suspeita), 2: reação fracamente positiva, 3: reação positiva e 4: reação fortemente positiva, respectivamente representados pela média de neutrófilos por mililitro de leite (**Tabela 3**).

TABELA 3. Interpretação dos escores do California Mastitis Test (CMT) em leite caprino.

Escore do CMT	Reação do Teste	Média CCS/mL de leite
0	Sem reação	68.000
1	Reação leve com tendência a desaparecer	268.000
2	Grumos sem gelificação	800.000
3	Imediata formação de gel	2.560.000
4	Gelificação e aderência	10.000.000

Fonte: Adaptado de Chapaval (2008).

Em caprinos, o CMT negativo é um bom indicador da inexistência de infecções, porém um CMT positivo pode não ser indicativo de processos infecciosos da glândula mamária. Isto ocorre devido à presença das células epiteliais, em maior quantidade, quando comparada ao leite de vaca, que juntamente com leucócitos, reagem ao CMT levando a uma interpretação da prova diferente da usada em bovinos (LEWTER et al., 1984). Uma média de 3% dos corpúsculos citoplasmáticos pode conter fragmentos de núcleo (PAAPE e CAPUCO, 1997), que juntamente com as células epiteliais pode elevar, aparentemente, a concentração de leucócitos presentes no leite, mesmo em animais hígidos. Schalm et al. (1971) interpretaram a reação do leite de cabras ao CMT e relacionaram o número de células somáticas com a intensidade da reação. Os autores verificaram que cabras sem mastite podem apresentar reações traços ou 1+. Por outro lado, reações 2+ e 3+ podem ser indicativos importantes de infecção intramamária. Smith e Roguinsky (1977) classificaram o leite dos animais analisados com escore 1+, como negativos para mastites.

O CMT não deve ser realizado nas duas primeiras semanas pós-parto (fase de colostro) e no final da lactação (período de secagem), pois nesses períodos ocorrem alterações fisiológicas normais da glândula mamária, levando ao resultado falso-positivo (SMITH e SHERMAN, 2009).

A contagem automática de células somáticas pode ser realizada por contadores de partículas (Coulter Counter[®]) e contadores baseados em citometria de fluxo (Somacount[®] ou Fossomatic[®]). O primeiro método é inespecífico, baseado na contagem de impulsos elétricos e, portanto, sofre influência da quantidade de glóbulos de gordura e partículas citoplasmáticas, resultando em contagens quase duas vezes maiores que as do Fossomatic ou Somacount (POUTREL e LERONDELLE, 1983). No entanto, estudos divergem quanto a utilização do Somacount 300[®], calibrado para a espécie bovina, sendo encontrada tanto correlação positiva com a microscopia direta (ANDRADE et al., 2001), quanto o inverso, com superestimação da CCS (ZENG, 1996).

Segundo Mota (2008), a CCS constitui a base das técnicas de diagnóstico indireto das mastites em todas as espécies de ruminantes leiteiros. Os polimorfonucleares afluem para o sangue e para a mama por efeito quimiotático e como resposta ao estímulo inflamatório. Deste modo, mediante equipamentos como o Somacount[®] e outros instrumentos que realizam a contagem automatizada das partículas por tamanho ou por coloração dos núcleos celulares, podem-se quantificar a intensidade da resposta celular, que está relacionada ao tipo de infecção. O limite de normalidade foi fixado em $1,0 \times 10^6$ células/mL para caprinos (EL-MASANNAT, 1987). Estudos realizados no Brasil demonstram que a variação da CCS no leite de cabra ocorre em função de uma série de fatores, entre eles, o estágio de lactação, ordem de parto, época do ano e tipo de ordenha (PEIXOTO et al., 2010).

A utilização da CCS ainda não está bem estabelecida no diagnóstico da mastite caprina. No Brasil, alguns trabalhos têm demonstrado que os valores máximos, mínimos e médios de CCS são bem próximos, sendo encontrados valores elevados de CCS tanto na presença, como ausência de crescimento bacteriano (VILANOVA et al., 2008).

Silva et al. (2001) estudaram a associação entre o CMT e a CCS objetivando a avaliação da saúde da glândula mamária caprina, sendo observada uma correlação positiva entre estes dois testes. Porém, foram observadas elevadas contagens de células somáticas em amostras negativas ao cultivo microbiológico, mostrando que o CMT pode ser usado como teste de

triagem no diagnóstico da mastite, porém, devendo-se sempre associá-lo ao exame microbiológico.

A microscopia direta, padronizada por Prescott e Breed (1910), serve como método de controle dos contadores eletrônicos, recomendado pelo FDA (Food and Drug Administration) quando associado à coloração de verde de metil e pironina-Y, para diferenciar as células nucleadas dos corpúsculos citoplasmáticos (ZENG, 1996).

A contagem microscópica direta tem sido preconizada como um dos métodos mais confiáveis para a determinação da CCS no leite caprino, principalmente se forem utilizados corantes específicos de DNA, como o verde de metil e pironina-Y, pois diferencia as células somáticas dos corpúsculos citoplasmáticos (ZENG et al., 1999). Dulin et al. (1983) analisaram o leite de 24 fêmeas da espécie caprina por meio de contagem microscópica direta, comparando os corantes Wright, hematoxilina-eosina, “orange acridine”, azul de tripan, verde de metil e pironina-Y e Levowitz-Weber; e contagem celular automática (Fossomatic® e Coulter Counter®), encontrando valores mais altos nas contagens quando se utilizaram os métodos não-específicos para DNA (Coulter Counter® e corante Levowitz-Weber).

O exame microbiológico tem como objetivo a identificação do agente etiológico da mastite, permitindo posteriormente a realização da prova de sensibilidade a antimicrobianos. Para obtenção das amostras de leite para análise, tanto nos casos subclínicos como clínicos, deve-se inicialmente proceder à higiene rigorosa dos tetos, pela lavagem com água corrente, secagem com toalha de papel descartável, desinfetando-se o óstio do teto com álcool 70% ou álcool iodado a 0,25%. Colher a amostra em frasco estéril, após desprezarem-se os primeiros jatos de leite, para eliminar possíveis contaminantes do canal do teto. As amostras devem ser encaminhadas ao laboratório sob temperatura de refrigeração (LANGONI, 2007; MOTA, 2008).

Como bacteriologia primária, as amostras de leite devem ser semeadas em meio de ágar sangue ovino 5% e ágar MacConkey, que permitem o isolamento dos principais patógenos envolvidos nas mastites, e diferenciam as enterobactérias a partir da verificação do isolamento bacteriano no ágar MacConkey. A utilização concomitante do meio de ágar-Sabouraud dextrose adicionados de antibióticos com a gentamicina ou clorafenicol possibilitam o

isolamento de leveduras e fungos, e ainda algas, apesar destes últimos serem isolados no meio ágar sangue com incubação de 48 a 72 horas a 37°C. Os resultados devem ser observados a cada 24 horas por até 72 horas e avaliados morfológicamente pela técnica de Gram (CORRÊA e CORRÊA, 1992; LANGONI, 2007).

Às vezes há necessidade de meios e condições especiais para o isolamento de patógenos envolvidos nas mastites, como por exemplo, *Mycobacterium* spp., *Brucella* spp. e *Mycoplasma* spp., bactérias anaeróbicas e vírus, entretanto, nas condições descritas acima podem-se isolar os patógenos mais frequentes. Quando houver suspeita de mastite infecciosa e o cultivo microbiológico resultar negativo, deve-se utilizar meios de cultivo e condições especiais de isolamento. Há casos ainda em que as culturas lácteas podem ser negativas, podendo tratar-se de mastites assépticas, principalmente de origem traumática ou de manejo, ou ainda devido à eliminação intermitente do agente (LANGONI, 2007).

O diagnóstico microbiológico compreende ainda, a caracterização bioquímica dos isolados, possibilitando a caracterização fenotípica e genotípica, bem como do antibiograma para o estudo da sensibilidade dos agentes frente aos antimicrobianos, possibilitando a orientação e indicação do tratamento mais adequado. Devido ao seu alto custo, a realização do antibiograma deve-se restringir aos casos de mastites clínicas, recidivantes, suspeita de patógenos pouco habituais ou estudos experimentais (LANGONI, 2007; PEIXOTO et al, 2010).

O sucesso no diagnóstico clínico da agalaxia contagiosa em caprinos ocorre pela realização de uma anamnese adequada, considerando o processo relacionado ao rebanho. Qualquer decréscimo da produtividade, seja ela intensa ou moderada, deve ser investigado com atenção para micoplasmoses. Os tipos de amostras para o diagnóstico laboratorial são: soro sanguíneo, secreção láctea, exsudato articular (amostra de eleição para a detecção de portadores) e swab de secreção articular e ocular (MARCO et al., 1993). O diagnóstico diferencial se faz principalmente com a artrite encefalite caprina. Esta enfermidade apresenta quadro clínico muito similar, devendo sua diferenciação ser realizada em laboratório pela identificação do agente,

caracterização das colônias, provas bioquímicas ou sorológicas (PEIXOTO et al., 2010).

As técnicas moleculares são importantes ferramentas no diagnóstico da mastite, apresentando elevada sensibilidade e especificidade na identificação de micro-organismos patogênicos e toxinas no leite. Uma das técnicas que vem sendo utilizada de maneira crescente para identificação bacteriana é a multiplex-PCR, que utiliza mais de um par de primers na mesma reação possibilitando a amplificação simultânea de várias sequências de DNA. Essa técnica possibilita a identificação de mais de uma espécie bacteriana na mesma reação, promovendo uma avaliação mais ampla e rápida da presença de bactérias patogênicas em alimentos (TANG e PERSING, 1999).

Além destes, é possível realizar também outros testes como: análise das variações da composição do leite, que se baseia na medição dos íons mediante condutividade elétrica e outros parâmetros como lactose; análise de proteínas séricas no leite, que quando afluem para a glândula mamária infectada aparecem como resposta ao incremento da permeabilidade vascular da barreira mamária, podendo ser quantificada; e pesquisa de enzimas específicas indicadoras de lesão do tecido mamário como a NAGase, que é uma enzima intracelular lisossômica de células epiteliais secretoras que aparecem em maior quantidade no leite quando ocorrem processos de degeneração das mesmas, como consequência da inflamação (SCHÜTTEL et al., 2002; MOTA, 2008).

2.6 Impacto econômico

A mastite caprina gera graves prejuízos econômicos devido ao descarte do leite, custos com medicamentos e assistência veterinária, aumento da mão de obra, redução da qualidade e quantidade do leite e seus subprodutos (DULIN et al., 1983; STEHLING et al., 1986; BARROS e LEITÃO, 1992), além de ser importante problema de saúde pública (MOTA et al., 2000).

Embora em pequenos ruminantes a mastite clínica seja responsável por perdas expressivas, à mastite subclínica apresenta maior ocorrência, gerando elevados prejuízos na produção láctea. Estima-se que as perdas na produção de leite de cabras portadoras de mastite subclínica possam variar de 55 a 132

kg de leite/ano e uma redução de 3g de gordura/kg de leite por animal (BAUDRY et al. 1997).

2.7 Potencial zoonótico e riscos para a saúde pública

No Brasil os principais patógenos causadores de infecções e toxinfecções relacionados ao consumo de leite de cabra e seus derivados são: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Mycobacterium bovis* e *Brucella abortus* (ALVES et al., 1997; MOTA, 2008; PEIXOTO et al., 2010; MELO et al., 2012).

Segundo Freiras et al. (2004), *S. aureus* assume grande importância na microbiologia de alimentos como agente de intoxicações alimentares devido à produção de enterotoxinas termoestáveis, servindo como indicador higiênico-sanitário na indústria alimentícia. A intoxicação alimentar estafilocócica é atribuída à ingestão de toxinas produzidas e liberadas pelas bactérias durante sua multiplicação no alimento, representando um risco à saúde pública. A toxina, por ser termoestável, pode permanecer no alimento mesmo após tratamento pelo calor, favorecendo a ocorrência de intoxicação, caracterizada clinicamente por náuseas, vômito, mal-estar, debilidade geral, diarreia, cefaléia e dor abdominal (MURRAY et al., 1992).

Salmonella spp. tem sido a bactéria mais comumente associada a surtos de toxinfecção alimentar nos Estados Unidos e Reino Unido (SCHLUNDT, 2002). No Brasil, Monte et al. (2009) detectaram a presença de *S. enterica* em amostras de leite cru no estado da Paraíba. As toxinfecções alimentares causadas por salmonelas são frequentemente associadas à ingestão de carnes, aves, ovos, leite e derivados sem tratamento térmico.

O gênero *Salmonella* spp. possui baixa prevalência na casuística de mastite em cabras, no entanto, a salmonelose é considerada a doença mais comumente associada a surtos de toxinfecção alimentar. Atualmente são descritos mais de 2.000 sorotipos de *Salmonella* spp., sendo a espécie *Salmonella enterica* sorotipo *Typhimurium* que apresenta maior prevalência nas infecções para os animais domésticos e humanos. A contaminação do leite e seus derivados ocorre pela contaminação cruzada na ordenha ou na industrialização do produto. Os sintomas na espécie humana são: dores

abdominais, diarreia, febre, calafrios, cefaléia, mal-estar e êmese, sintomas que podem persistir durante uma semana ou mais, podendo ser fatal especialmente em crianças e idosos (ACHA e SZYFRES, 2003).

Escherichia coli apresenta grande importância em saúde pública, principalmente pelos surtos envolvendo o sorotipo O157:H7. Está presente na microbiota intestinal dos animais e de humanos, podendo causar infecções intestinais, infecções urinárias, septicemias, meningites e outras infecções. A contaminação do leite e seus derivados ocorrem da mesma maneira como na salmonelose, não sendo considerada como importante agente primário da mastite (TRABULSI e ALTERTHUM, 2004).

A tuberculose nos pequenos ruminantes é caracterizada por caquexia progressiva, tosse seca, curta e repetitiva, mastite e infertilidade, podendo ocorrer linfadenomegalia localizada ou generalizada. Ela é causada principalmente pelo *Mycobacterium bovis*, embora *M. avium* e *M. tuberculosis* tenham sido isolados ocasionalmente. Os sintomas nos seres humanos são: tosse, febre, escarro que em fase adiantada da doença pode apresentar sangue, dificuldade respiratória e emagrecimento progressivo. A falta de relatos sobre a tuberculose causada por *M. bovis* em caprinos e ovinos em nosso país pode estar ocorrendo devido à falhas de diagnóstico, pois a linfadenite caseosa (*Corynebacterium pseudotuberculosis*) apresenta lesões macroscópicas semelhantes às da tuberculose e tem ampla distribuição nas criações brasileiras (MELO et al., 2012).

A brucelose em caprinos é caracterizada por abortamento no terço final da gestação, queda na fertilidade, natimortalidade e diminuição na produtividade leiteira (ALVES et al., 1997). Nos seres humanos ocorre febre aguda ou insidiosa, suores noturnos, fadiga, anorexia, perda de peso, cefaléia e artralgia. O principal agente da brucelose em caprinos é a espécie *Brucella melitensis*, que não ocorre no Brasil (POESTER et al., 2002). No entanto, infecções esporádicas por *Brucella abortus*, que tem os bovinos como principal hospedeiro, podem ocorrer em outras espécies, como nos caprinos, quando estes acidentalmente entram em contato com o agente de origem bovina (RADOSTITS et al., 2007). Esta infecção pode representar uma fonte importante de perdas econômicas para os produtores, pois não há tratamento

específico e recomenda-se a eutanásia dos animais infectados (POESTER et al., 2002).

A brucelose, tuberculose e toxi-infecções alimentares por *S. aureus*, *Salmonella* spp. e *E. coli*, são transmitidas para a espécie humana por contato direto com materiais contaminados ou indiretamente por ingestão de alimentos contaminados, principalmente de leite e seus derivados não pasteurizados (ACHA e SZYFRES, 2003).

Há relato no Brasil da ocorrência de toxoplasmose aguda em três membros de uma mesma família de Belo Horizonte-MG, relacionada à ingestão de leite de cabra não fervido ou pasteurizado. Taquizoítos foram isolados do leite de uma destas cabras, por inoculação em camundongos. As cabras eram criadas soltas no peridomicílio para fornecimento de leite. Anticorpos para *Toxoplasma gondii* foram detectados nos quinze animais examinados, dos quais oito apresentaram títulos superiores a 1024. Em cinco cabras lactantes, os títulos variaram de 1024 a 32768. Como os taquizoítos são destruídos pelo suco gástrico, é provável que o parasita tenha penetrado pela mucosa bucal e faríngea (CHIARI e NEVES, 1984).

O tratamento antimicrobiano em rebanhos leiteiros deve alertar para a possibilidade de aparecimento de resíduos no leite, representando risco à saúde pública por provocar reações alérgicas ou tóxicas nos indivíduos que ingerem o leite contaminado. As reações alérgicas se manifestam geralmente como urticárias, dermatites, rinites e asma brônquica, e estão associadas principalmente às penicilinas, mas tetraciclina, estreptomicina e sulfonamidas também podem causar esse tipo de reação. Em gestantes resultam em efeitos adversos nos fetos como a ototoxicidade e a alteração no desenvolvimento ósseo (BRITO e LANGE, 2005).

2.8 Prevenção e controle

A higiene durante a ordenha constitui a base para o sucesso de um programa de controle das mastites em pequenos ruminantes. O manejo higiênico-sanitário voltado para prevenção da mastite envolve uma série de fatores incluindo a escolha do antimicrobiano, susceptibilidade do micro-

organismo, duração do tratamento, dosagem empregada e *status* imune do animal (ANDERSON et al., 2004; MOTA, 2008).

Segundo Domingues e Langoni (2001) um amplo programa de controle de mastite baseado na prevenção irá proporcionar uma diminuição nas perdas associadas à mastite, melhorar a qualidade do leite e aumentar a produção. Baseia-se principalmente no manejo e incluem as seguintes medidas:

- Higienização das mãos dos ordenhadores, das instalações e equipamentos;
- Ordenhar primeiro as cabras sadias, estabelecendo uma linha de ordenha;
- Pré-dipping (lavar os tetos antes de cada ordenha com solução desinfetante e enxugar com papel toalha descartável);
- Realizar o teste da caneca de fundo preto ou telada diariamente, antes de cada ordenha, para detectar mastites clínicas agudas, procurando visualizar alterações macroscópicas do leite, como: grumos, pus ou sangue;
- Pós-dipping: após a ordenha, imergir o teto em solução desinfetante, à base de iodo, clorhexidina, ou de extrato de sementes cítricas, de preferência adicionados de glicerina;
- Realizar mensalmente o teste do CMT, objetivando monitorar os casos de mastite subclínica;
- Todos os casos de mastites clínicas devem ser tratados o mais precocemente possível. Normalmente utiliza-se a via intramamária para o tratamento. Pode-se utilizar o antimastítico, uma ou duas vezes ao dia, durante 3 a 5 dias, dependendo do quadro clínico apresentado. Devem-se ordenhar bem os tetos, antes de aplicar o medicamento.

A terapia no período seco não constitui uma prática rotineira na caprinocultura de leite do Brasil. Contudo, o tratamento é recomendado após a última ordenha, no momento da secagem da cabra. Essa terapia tem-se mostrado como uma ferramenta eficiente na diminuição da prevalência de mastite subclínica no rebanho, diminuição da ocorrência de mastite clínica nas cabras secas e redução da incidência de novas infecções após o parto,

proporcionando ganhos na produção (CHAFFER et al., 2003; GONZALO et al., 2004).

Um número reduzido de antibióticos licenciados estão disponíveis para serem usados na espécie caprina. O uso indiscriminado de drogas licenciadas para bovinos em pequenos ruminantes constituem um alto risco devido à segurança e eficácia serem pouco conhecidas para estas espécies (PEIXOTO et al., 2010). Alguns trabalhos realizados no Brasil demonstram a sensibilidade entre diferentes patógenos isolados de casos de mastite em caprinos e ovinos, principalmente para gentamicina (MOTA et al., 2000; SILVA et al., 2004; LANGONI et al., 2006).

O tratamento com antibiótico deverá ser acompanhado por médico veterinário, garantindo adequada e higiênica administração (CONTRERAS et al., 2007). O uso excessivo de antibióticos pode aumentar o risco da resistência a estes medicamentos, fato que tem se tornado um problema de saúde pública. Goni et al. (2004) destacaram que a detecção de cepas de *S. aureus* resistentes aos aminoglicosídeos devem ser consideradas uma preocupação para saúde pública, dado ao mecanismo similar para cepas isoladas em humanos. Soares et al. (2008) demonstraram que isolados clínicos de ECN provenientes de amostras coletadas de animais e humanos têm apresentado elevada resistência à penicilina e ampicilina.

O uso de vacinas torna-se uma decisão econômica para veterinários e criadores, pois reduz custos e tem reflexos positivos sobre a qualidade do leite e saúde pública, ao reduzir a necessidade do uso de antibióticos (PORTES et al., 2006). Existe disponível no mercado vacinas contra mastite clínica gangrenosa para pequenos ruminantes, sendo indicadas nos casos de alta prevalência da infecção (PEIXOTO et al., 2010). A efetividade dos programas de vacinação contra mastite para *S. aureus* tem sido relatada para ovelhas, mas não para cabras (AMORENA et al., 1994; TOLLERSRUD et al., 2002). Coelho et al. (2008) observaram uma redução no número de casos de mastite em cabras leiteiras, a partir da associação entre antibioticoterapia e vacina para mastite estafilocócica.

A suplementação com vitamina E é importante para funcionamento do sistema imunológico, atuando na produção de anticorpos, proliferação celular, produção de citocinas, no metabolismo da prostaglandina e nas funções dos

neutrófilos (HOGAN et al., 1993). O mecanismo pelo qual essa vitamina aumenta a defesa do organismo nas infecções é atribuído ao seu efeito antioxidante que protege as células fagocíticas e os tecidos ao seu redor dos ataques oxidativos dos radicais livres, produzidos pela explosão respiratória dos neutrófilos e macrófagos, durante a fagocitose (BAEHNER et al., 1977; BABIOR, 1984). Estudo realizado por Paes et al. (2003) demonstraram que a CCS e o número de *S. aureus* são menores nos caprinos suplementados com vitamina E.

As terapias homeopática ou fitoterápica são pouco utilizadas em pequenos ruminantes no Brasil, sendo utilizada em sua maioria no tratamento da mastite bovina (ALMEIDA, 2004). Langoni et al. (2011) avaliaram a eficácia de um composto homeopático no tratamento e prevenção da mastite em cabras, principalmente analisando seu efeito na CCS e produção de leite antes, durante e depois de sua administração, demonstrando que a CCS e a produção leiteira não foram afetadas pelo composto homeopático utilizado.

A cura espontânea é o desaparecimento total da doença na ausência de qualquer tipo de tratamento, estando intimamente relacionada com a resposta celular e humoral do sistema imunológico, variando a taxa de cura entre 10% e 30% no rebanho (SMITH e SHERMAN, 2009).

Para o sucesso na prevenção e controle da mastite, é importante que exista um programa voltado para o diagnóstico e monitoramento constante dentro da propriedade rural (CHAPAVAL e PIEKARSKI, 2000).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar os aspectos microbiológicos, citológicos e moleculares do leite caprino mastítico em nível de cabras, metades mamárias e tanques de expansão.

3.2 Objetivos específicos

- Diagnóstico microbiológico e caracterização bioquímica de ECP (*S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*) no leite caprino mastítico;
- Comparar os resultados da CCS automática pelo método de citometria de fluxo (Somacount 300[®]) calibrado para leite bovino com a CCS microscópica (Prescott e Breed, 1910), para estabelecer correlação entre esses dois métodos com os resultados obtidos no CMT, considerado no presente estudo como prova de triagem;
- Realizar a CMT, CCS e CBT nas amostras de leite dos tanques de expansão das propriedades;
- Determinar a ocorrência de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* em amostras de leite individuais das metades mamárias das cabras lactantes com reação positiva ao CMT, e de amostras de leite do tanque de expansão de todas as propriedades, por meio da multiplex-PCR;
- Analisar fatores de risco para a ocorrência de mastite subclínica, associando o resultado dos exames laboratoriais, com as principais características de manejo do rebanho, produção e instalações, obtidas pela aplicação de questionário epidemiológico (**Anexo**).

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População e amostragem

Os critérios para inclusão das propriedades rurais foram: pertencer ao estado de São Paulo e possuir um rebanho com número mínimo de 20 cabras em lactação. Nas propriedades com mais de 40 animais em lactação foi realizado uma seleção randômica (um sim, um não), independente da idade, fase de lactação, raça e sistema de criação.

As colheitas das amostras foram realizadas em 10 propriedades leiteiras localizadas em sete diferentes municípios do estado de São Paulo, Brasil (Tabela 4).

TABELA 4. Número de propriedades rurais de acordo com os municípios, número total de cabras em lactação e número de cabras amostradas. Botucatu, SP, 2013.

Propriedades	Municípios	Nº total de cabras em lactação	Nº de cabras amostradas
1	S.J. do Rio Preto-SP	160	31
2	São Carlos-SP	85	35
3	Limeira-SP	38	22
4	Guaratinguetá-SP	65	25
5	Pirassununga-SP	24	23
6	Botucatu-SP	38	38
7	Botucatu-SP	20	20
8	Jaboticabal-SP	23	23
9	Jaboticabal-SP	20	20
10	Jaboticabal-SP	20	20
Total		493	257

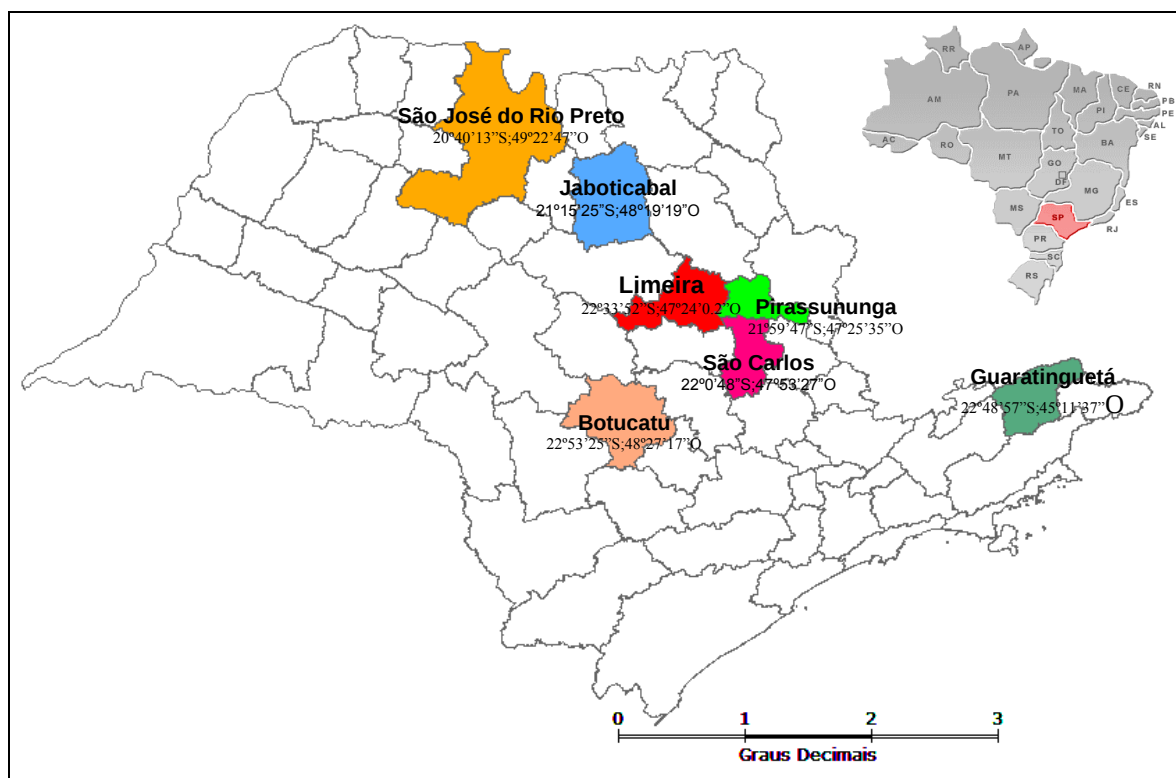


FIGURA 1. Distribuição e coordenadas geográficas das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.

Fonte: Programa Terra View 4.2.2.

4.2 Colheitas das amostras

Para a colheita das amostras de leite, os tetos das cabras foram lavados previamente com água e secados com toalha de papel descartável. A seguir, foi realizada antissepsia do óstio do teto com algodão umedecido em solução de álcool 70%, e as amostras para cultivo microbiano foram colhidas em frascos de vidro esterilizados em duplicata e encaminhadas ao laboratório do Núcleo de Pesquisa em Mastites – NUPEMAS da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu, sob refrigeração, em caixa isotérmica contendo gelo reciclável.

4.3 Variáveis estudadas

Durante a visita foi aplicado um questionário epidemiológico em cada uma das propriedades, sendo entrevistado o proprietário ou responsável pelos animais. Foram avaliadas as condições gerais de manejo dos animais e higiene de ordenha, considerando os seguintes itens: produção leiteira (média diária), tipos de equipamentos de ordenha e de armazenamento do leite, manejo de ordenha, hábitos de higiene dos ordenhadores, medidas de diagnóstico e prevenção de mastite, prevalência de mastite clínica e/ou subclínica, rotina de tratamentos utilizados nos animais com mastite, além da idade dos animais e número de lactações.

Com as informações obtidas nos questionários, as propriedades foram classificadas de acordo com os métodos e condições gerais de ordenha: 1) mão-de-obra qualificada, 2) realização de pré-dipping, 3) realização de pós-dipping, 4) realização do CMT para diagnóstico de mastite subclínica, 5) manejo do rebanho no pós-ordenha, 6) limpeza diária da sala de ordenha e dos equipamentos, 7) estrutura da sala de ordenha, 8) registro dos dados dos animais e 9) acompanhamento médico-veterinário. As propriedades que atenderam acima de sete itens foram classificadas como grupo A (condições satisfatórias de ordenha), enquanto as que atenderem de cinco a sete itens foram classificadas como grupo B (condições regulares de ordenha) e as que atenderam menos de cinco itens foram classificadas como grupo C (condições ruins de ordenha).

4.4 California Mastitis Test (CMT)

A mastite foi diagnosticada inicialmente pelo prova de triagem do CMT, segundo Schalm e Noorlander (1957), considerando-se como positivas as reações com escore a partir de uma cruz, a saber: 0 (ausência de grumos), 1+ (formação de grumos), 2+ (gelificação discreta) e 3+ (gelificação total, similar a catarro). Para efeito de controle e comparação de resultados com as demais provas propostas no estudo, deveriam ser colhidas amostras de leite das metades mamárias negativas ao CMT, a fim de permitir comparação entre os diferentes graus de positividade, com as amostras negativas bem como, com

as demais realizadas, no entanto, todas as amostras apresentaram-se positivas ao CMT.

4.5 Contagem eletrônica e microscópica de células somáticas

Para a CCS foram colhidas amostras de leite de cada metade mamária com resultado a partir de 1+ ao CMT antes do início da ordenha, divididas em duas alíquotas. A primeira alíquota de leite foi colhida em frascos plásticos com capacidade de 40mL, contendo duas pastilhas do conservante bronopol (2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol), para a realização da CCS automática. Para a realização da CCS microscópica, pela técnica de Prescott e Breed (1910), foi colhida uma segunda alíquota, em frasco de vidro com capacidade de 3mL, a qual foi transportada sob refrigeração ao laboratório.

No momento do exame as amostras de leite foram mantidas em banho-maria a 40°C, durante 15 minutos e a seguir, homogeneizadas, manualmente, sendo a CCS realizada por citometria de fluxo (Somacount 300® da empresa Bentley Instruments Inc.), e o resultado registrado em número de células somáticas/mL de leite.

Considerou-se como ponto de corte para a definição de infecção intramamária o valor de 1×10^6 células/mL de leite, tanto na contagem eletrônica como microscópica de células somáticas.

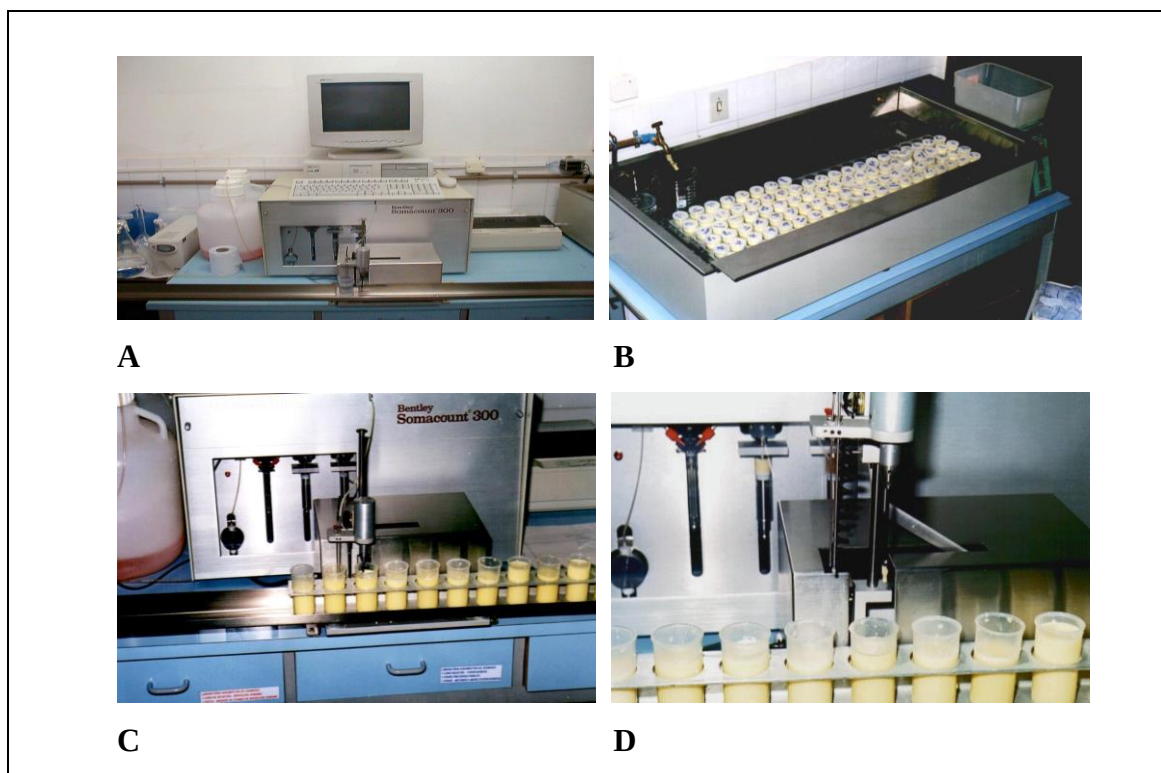


FIGURA 2. Contagem automática de células somáticas. **A** (Aparelho Somacount 300[®] calibrado para análise de leite bovino); **B** (Amostras de leite no Banho-maria a 40°C por 15 minutos); **C** (Primeira fase de análise onde a agulha de sucção aspira 3mL de leite para limpeza do equipamento); **D** (Segunda fase de análise onde a agulha de sucção aspira mais 3mL de leite misturando-se com o corante brometo de etídeo para a contagem de células somáticas).

Fonte: Núcleo de Pesquisa de Mastite - NUPEMAS - FMVZ - UNESP.

Para a CCS microscópica, após homogeneização da amostra, 10µL de leite foram distribuídos em uma área de 1cm², em lâminas de microscopia, previamente limpas e desengorduradas, confeccionadas em duplicata para cada amostra de leite. A seguir, as lâminas foram secas em temperatura ambiente, por 24 horas (PRESCOTT e BREED, 1910), fixadas em solução de Carnoy's, hidratadas e coradas em solução fresca preparada com verde de metil e pironina-y (ZENG, 1996). Foi realizada a contagem das células presentes em 100 campos visuais das duas lâminas confeccionadas, usando uma objetiva de imersão (100x e objetiva 10x). Para a obtenção do resultado final, foi obtida a média das duas contagens, multiplicando-se a média pelo fator de correção do microscópio previamente calculado, expressando-se o resultado em número de células somáticas por mL de leite (ZENG et al., 1999).

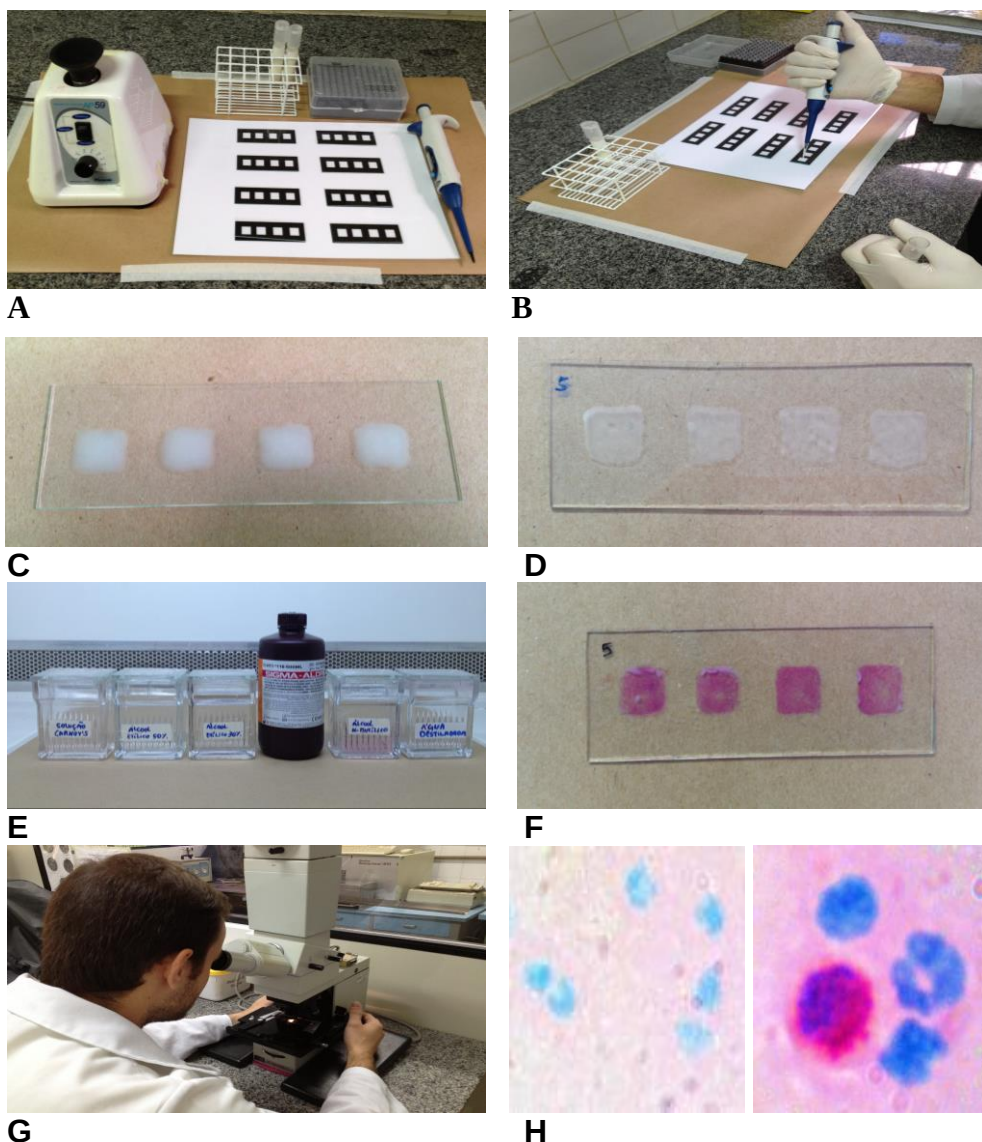


FIGURA 3. Contagem Microscópica de Células Somáticas. **A** (Materiais utilizados para preparação de lâminas de microscopia); **B** (Distribuição de 10 μ L de leite em uma área de 1cm² previamente marcada em um protocolo com vários moldes), **C** (Lâmina contendo 10 μ L de amostra de cada metade mamária em duplicata distribuídas em área de 1cm²); **D** (Lâmina de microscopia seca após 24 horas em temperatura ambiente). **E** (Protocolo para coloração: 10 minutos em Solução de Carnoy's, posteriormente um minuto em álcool etílico 50%, um minuto em álcool etílico a 30%, seis minutos em solução de pironina-Y a 0,5% e verde de metil a 0,3% em água destilada, seguido de um minuto em Álcool n-Butílico e um minuto em água destilada); **F** (Lâmina pronta para leitura após coloração); **G** (Observação e contagem das células somáticas em microscópio óptico) e **H** (Células somáticas identificadas nas amostras de leite mastítico de cabra).

Fonte: Núcleo de Pesquisa de Mastite - NUPEMAS - FMVZ - UNESP.

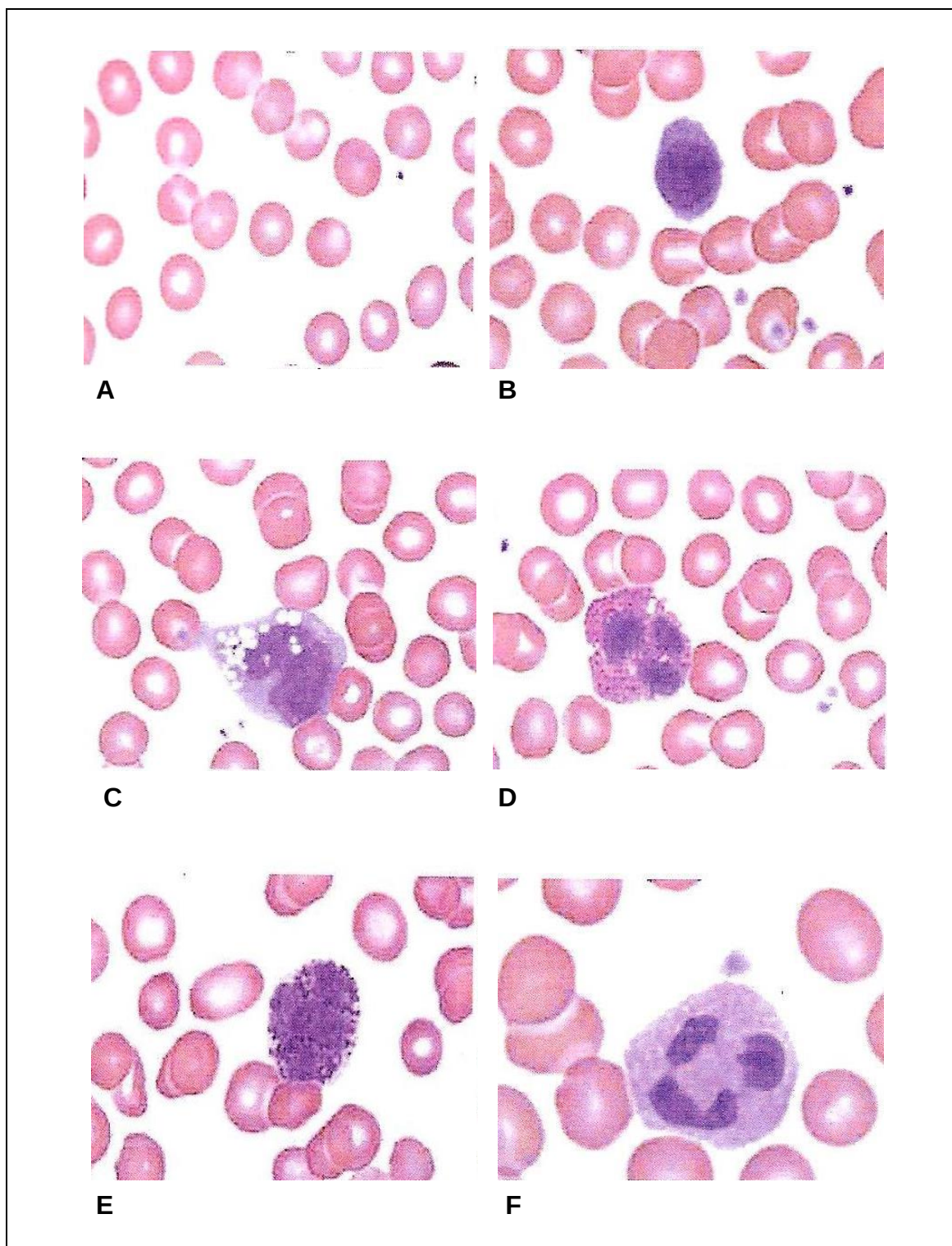


FIGURA 4. Elementos Celulares do leite usados como referência para a contagem microscópica das células somáticas: **A** (Hemácias); **B** (Linfócito); **C** (Monócito); **D** (Eosinófilo); **E** (Basófilo); **F** (Neutrófilo – PMN).

Fonte: Adaptado de Prata (2001) – Fundamentos de Ciência do Leite.

4.6 Análise microbiológica e caracterização bioquímica

Os cultivos microbianos foram realizados no Laboratório do NUPEMAS. Todas as amostras de leite com resultado a partir de 1+ ao CMT foram semeadas em duplicata nos meios de ágar sangue ovino 5% e ágar MacConkey, mantidas a 37°C em aerobiose, por 72 horas com leitura a cada 24 horas. As linhagens de micro-organismos de origem bacteriana foram identificadas segundo as características de cultivo, morfo-tintoriais e bioquímicas (QUINN et al., 1994), independente do gênero bacteriano isolado.

O teste da coagulase para caracterização de estafilococos foi realizado a partir de cultivo de 24 horas em ágar sangue. Três a cinco colônias do micro-organismo foram transferidas para tubos de ensaio contendo 0,25mL de plasma de coelho (Coagulo Plasma Probac®) e 0,5mL de caldo BHI, seguido de incubação a 37°C por até 24 horas. A leitura do teste com resultado positivo foi representada pela formação de coágulo gelatinoso e firme.

Para determinação da Contagem Bacteriana Total (CBT) dos tanques de expansão, diluiu-se 100μL do leite em 900μL de solução salina a 0,9% a fim de obter diluições sucessivas de 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 10^0 bactérias/mL. Foram cultivados 10μL da diluição em ágar sangue ovino 5%, mantendo-se a 37°C em aerobiose, com leitura das UFC/mL após 24 horas. Calculou-se a contagem de UFC/mL em cada amostra de leite, de acordo com Silva et al. (1997): quando há somente colônias típicas ($\text{UFC/mL} = \text{N}^\circ \text{ de colônias típicas} \times \text{diluição} \times 10 \text{ vezes a porcentagem de colônias confirmadas}$), quando há somente colônias atípicas ($\text{UFC/mL} = \text{N}^\circ \text{ de colônias atípicas} \times \text{diluição} \times 10 \text{ vezes a porcentagem de colônias confirmadas}$) e quando há colônias típicas e atípicas ($\text{UFC/mL} = (\text{N}^\circ \text{ de colônias típicas} \times \text{diluição} \times 10 \text{ vezes a porcentagem de colônias confirmadas}) + (\text{N}^\circ \text{ de colônias atípicas} \times \text{diluição} \times 10 \text{ vezes a porcentagem de colônias confirmadas})$).

Foram utilizados como controles positivos para estafilococos linhagens bacterianas padrão de *S. aureus* (ATCC 25923), *S. hyicus* (ATCC 11249), *S. intermedius* (ATCC 29663), de *E. coli* (ATCC 11229) e de *S. agalactiae* (ATCC 13813) adquiridas da Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo e do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) do Rio de Janeiro.

4.6.1 Caracterização de *S. aureus*

As colônias apresentaram tamanho ao redor de 1 a 3mm de diâmetro, de coloração branca a amarelo dourado, hemolíticas e Gram-positivas. Após observação das características morfológicas, as colônias foram repicadas em meio de caldo-cérebro-coração, incubando-se por 24 horas a 37°C e a seguir submetidas a provas bioquímicas, sendo positivas aos testes (coagulase, catalase e urease), positiva a produção de acetoina e fermentadora de glicose, maltose e manitol (QUINN et al., 2005).

4.6.2 Caracterização de *S. intermedius*

As colônias apresentaram tamanho ao redor de 0,8 a 1,5mm de diâmetro, de coloração branco acinzentada, hemolíticas e Gram-positivas. Após observação das características morfológicas, as colônias foram repicadas em meio de caldo-cérebro-coração, incubando-se por 24 horas a 37°C e a seguir submetidas às provas bioquímicas, sendo positivas aos testes (coagulase, catalase e urease), negativa a produção de acetoina e fermentadora de glicose, maltose e manitol (QUINN et al., 2005).

4.6.3 Caracterização de *S. hyicus*

As colônias apresentaram tamanho ao redor de 0,6 a 1,3mm de diâmetro, de coloração branco acinzentada, não hemolíticas e Gram-positivas. Após observação das características morfológicas, as colônias foram repicadas em meio de caldo-cérebro-coração, incubando-se por 24 horas a 37°C e a seguir submetidas a provas bioquímicas, sendo positivas aos testes (coagulase, catalase e urease), negativas a produção de acetoina e não fermentadora de glicose, maltose e manitol (QUINN et al., 2005).

4.6.4 Caracterização de *S. agalactiae*

As colônias apresentaram tamanho ao redor de 0,5mm de diâmetro, translúcidas, hemolíticas ou não e Gram-positivas. Após observação das características morfológicas, as colônias foram repicadas em meio de caldo-cérebro-coração, incubando-se por 24 horas a 37°C e a seguir submetidas a provas bioquímicas, sendo positivas aos testes (lactose, salicina, trealose e hipurato de sódio), negativas as provas de inulina, rafinose, sorbitol, hidrólise de esculina e crescimento negativo em NaCl a 6,5% e positivas ao teste de CAMP (QUINN et al., 2005).

4.6.5 Caracterização de *E. coli*

No ágar sangue ovino as colônias de *E. coli* apresentaram coloração acinzentada, com 1,5 a 2,5mm de diâmetro, com produção ou não de beta-hemólise. As linhagens bacterianas isoladas em ágar MacConkey e fermentadoras de lactose foram submetidas às provas bioquímicas para enterobactérias utilizando meios de cultura sólidos e semi-sólidos, distribuídos em tubos de ensaio, determinando os seguintes parâmetros: produção de gás (glicose), H₂S, urease, L-TD (L-triptofano-desaminase), motilidade, indol, lisina e citrato de Simmons. Foram classificadas como *E. coli* linhagens positivas nas provas de gás (glicose), indol e lisina, motilidade (variável), e negativas para H₂S, urease, L-TD e citrato de Simmons (SILVA et al., 2001; TRABULSI et al., 2005).

4.7 Técnicas de biologia molecular para a pesquisa de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*

Todos os procedimentos referentes ao diagnóstico molecular foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus Botucatu-SP.

4.7.1 Extração de DNA

As amostras de leite foram aliquotadas e congeladas em microtubos livres de DNase e RNase a -80°C . As extrações do DNA das amostras de leite de cabra dos 10 capris foram realizadas utilizando-se o kit comercial illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, EUA), de acordo com as instruções do fabricante e com algumas alterações. Foram realizadas as extrações de todas as amostras de leite das metades mamárias e dos tanques de expansão, assim como de cepas padrões ATCC.

4.7.2 Determinação do limiar de detecção

Para a determinação do limiar de detecção da PCR para cada uma das bactérias analisadas, cada bactéria foi semeada em caldo BHI e incubada por 24 horas a 37°C . Após este período, 900 μL de água ultrapura estéril foram aliquotados em microtubos estéreis livres de DNase e RNase, e em outros microtubos 900 μL de leite caprino longa vida comercializado em Botucatu, SP. Diluiu-se 100 μL da suspensão de 10^9 bactérias/ mL^{-1} obtida de acordo com a escala 4 de McFarland ($1,2 \times 10^9$ bactérias/ mL^{-1}) em 900 μL de água ultrapura a fim de se obter diluições sucessivas de 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 e 10^0 bactérias/ mL^{-1} . Da mesma forma, a mesma suspensão 10^8 bactérias/ mL^{-1} foi diluída em 900 μL de amostra de leite caprino, a fim de se obter diluições sucessivas de 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 e 10^0 bactérias/ mL^{-1} .

4.7.3 Reação em cadeia pela polimerase (multiplex-PCR)

Todas as amostras foram submetidas à detecção de DNA de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* pela multiplex-PCR, utilizando-se os primers descritos na **Tabela 5**. Os primers são direcionados para regiões espécie-específicas do DNA que codificam as regiões *spi*, 16S rRNA e 23S rRNA, baseado nas sequências do banco de dados do GenBank. As concentrações de reagentes utilizados na multiplex-PCR foram utilizadas comparando-se os trabalhos de Straub et al. (1999) e Chótar et al. (2006). Cada microtubo de reação de 0,2mL recebeu 25 μL de solução, consistindo de tampão de PCR 10x, sem magnésio

(50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH8,0), 1,5mM MgCl₂, 0,2mM de solução de desoxinucleotídeos, 0,5U (Straub et al., 1999) Platinum *Taq* DNA polimerase (Life Technologies, EUA), 10μM (Straub et al., 1999) ou 25μM (Chótar et al., 2006) de cada oligonucleotídeo (Integrated DNA Technologies, EUA), 10ng de amostra, e água ultrapura q.s.p. (GIBCO, EUA). Todas as amplificações foram realizadas em termociclador MasterCycler EP gradient (Eppendorf, EUA). Testaram-se dois protocolos de amplificação: o primeiro descrito por Chótar et al. (2006) utilizando-se os primers SAU1 e SAU2, SIP3 e SIP4 ou SAGA1 e SAGA2, Ecoli1 e Ecoli2, consistiu em uma incubação inicial de 5 minutos a 96°C, seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 96°C, 1 minuto a 55°C e 2 minutos a 72°C, com incubação final de 8 minutos a 72°C. O segundo descrito por Straub et al. (1999), utilizando-se os primers STAUR4 e STAUR6, SIP3 e SIP4, Ecoli1 e Ecoli2, consistiu em uma incubação inicial de 5 minutos a 96°C, seguida de 37 ciclos de 1 minuto a 96°C, 1 minuto a (gradiente de anelamento: 56°C, 56,2°C, 56,6°C, 57,3°C, 58,2°C, 59,3°C, 60,4°C, 61,5°C, 62,5°C, 63,4°C, 63,8°C, 64°C) e 2 minutos a 72°C, com incubação final de 8 minutos a 72°C. Alíquotas de 8μL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 2μL de solução de azul de bromofenol e submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% com 0,3μL/mL⁻¹ de brometo de etídio diluído em tampão tris-borato-EDTA (TBE) 1x. A corrida foi realizada a 100 voltz por 40 minutos. Após a corrida, o produto da amplificação foi visualizado e fotografado em sistema de fotodocumentação digital, Sistema Gel-Doc it (UVP, EUA), software VisionWorks LS, sob luz ultravioleta e em computador específico.

TABELA 5. Primers utilizados para a amplificação do DNA de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* em amostras de leite caprino pela técnica de multiplex PCR. Botucatu, SP, 2013.

Agente	Alvo	Primers ¹	Primers ²	Sequência do oligonucleotídeo (5'-3')	Produto (pb)	Referência
<i>Staphylococcus aureus</i>	23S rRNA	Sau 327	SAU1	GGACGACATTAGACGAATCA	1300	Riffon et al. (2001)
		Sau 1645	SAU2	CGGGCACCTATTTTCTATCT		Chótar et al. (2006)
	23S rRNA	STAUR4	-	ACGGAGTTACAAAGGACGAC	1250	Straub et al. (1999)
		STAUR6	-	AGCTCAGCCTTAACGAGTAC		
<i>Streptococcus agalactiae</i>	16S rRNA	Sag 432	SAGA1	CGTTGGTAGGAGTGGAAAAT	590	Riffon et al. (2001)
		Sag 1018	SAGA2	CTGCTCCGAAGAGAAAGCCT		Chótar et al. (2006)
	sip*	SIP3	SIP3	TGAAAATGCAGGGCTCCAACCTCA	293	Chótar et al. (2006)
		SIP4	SIP4	GATCTGGCATTGCATTCCAAGTAT		
<i>Escherichia coli</i>	23S rRNA	Eco 2083	Ecoli1	GCTTGACACTGAACATTGAG	660	Riffon et al. (2001)
		Eco 2745	Ecoli2	GCACTTATCTCTTCCGCATT		Chótar et al. (2006)

*sip: surface immunogenic protein (protein imunogênica de superfície), designada como Sequência Específica Sip (SSS) – única para o GBS (Lancefield Group B Streptococcus); ¹Nome dos primers de acordo com a referência original; ²Nome dos primers de acordo com a multiplex-PCR de Chótar et al. (2006).

4.8 Análise estatística

Estatísticas descritivas PROC FREQ e PROC MEANS (SAS Institute, 2009) foram produzidas para caracterizar a população do estudo, descrever os agentes etiológicos causadores de mastite e estimar as prevalências de mastite subclínica e clínica. O teste de Qui-quadrado ou de Fisher (PROC FREQ, SAS Institute, 2009) foi usado para testar a hipótese de que a prevalência de mastite foi heterogênea entre as fazendas. A CCS e CBT foram transformadas para escala logarítmica para análise. Análise de variância (PROC MIXED, SAS Institute, 2009) foi utilizada para comparar a média da CCS automática e microscópica entre os escores de CMT, e a média da CCS automática entre grupos de patógenos causadores de mastite.

Características diagnósticas do CMT, CCS automática e CCS microscópica para identificar infecções intramamárias foram estimadas por meio da sensibilidade, especificidade, valor preditivo do teste positivo e valor preditivo do teste negativo.

A associação linear entre a CCS automática e a CBT no leite do tanque de expansão foi estimada por meio do coeficiente de correlação de Pearson. Um modelo de regressão linear (PROC REG, SAS Institute, 2009) foi usado para avaliar a concordância entre a CCS automática e microscópica.

Associações entre possíveis fatores de risco e a presença de mastite subclínica em nível de animal foram testadas por meio do teste de Qui-quadrado. Como “propriedade” foi o principal fator de confusão na estimativa dessas associações, modelos de regressão logística (PROC GENMOD, SAS Institute, 2009) foram usados para produzir associações (estimadas usando a razão das chances) ajustadas por propriedade. Significância estatística foi definida como $P < 0,05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Análise descritiva das propriedades

Os tamanhos das 10 propriedades rurais foram heterogêneos, variando entre 17 e 150 hectares. Em todas as propriedades a caprinocultura de leite era a atividade principal **(Tabela 6)**.

O número total de cabras em lactação nas propriedades variou entre 20 a 160 animais. A idade variou entre 2 e 6,5 anos, sendo 77,43% (199/257) Saanen e 22,57% (58/257) Anglo-Nubiana. A alimentação dos animais nas propriedades era à base de feno, ração ou pastagem, dependendo do tipo de instalação. O abastecimento de água nas propriedades para o consumo dos animais e limpeza dos equipamentos e instalações era de poço artesiano **(Tabela 6)**.

Todas as propriedades ordenhavam os animais duas vezes ao dia. A produção diária de leite dos rebanhos variou entre 30 e 120 litros e a produção leiteira média do rebanho por animal variou entre 0,75 e 2,94 litros. Com relação à fase de lactação, 31,52% (81/257) das cabras estavam na fase inicial, 59,92% (154/257) intermediária e 8,56% (22/257) final **(Tabela 6)**.

Os animais ficavam confinados em 80% (8/10) das propriedades e em 20% (2/10) a pasto. O tipo de ordenha em 70% (7/10) das propriedades era mecânica e em 30% (3/10) manual. Em 90% (9/10) das propriedades a ordenha era realizada em plataforma, sendo apenas 1% (1/10) no curral **(Tabela 7)**.

A higiene da sala de ordenha, higiene geral dos equipamentos e a qualidade da mão de obra foram classificadas como boas em todas as propriedades. Todos os tanques de expansão apresentavam boas condições de higiene, sendo a higiene dos tanques realizada em 50% (5/10) das propriedades semanalmente, 30% (3/10) três vezes por semana e 20% (2/10) duas vezes por semana **(Tabela 7)**.

A lavagem e secagem dos tetos com papel toalha descartável, pré-dipping e pós-dipping eram realizadas em 60% (6/10) das propriedades rurais **(Tabela 8)**.

A alimentação pós-ordenha era fornecida em todas as propriedades mantendo os animais na posição de estação por um período mínimo de 30 a 40 minutos até o fechamento dos esfíncteres dos tetos **(Tabela 8)**.

O tipo de secagem dos animais era abrupto em 50% (5/10) das propriedades e intermitente nas outras, sendo o ambiente do período seco em 80% (8/10) confinado e em 20% (2/10) a pasto. O uso de antibiótico na secagem era feito pela via intramamária em 60% (6/10) das propriedades.

A mastite clínica era tratada em todas as propriedades, e o tipo de tratamento em 70% (7/10) era feito pela associação entre a via intramamária e sistêmica (intravenosa, intramuscular ou subcutânea), e em 30% (3/10) apenas pela via intramamária **(Tabela 8)**.

Todas as propriedades realizavam a prova de Tamis antes das ordenhas, 70% (7/10) das propriedades realizavam o CMT e CCS mensalmente, e 30% (3/10) não realizavam CMT e CCS **(Tabela 8)**.

Nenhuma das propriedades rurais recebiam assistência veterinária, e nenhum outro problema sanitário, reprodutivo ou nutricional foi observado nos rebanhos durante a colheita das amostras.

Todas as informações obtidas no questionário epidemiológico sobre as principais características de produção, rebanho e manejo das propriedades estudadas estão descritas nas tabelas a seguir.

TABELA 6. Resumo das principais características de manejo do rebanho, produção e instalações das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.

Características	P1¹	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
Tamanho da propriedade (hectare)	150	76	85	52	26	18	27	17	38	22
Atividade Principal (Caprinocultura de leite)	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Raças	Saanen	Saanen	Saanen	Saanen	Saanen	Anglo Nubiana	Saanen	Saanen	Saanen	Anglo Nubiana
Intervalo de idade (anos)	2-4	2-6,5	2-4	2-3	2-5	3,5	2-4,5	2-3	2,5-4	2-3,5
Nº de cabras em lactação	160	85	38	65	24	38	20	23	20	20
Fase de lactação*	Intermediária	Intermediária	Final	Intermediária	Intermediária	Inicial	Inicial	Inicial	Intermediária	Intermediária
Produção diária (Litro/dia)	120	250	70	200	30	80	50	40	30	30
Produção leiteira Média do rebanho (Litro/Animal/Dia)	0,75	2,94	1,84	3,10	1,25	2,10	2,50	1,74	1,50	1,50
Total de animais examinados	31	35	22	25	23	38	20	23	20	20

* Fases de Lactação: Inicial (1-3 meses); Intermediária (4-6 meses) e final (7-8 meses); ¹P1(São José do Rio Preto), P2 (São Carlos), P3 (Limeira), P4 (Guaratinguetá), P5 (Pirassununga), P6,7 (Botucatu) e P8,9,10 (Jaboticabal).

TABELA 7. Resumo das principais características de manejo do rebanho, produção e instalações das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.

Características	P1¹	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
Tipo de Instalações	Confinado	Confinado	Confinado	Confinado	Pasto	Pasto	Confinado	Confinado	Confinado	Confinado
Tipo de Ordenha	Mecânica	Manual	Manual	Manual	Mecânica	Mecânica	Mecânica	Mecânica	Mecânica	Mecânica
Local de Ordenha	Plataforma	Curral	Plataforma	Plataforma	Plataforma	Plataforma	Plataforma	Plataforma	Plataforma	Plataforma
Estrutura da Sala de ordenha	Boa	Boa	Boa	Ruim	Ruim	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa
Higiene da sala de ordenha*	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa
Higiene geral dos equipamentos*	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa
Limpeza das teteiras pós-ordenha	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Higiene do tanque de ordenha*	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa
Limpeza do tanque de resfriamento	2x por semana	semanal	Semanal	Semanal	2x por semana	Semanal	Semanal	3x por semana	3x por semana	3x por semana
Abastecimento de água	Poço artesiano	Poço artesiano	Poço artesiano	Poço artesiano	Poço artesiano	Poço artesiano	Poço artesiano	Poço artesiano	Poço artesiano	Poço artesiano
Alimentação durante lactação	Feno e Ração	Feno e Ração	Feno e Ração	Feno e Ração	Pasto e Ração	Pasto e Ração	Feno e Ração	Feno e Ração	Feno e Ração	Feno e Ração
Qualidade da mão de obra*	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa	Boa

* As informações obtidas foram classificadas como boa, regular ou ruim; ¹ P1(São José do Rio Preto), P2 (São Carlos), P3 (Limeira), P4 (Guaratinguetá), P5 (Pirassununga), P6,7 (Botucatu) e P8,9,10 (Jaboticabal).

TABELA 8. Resumo das principais características de manejo do rebanho, produção e instalações das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.

Características	P1¹	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
Nº de ordenhas/dia	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Lavagem dos tetos	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
Secagem dos tetos	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
Prova de Tamis	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Realização do CMT/CCS	Mensalmente	Mensalmente	Mensalmente	Mensalmente	Mensalmente	Mensalmente	Mensalmente	Não	Não	Não
Pré-dipping	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
Pós-dipping	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
Alimentação pós-ordenha	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Tipo de secagem	Abrupto	Abrupto	Intermitente	Intermitente	Abrupto	Abrupto	Abrupto	Intermitente	Intermitente	Intermitente
Ambiente período seco	Pasto	Confinamento	Confinamento	Confinamento	Confinamento	Confinamento	Confinamento	Confinamento	Confinamento	Pasto
Utilização de antibiótico no período seco	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
Tipo de tratamento mastite	AS ³	VI ⁴	VI ⁴	VI ⁴	AS ³	AS ³	AS ³	AS ³	AS ³	AS ³
Registro dos dados dos animais	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Assistência Veterinária	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Presença de outros problemas no rebanho	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Classificação Geral ²	B	B	B	B	B	B	B	C	C	C

¹ P1(São José do Rio Preto), P2 (São Carlos), P3 (Limeira), P4 (Guaratinguetá), P5 (Pirassununga), P6,7 (Botucatu) e P8,9,10 (Jaboticabal); ² Classificação das propriedades de acordo com os métodos e condições gerais de ordenha: A (Condições satisfatórias de ordenha), B (Condições Regulares de ordenha) e C (Condições ruins de ordenha); ³ AS: Associação entre a via intramamária e sistêmica (intravenosa, intramuscular ou subcutânea); ⁴ VI: Via intramamária.

5.2 California mastitis test (CMT)

Foram avaliadas pelo CMT amostras de 513 metades mamárias e dos 10 tanques de expansão, das propriedades estudadas. Nenhuma das amostras mostrou-se negativa a prova do CMT.

As distribuições dos escores do CMT nas 513 metades mamárias foram: 1+: 219 (42,69%), 2+: 152 (29,63%) e 3+: 142 (27,68%). Com relação aos resultados do CMT nos 10 tanques de expansão das propriedades encontrou-se: 3+: 6 (60%), 2+: 3 (30%) e 1+: 1 (10%) (**Tabela 9**).

TABELA 9. Resultados do CMT das metades mamárias e dos tanques de expansão das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.

Propriedades ¹	Negativo		1+*		2+		3+		Tanque de Expansão
	N	%	N	%	N	%	N	%	
1	0	0	21	34,43	23	37,70	17	27,87	1+
2	0	0	30	42,86	18	25,71	22	31,43	3+
3	0	0	16	36,36	17	38,64	11	25,00	2+
4	0	0	15	30,00	19	38,00	16	32,00	3+
5	0	0	9	19,57	14	30,43	23	50,00	3+
6	0	0	50	65,79	12	15,79	14	18,42	2+
7	0	0	12	30,00	12	30,00	16	40,00	2+
8	0	0	31	67,39	13	28,26	2	4,35	3+
9	0	0	17	42,50	12	30,00	11	27,50	3+
10	0	0	18	45,00	12	30,00	10	25,00	3+
Total	0	0	219	42,69	152	29,63	142	27,68	

*Classificação dos escores do CMT: 0 (ausência de grumos), 1+ (formação de grumos), 2+ (gelificação discreta), 3+ (gelificação total); ¹P1(São José do Rio Preto), P2 (São Carlos), P3 (Limeira), P4 (Guaratinguetá), P5 (Pirassununga), P6,7 (Botucatu) e P8,9,10 (Jaboticabal).

A média da CCS automática e microscópica aumentaram segundo o escore do CMT, sendo a maior média da CCS automática e microscópica no escore 3+ (**Tabela 10**).

TABELA 10. Média, Mediana e Desvio Padrão da CCS automática e microscópica por escore do CMT das amostras de leite das metades mamárias das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.

CCS (Células/mL)	CMT Metade Mamária		
	1+ ¹	2+	3+
N	219	152	142
Automático			
Média	642.821,9	1.208.427,6	3.701.366,2
Mediana	205.000,0	631.500,0	1.956.500,0
Desvio Padrão	1.156.757,5	155.1047,2	3.771.273,8
Média (Log10) ²	5,3 ^a	5,6 ^b	6,1 ^c
Desvio Padrão (Log10)	0,7	0,8	0,9
Microscópio			
Média	307.535,9	583.070,4	1.918.049,3
Mediana	102.478,0	317.700,0	812.947,0
Desvio Padrão	551.931,9	790.935,2	2.283.473,8
Média (Log10) ³	5,0 ^a	5,3 ^b	5,8 ^c
Desvio Padrão (Log10)	0,7	0,8	0,8

¹Classificação dos escores do CMT: 0 (ausência de grumos), 1+ (formação de grumos), 2+ (gelificação discreta), 3+ (gelificação total); ^{2,3}Letras diferentes dentro da mesma linha significa diferença estatística entre as médias (P<0,05).

A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) do CMT das metades mamárias tendo como referência o cultivo microbiano, variaram entre os pontos de corte 2+ e 3+. A sensibilidade variou entre 30,34% para o escore 3+ e 68,54% para o escore 2+. A especificidade variou entre 48,66% para o escore 2+ e 73,73% para o escore 3+. O VPP variou entre 38,03% para o escore 3+ e 41,5% para o escore 2+, enquanto que o VPN variou entre 66,58% para o escore 3+ e 74,43% para o escore 2+ (**Tabela 11**).

TABELA 11. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo do CMT das metades mamárias tendo como referência o cultivo microbiano das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.

Ponto de Corte (CMT Metade Mamária)	Sensibilidade	Especificidade	Valor Preditivo Positivo	Valor Preditivo Negativo
2+	68,54%	48,66%	41,50%	74,43%
3+	30,34%	73,73%	38,03%	66,58%

5.3 Contagem eletrônica e microscópica de células somáticas

A prevalência de mastite subclínica determinada pela CCS automática e microscópica (ponto de corte: 1×10^6) não foi homogênea entre as propriedades ($P < 0,01$). No entanto, não houve diferença estatística entre a prevalência da CCS automática 42% (108/257) e microscópica 49,7% (127/257) nas amostras de leite composta (**Tabela 12**).

TABELA 12. Prevalência de mastite subclínica com base na CCS automática e microscópica nas amostras de leite compostas das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.

Propriedades	Municípios	N	Animais Examinados			
			CCS automática		CCS microscópica	
			Positivos		Positivos	
			N	% ¹	N	% ¹
1	S.J. Rio Preto	31	20	64,52	18	58,06
2	São Carlos	35	26	74,29	27	77,14
3	Limeira	22	16	72,73	13	59,09
4	Guaratinguetá	25	13	52,00	18	72,00
5	Pirassununga	23	14	60,87	7	30,43
6	Botucatu	38	6	15,79	9	23,68
7	Botucatu	20	8	40,00	5	25,00
8	Jaboticabal	23	3	13,40	11	47,83
9	Jaboticabal	20	1	5,00	6	30,00
10	Jaboticabal	20	1	5,00	13	65,00
Total		257	108	42,00^a	127	49,40^a

¹ $P < 0,01$ para o teste de homogeneidade de prevalência entre as propriedades; ^aLetras iguais dentro da mesma linha não significam diferença estatística entre as prevalências ($P > 0,05$).

Na CCS automática a maior prevalência de mastite subclínica a nível de cabra foi encontrada na propriedade 2 (São Carlos) 74,29% (26/35) e a menor nas propriedades 9 e 10 (Jaboticabal), ambas com 5% (1/20). A maior prevalência de mastite subclínica nas metades mamárias foi encontrada na propriedade 3 (Limeira) 72,73% (32/44) e a menor nas propriedade 9 e 10 (Jaboticabal) ambas com 2,5% (1/40) (**Tabela 13**).

As prevalências de mastites subclínicas determinadas pela CCS automática nas populações de cabras e nas metades mamárias não foram homogêneas entre as propriedades ($P < 0,01$). Não houve diferença estatística entre a prevalência da CCS automática em nível de cabras 42% (108/257) e metades mamárias 36,25% (186/513) nas amostras de leite compostas (**Tabela 13**).

TABELA 13. Prevalência de mastite subclínica segundo a CCS automática das amostras de leite compostas das cabras e das metades mamárias das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.

Propriedades	Municípios	Animais Examinados	Positivos		Total Metades Mamárias	Positivos	
			N	% ¹		N	% ¹
1	S.J. Rio Preto	31	20	64,52	61	38	62,29
2	São Carlos	35	26	74,29	70	43	61,43
3	Limeira	22	16	72,73	44	32	72,73
4	Guaratinguetá	25	13	52,00	50	20	40,00
5	Pirassununga	23	14	60,87	46	28	60,87
6	Botucatu	38	6	15,79	76	6	7,89
7	Botucatu	20	8	40,00	40	14	35,00
8	Jaboticabal	23	3	13,40	46	3	6,52
9	Jaboticabal	20	1	5,00	40	1	2,50
10	Jaboticabal	20	1	5,00	40	1	2,50
Total		257	108	42,00^a	513	186	36,25^a

¹ $P < 0,01$ para o teste de homogeneidade de prevalência entre as propriedades; ^aLetras iguais dentro da mesma linha não significa diferença estatística entre as prevalências ($P > 0,05$).

A maior prevalência de mastite subclínica em nível de cabra foi na propriedade 2 (São Carlos) 77,14% (27/35) e a menor na propriedade 7 (Botucatu) 25% (5/20). A maior prevalência nas metades mamárias foi na propriedade 3 (Limeira) 77,27% (34/44) e a menor nas propriedade 9 e 10 (Jaboticabal) ambas com 2,5% (1/40) (**Tabela 14**).

As prevalências de mastite subclínica pela CCS microscópica na população de cabras e nas metades mamárias não foram homogêneas entre as propriedades ($P<0,01$). No entanto, houve diferença estatística ($P<0,05$) entre a prevalência em nível de cabras 49,5% (127/257) e nas metades mamárias 40,20% (206/513) (**Tabela 14**).

A prevalência de mastites em nível de cabra foi maior que para metades mamárias, em média 1,6 (206/127) metades mamárias infectadas por animal (**Tabela 14**).

TABELA 14. Prevalência de mastite subclínica segundo a CCS microscópica das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.

Propriedades	Municípios	Animais Examinados	Positivos		Total Metades Mamárias	Positivos	
			N	% ¹		N	% ¹
1	S.J. Rio Preto	31	18	58,06	61	45	73,77
2	São Carlos	35	27	77,14	70	45	64,29
3	Limeira	22	13	59,09	44	34	77,27
4	Guaratinguetá	25	18	72,00	50	23	46,00
5	Pirassununga	23	7	30,43	46	29	63,04
6	Botucatu	38	9	23,68	76	8	10,53
7	Botucatu	20	5	25,00	40	16	40,00
8	Jaboticabal	23	11	47,83	46	4	8,70
9	Jaboticabal	20	6	30,00	40	1	2,50
10	Jaboticabal	20	13	65,00	40	1	2,50
Total		257	127	49,40^a	513	206	40,20^b

¹ $P<0,01$ para o teste de homogeneidade de prevalência entre as propriedades; ^aLetras diferentes dentro da mesma linha significam diferença estatística entre as prevalências ($P<0,05$).

A CCS automática do tanque de expansão por propriedade variou entre 820.000 células/mL e 5.855.000 células/mL, e a CCS microscópica variou entre 257.000 células/mL e 1.986.580 células/mL. A CBT variou entre os tanques de expansão entre 104.000 UFC/mL e 2.410.000 UFC/mL. Não houve correlação entre a CCS automática e a CBT do leite do tanque ($r=0,06$; $P=0,34$). No CMT, os escores variaram entre 1+ e 3+, sendo que 6 (60%) tanques de expansão apresentaram escore 3+, 3 (30%) escore 2+ e 1 (10%) escore 1+ (**Tabela 15**).

TABELA 15. CCS automática, microscópica, CBT e CMT das amostras de leite dos tanques de expansão das 10 propriedades. Botucatu, SP, 2013.

Propriedades ¹	CMT Tanque	CCS Automático Tanque	CCS Microscópico Tanque	CBT Tanque
1	1+	820.000,00	296.014,00	286.000,00
2	3+	944.000,00	317.452,00	104.000,00
3	2+	5.855.000,00	1.986.580,00	171.000,00
4	3+	1.782.000,00	813.081,00	2.410.000,00
5	3+	2.429.000,00	1.180.752,00	257.000,00
6	2+	983.000,00	275.146,00	1.321.000,00
7	2+	1.620.000,00	693.274,00	680.000,00
8	3+	1.110.000,00	425.291,00	710.000,00
9	3+	1.360.000,00	525.214,00	410.000,00
10	3+	1.840.000,00	713.648,00	370.000,00

¹P1(São José do Rio Preto), P2 (São Carlos), P3 (Limeira), P4 (Guaratinguetá), P5 (Pirassununga), P6,7 (Botucatu) e P8,9,10 (Jaboticabal).

Não houve correlação entre a prevalência de mastite subclínica e a CCS automática do tanque ($r=-0,07$; $P=0,28$). A maior prevalência da CCS automática na população de cabras foi de 74,29% (26/35) na propriedade 1 (São José do Rio Preto), sendo que nesta propriedade foi encontrada a menor CCS automática do tanque de expansão 820.000 células/mL. A maior CCS automática do tanque de expansão foi 5.855.000 células/mL sendo encontrada na propriedade 3 (Limeira), não correspondendo com a menor prevalência de mastite subclínica 5% (1/20) encontradas identicamente nas propriedade 9 e 10 (Jaboticabal) (**Tabela 16**).

TABELA 16. Prevalência de mastite subclínica pela CCS automática em amostras de leite compostas em nível de cabra e CCS automática do tanque de expansão das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.

Propriedades ¹	N	Animais Examinados (CCS automática)		CCS Automática Tanque
		N	%	
1	31	20	64,52	820.000,00
2	35	26	74,29	944.000,00
3	22	16	72,73	5.855.000,00
4	25	13	52,00	1.782.000,00
5	23	14	60,87	2.429.000,00
6	38	6	15,79	983.000,00
7	20	8	40,00	1.620.000,00
8	23	3	13,40	1.110.000,00
9	20	1	5,00	1.360.000,00
10	20	1	5,00	1.840.000,00
Total	257	108	42,00	

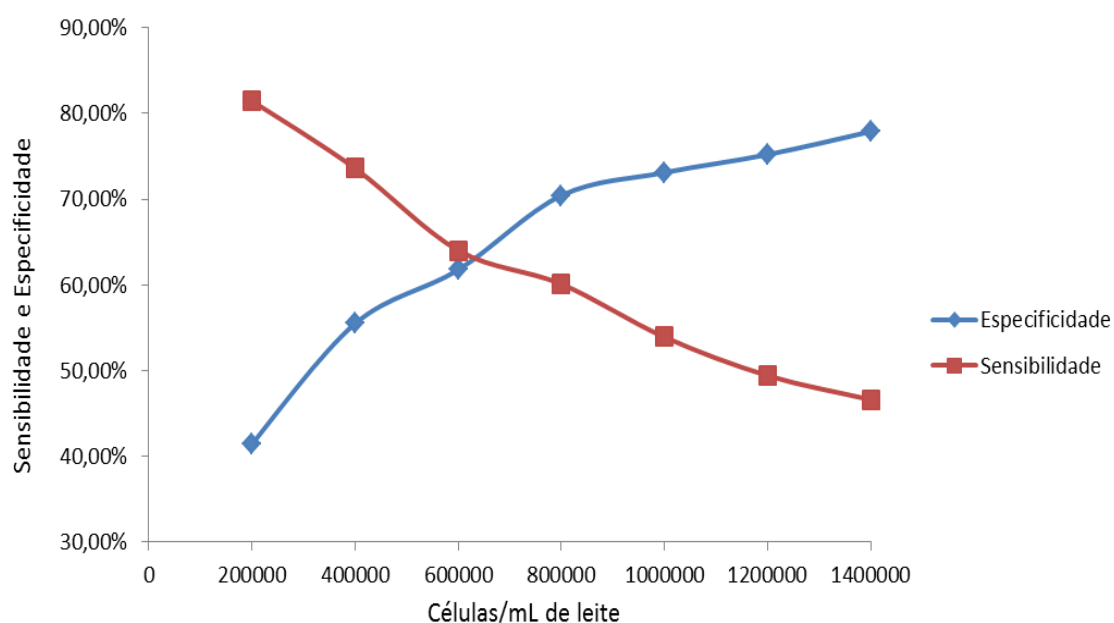
¹P1(São José do Rio Preto), P2 (São Carlos), P3 (Limeira), P4 (Guaratinguetá), P5 (Pirassununga), P6,7 (Botucatu) e P8,9,10 (Jaboticabal).

A sensibilidade, especificidade, VPP e VPN da CCS automática variaram entre os pontos de corte 200.000 e 1.400.000 células/mL. A sensibilidade variou entre 46,63% e 81,46%, especificidade entre 41,49% e 77,91%, VPP entre 73,31% e 80,81% e VPN entre 42,52% e 52,87% (**Tabela 19**). A maximização simultânea da sensibilidade e especificidade foi encontrada no ponto de corte de 600.000 células/mL com sensibilidade de 64,04% e especificidade 61,79% (**Gráfico 1**).

TABELA 17. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo da CCS automática das metades mamárias das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.

Ponto de Corte (Células/mL)	Sensibilidade	Especificidade	Valor Preditivo Positivo	Valor Preditivo Negativo
200.000	81,46%	41,49%	80,81%	42,52%
400.000	73,60%	55,52%	79,83%	46,79%
600.000	64,04%	61,79%	76,38%	47,11%
800.000	60,11%	70,45%	76,87%	51,94%
1.000.000	53,93%	73,13%	74,92%	51,61%
1.200.000	49,44%	75,22%	73,68%	51,46%
1.400.000	46,63%	77,91%	73,31%	52,87%

GRÁFICO 1. Sensibilidade e especificidade para diferentes pontos de corte da CCS automática para diagnóstico de infecção intramamária. Botucatu, SP, 2013.



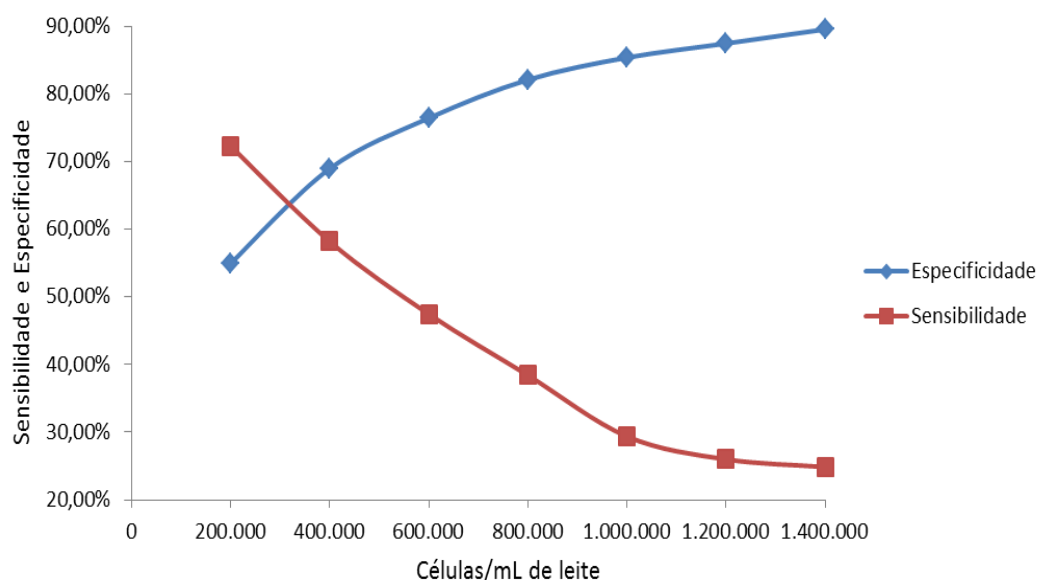
A sensibilidades, especificidades, VPP e VPN da CCS microscópica variaram entre os pontos de corte 200.000 e 1.400.000 células/mL. A sensibilidade variou entre 24,86% e 72,32%, especificidade variou entre 54,93% e 89,55%, VPP variou entre 69,28% e 78,97% e o VPN variou entre 45,88% e 55,70%. **(Tabela 18).** A maximização da sensibilidade e

especificidade foi encontra no ponto de corte de 400.000 células/mL de leite com sensibilidade de 58,19% e especificidade 68,96% (**Gráfico 2**).

TABELA 18. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo da CCS microscópica das metades mamárias das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.

Ponto de Corte (Células/mL)	Sensibilidade	Especificidade	Valor Preditivo Positivo	Valor Preditivo Negativo
200.000	72,32%	54,93%	78,97%	45,88%
400.000	58,19%	68,96%	75,74%	49,76%
600.000	47,46%	76,42%	73,35%	51,53%
800.000	38,42%	82,09%	71,61%	53,13%
1.000.000	29,38%	85,37%	69,59%	51,49%
1.200.000	25,99%	87,46%	69,10%	52,27%
1.400.000	24,86%	89,55%	69,28%	55,70%

GRÁFICO 2. Sensibilidade e especificidade para diferentes pontos de corte da CCS microscópica para diagnostico de infecção intramamária. Botucatu, SP, 2013.



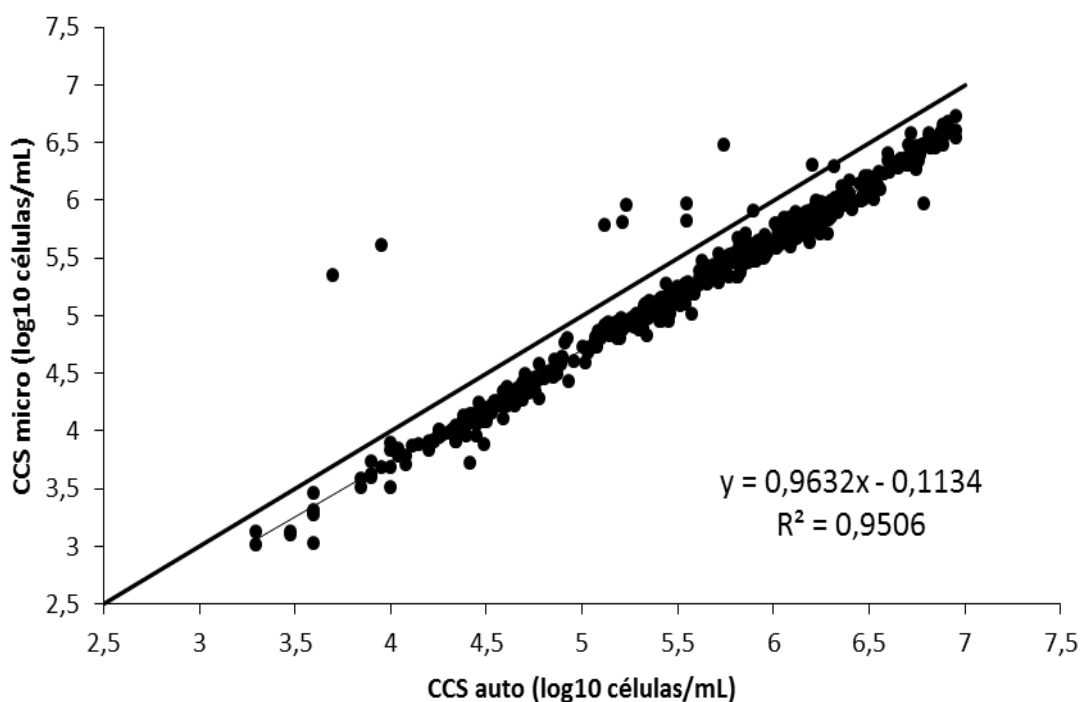
Para determinar a associação entre a CCS automática e microscópica foram excluídos os resultados das amostras de leite das metades mamárias

com CCS >10.000.000 células/mL, sendo o limite máximo para que os dados não fossem truncados.

Houve uma associação de grande magnitude entre a CCS automática e microscópica ($R^2 = 0,95$; $P < 0,0001$) (**Gráfico 3**). Entretanto, em média, a CCS automática (média geométrica: 404.948 células/mL) foi 2,1 vezes maior que a CCS microscópica (média geométrica: 195.209 células/mL).

A equação linear de previsão da CCS microscópica, usando os valores da CCS automática foi $y = 0,9632x - 0,1134$.

GRÁFICO 3. Regressão linear da CCS automática e microscópica. A linha sólida central indica concordância perfeita entre as variáveis. Botucatu, SP, 2013.



5.4 Lactocultura

Foram examinadas pelos testes de triagem (prova de Tamis e CMT), 257 cabras em lactação, perfazendo um total de 514 metades mamárias avaliadas, sendo apenas uma metade mamária perdida na propriedade 1 (São José do Rio Preto). Foram realizados exames microbianos em 513 amostras de leite das metades mamárias, que apresentaram reações positivas ao CMT assim como determinação da CCS.

Nenhuma amostra foi negativa ao CMT ou mostrou-se contaminada, sendo que 34,7% (178/513) apresentaram crescimento bacteriano e 65,3% (335/513) foram negativas a lactocultura.

A prevalência de mastite subclínica em todas as cabras (população de cabras), pela lactocultura foi de 43,6% (112/257) e de mastite clínica 5,84% (15/257). Nas metades mamárias a prevalência de mastite subclínica na lactocultura foi de 34,7% (178/513) e de mastite clínica 2,92% (15/513). Na mastite subclínica tem-se em média 1,6 (178/112) metades mamárias infectadas por cabra (**Tabela 19**).

As prevalências de mastites subclínicas e clínicas em nível de cabras e metades mamárias não foram homogêneas entre as propriedades ($P < 0,01$), variando as prevalências de mastites subclínicas na população de cabras entre 23,68% e 68% e nas metades mamárias entre 14,5% e 58,6%. As prevalências de mastites clínicas na população de cabras variaram entre 4% e 34,28% e nas metades mamárias entre 2% e 17,14% (**Tabela 19**).

TABELA 19. Prevalência de mastite caprina pelo cultivo microbiano nas 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.

Propriedades	Municípios	N	Animais Examinados				N	Metades Mamárias Examinadas			
			Mastite Clínica		Mastite Subclínica			Mastite Clínica		Mastite Subclínica	
			N	%*	N	%*		N	%*	N	%*
1	S.J. Rio Preto	31	0	0	18	58,06	61	0	0	22	36,1
2	São Carlos	35	12	34,28	15	42,86	70	12	17,14	41	58,6
3	Limeira	22	2	8,00	11	50,00	44	2	4,54	22	50,0
4	Guaratinguetá	25	1	4,00	17	68,00	50	1	2	29	58,0
5	Pirassununga	23	0	0	7	30,43	46	0	0	7	15,2
6	Botucatu	38	0	0	9	23,68	76	0	0	11	14,5
7	Botucatu	20	0	0	5	25,00	40	0	0	6	15,0
8	Jaboticabal	23	0	0	11	47,83	46	0	0	15	32,6
9	Jaboticabal	20	0	0	6	30,00	40	0	0	8	20,0
10	Jaboticabal	20	0	0	13	65,00	40	0	0	17	42,5
Total		257	15	5,84	112	43,60	513	15	2,92	178	34,7

*P<0,01 para o teste de homogeneidade de prevalência entre as propriedades.

5.5 Micro-organismos isolados

Das 178 metades mamárias positivas, os patógenos mais prevalentes foram: 123 (70%) Estafilococos coagulase-negativos, 24 (13,5%) *S. aureus*, 14 (7,9%) *S. intermedius* e 7 (4%) Enterobacteriaceae (**Tabela 20**).

TABELA 20. Frequência dos patógenos isolados nas metades mamárias das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.

Patógenos	N	%
Enterobacteriaceae	7	1,40
<i>Corynebacterium</i> spp.	3	0,60
<i>Micrococcus</i> spp.	1	0,20
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	1	0,20
<i>S. aureus</i>	24	4,70
<i>S. hyicus</i>	3	0,60
<i>S. intermedius</i>	14	2,73
<i>S. lutrae</i>	1	0,20
ECN	123	24,00
<i>Streptococcus</i> spp.	1	0,20
Negativas	335	65,30
Positivas	178	34,70
Total	513	100,00%

Dentre as 513 metades mamárias avaliadas os patógenos mais isolados foram: 132 (24%) ECN, 24 (4,7%) *S. aureus*, 14 (2,73%) *S. intermedius*, 7 (1,4%) Enterobacteriaceae, 3 (0,6%) *Corynebacterium* spp. e 3 (0,6%) *S. hyicus* (**Tabela 20**).

Entre as propriedades a frequência de ECN variou entre 2,5% e 50%, *S. intermedius* entre 1,4% e 13,1%, *S. aureus* entre 1,3% e 12,9%, Enterobacteriaceae entre 1,6% e 5%, *Corynebacterium* spp. entre 2,2% e 2,5%, e *S. hyicus* entre 2,5% e 3,4%. As distribuições dos patógenos isolados das amostras de leite das metades mamárias não foram homogêneas entre as propriedades ($P < 0,01$) (**Tabela 21**).

Streptococcus spp. foram isolados apenas na propriedade 8 (Jaboticabal) e *Micrococcus* spp. apenas na propriedade 1 (São José do Rio Preto). Com relação a Enterobacteriaceae foram isoladas com maior frequência nas propriedades 10 (Jaboticabal) 28,6% (2/7) e 6 (Botucatu) 28,6% (2/7) **(Tabela 21)**.

TABELA 21. Distribuição dos patógenos isolados no cultivo microbiano das amostras de leite, das metades mamárias das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.

Patógenos	P1 ¹		P2		P3		P4		P5		P6		P7		P8		P9		P10		Total	
	N	%*	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Enterobacteriaceae	1	1,6	0	0	1	2,3	1	2,0	0	0	2	2,6	0	0	0	0	0	0	2	5,0	7	1,4
<i>Micrococcus</i> spp.	1	1,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,2
<i>Corynebacterium</i> spp.	0	0	0	0	1	2,3	0	0	1	2,2	0	0	0	0	0	0	1	2,5	0	0	3	0,6
ECN	2	3,3	30	42,9	19	43,2	25	50,0	5	10,8	8	10,5	1	2,5	12	26,1	6	15,0	15	37,5	123	24,0
<i>Streptococcus</i> spp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,2	0	0	0	0	1	0,2
<i>S. aureus</i>	7	11,5	9	12,9	1	2,3	2	4,0	1	2,2	1	1,3	3	7,5	0	0	0	0	0	0	24	4,6
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	1	1,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,2
<i>S. hyicus</i>	2	3,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2,5	0	0	3	0,6
<i>S. intermedius</i>	8	13,1	1	1,4	0	0	1	2,0	0	0	0	0	2	5,0	2	4,3	0	0	0	0	14	2,7
<i>S. lutrae</i>	0	0	1	1,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,2
Positivas	22	36,1	41	58,6	22	50,0	29	58,0	7	15,2	11	14,5	6	15,0	15	32,6	8	20,0	17	42,5	178	34,7
Negativas	39	63,9	29	41,4	22	50,0	21	42,0	39	84,8	65	85,5	34	85,0	31	67,4	32	80,0	23	57,5	335	65,3
Total	61		70		44		50		46		76		40		46		40		40		513	100,0

*% do total de patógenos isolados em cada propriedade; ¹P1 (São José do Rio Preto), P2 (São Carlos), P3 (Limeira), P4 (Guaratinguetá), P5 (Pirassununga), P6,7 (Botucatu) e P8,9,10 (Jaboticabal).

Dentre os patógenos isolados, *S. aureus* apresentou a maior mediana na CCS automática 5.228.000,0 células/mL, seguido por *S. hyicus* 1.292.000,0 células/mL, ECN 1.105.000,0 células/mL, *S. intermedius* 791.000,0 células/mL, Enterobacteriaceae 596.000,0 células/mL e *Corynebacterium* spp. 287.000,0 células/mL. Na CCS microscópica o *S. aureus* apresentou maior mediana 2.103.698,0 células/mL, seguido de ECN 493.082,0 células/mL, *Corynebacterium* spp. 401.629,0 células/mL, *S. intermedius* 300.613,0 células/mL, Enterobacteriaceae 297.341,0 células/mL e *S. hyicus* 459.176,0 células/mL (**Tabela 22**).

TABELA 22. Média, Mediana e Desvio Padrão da CCS automática por patógenos isolados das amostras de leite das metades mamárias das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.

Patógenos	CCS automático (Células/mL)						CCS microscópico (Células/mL)				
	N	Média	Mediana	Desvio Padrão	Média (Log10)	Desvio Padrão (Log10)	Média	Mediana	Desvio Padrão	Média (Log10)	Desvio Padrão (Log10)
Enterobacteriaceae	7	2.160.142,9	596.000,0	3.599.658,1	5,9	0,7	1.074.723,4	297.341,0	1.819.641,1	5,5	0,7
<i>Corynebacterium</i> spp.	3	3.432.000,0	287.000,0	5.689.753,0	5,5	1,5	3.077.380,3	401.629,0	4.908.245,3	5,8	1,0
<i>Micrococcus</i> spp.	1*	895.000,0	895.000,0	-	6,0	-	371.200,0	371.200,0	-	5,6	-
Negativa	335	1.270.671,6	293.000,0	2.361.313,4	5,4	0,9	625.540,7	142.074,0	1.272.078,8	5,1	0,8
<i>S. schleiferi</i> subsp <i>coagulans</i>	1*	680.000,0	680.000,0	-	5,8	-	237.651,0	237.651,0	-	5,4	-
<i>S. aureus</i>	24	5.067.541,7	5.228.000,0	3.648.637,0	6,4	0,8	2.746.500,4	2.103.698,0	2.435.842,5	6,1	0,8
<i>S. hyicus</i>	3	1.075.000,0	1.292.000,0	728.168,2	5,9	0,4	394.042,7	459.176,0	226.969,9	5,5	0,3
<i>S. intermedius</i>	14	2.253.000,0	791.000,0	2.647.371,9	5,8	0,9	813.923,2	300.613,0	1.014.823,0	5,4	0,9
<i>S. lutrae</i>	1*	10.000.000,0	10.000.000,0	-	7,0	-	8.277.951,0	8.277.951,0	-	6,9	-
ECN	123	1.846.561,0	1.105.000,0	2.344.823,6	5,9	0,7	905.261,9	493.082,0	1.249.090,8	5,5	0,7
<i>Streptococcus</i> spp.	1*	130.000,0	130.000,0	-	5,1	-	69.283,0	69.283,0	-	4,8	-

*Valores individuais, sendo esses patógenos isolados apenas uma vez.

Foram criados 5 grupos de patógenos: grupo 1 (Enterobacteriaceae), grupo 2 (*Corynebacterium* spp.), grupo 3 (Negativos), grupo 4 (ECN e *Micrococcus* spp.) e grupo 5 (*S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. lutrae* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans*) para determinar a média de CCS automática das metades mamárias por grupo de patógenos isolados no cultivo microbiano. Houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre os grupos 4 e 3, e entre os grupos 5 e 3 (**Tabela 23**).

TABELA 23. Média da CCS automática das metades mamárias por grupo de patógenos isolados das amostras de leite das metades mamárias das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.

Grupo	Patógenos	N	Média*	Desvio Padrão	Média Geométrica
1	Enterobacteriaceae	7	5,87 ^{ab}	0,67	745.418,42
2	<i>Corynebacterium</i> spp.	3	5,47 ^{ab}	1,52	295.596,98
3	Negativos	335	5,43 ^a	0,85	271.456,34
4	ECN <i>Micrococcus</i> spp.	124	5,86 ^b	0,72	727.612,24
5	<i>S. aureus</i> <i>S. intermedius</i> <i>S. hyicus</i> <i>S. lutrae</i> <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	43	6,20 ^b	0,82	1.604.353,25

* Letras diferentes na mesma coluna significa diferença estatística entre as médias ($P < 0,05$).

5.6 Multiplex-PCR

Inicialmente, realizou-se PCR específica para cada um dos agentes utilizando-se os primers e protocolo descritos por Chótar et al. (2006), que utiliza uma temperatura de anelamento de 55°C. Ao analisar a eficiência dos primers na detecção do agente em amostras de água (**Figura 5**) e em amostras de leite caprino (**Figura 6**) contaminadas, observou-se que os primers SAU1 e SAU2, SAGA1 e SAGA2, e Ecol1 e Ecol2 detectaram até 10^0 bactéria/mL⁻¹ em água, porém ao se analisar em amostras de leite contaminadas, os mesmos primers detectaram um mínimo de 10^2 bactérias *S. aureus*/mL⁻¹, 10^4 bactérias *S. agalactiae*/mL⁻¹, e 10^0 bactéria *E. coli*/mL⁻¹. A baixa sensibilidade analítica observada para *S. aureus* e *S. agalactiae* pode ser sugerida pela baixa frequência de cópias das regiões flanqueadas pelos primers SAU1 e SAU2, e SAGA1 e SAGA2, utilizados no trabalho descrito de Chótar et al. (2006).

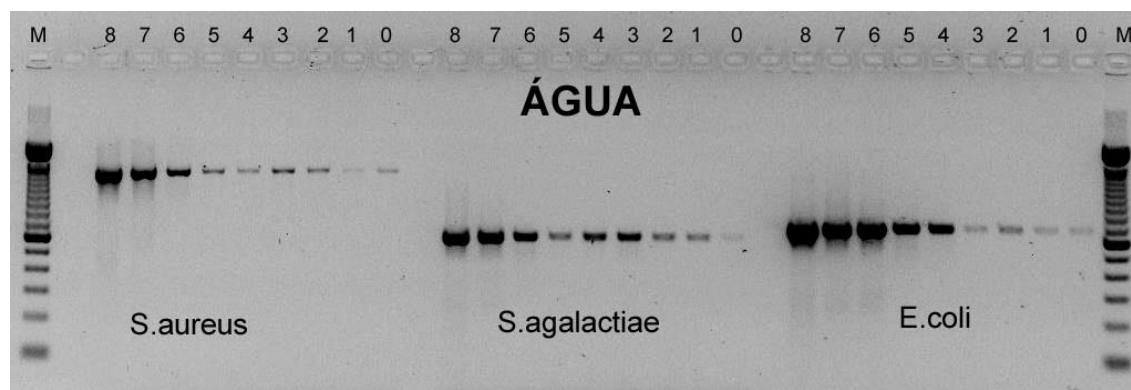


FIGURA 5. Limiar de detecção (10^8 a 10^0) utilizando-se isoladamente os primers SAU1 e SAU2, SAGA1 e SAGA2, Ecol1 e Ecol2 a para a detecção de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*, respectivamente, em água, de acordo com o protocolo de Chótar et al. (2006). M: padrão de peso molecular (100 pares de bases).

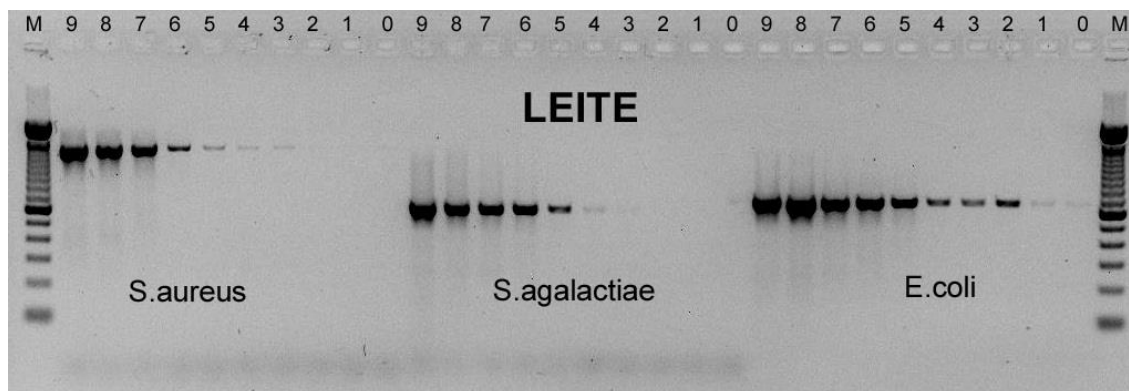


FIGURA 6. Limiar de detecção (10^9 a 10^0) utilizando-se isoladamente os primers SAU1 e SAU2, SAGA1 e SAGA2, Ecol1 e Ecol2 a para a detecção de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*, respectivamente, em amostra de leite caprino, de acordo com o protocolo de Chótar et al. (2006). M: padrão de peso molecular (100 pares de bases).

Com base no exposto, testou-se os primers STAUR4 e STAUR6, descritos por Straub et al. (1999) para a detecção de *S. aureus*, e SIP3 e SIP4 descritos por Chótar et al. (2006) para a detecção de *S. agalactiae*. Chótar et al. (2006) padronizaram o protocolo de multiplex-PCR previamente utilizado, e na tentativa de reutilizar o mesmo protocolo modificando-se os primers específicos para *S. aureus* e *S. agalactiae*, testou-se gradiente de temperatura de anelamento, visto que a temperatura de anelamento utilizada por Straub et al. (1999) para STAUR4 e STAUR6 foi de 64°C , considerada muito elevada em relação a temperatura utilizada por Chótar et al. (2006), com 55°C (**Figuras 7 a 9**). Observou-se que isoladamente, testando-se concentrações de 10^6 bactérias/mL⁻¹, o mesmo padrão de amplificação foi obtido em todas as temperaturas testadas.

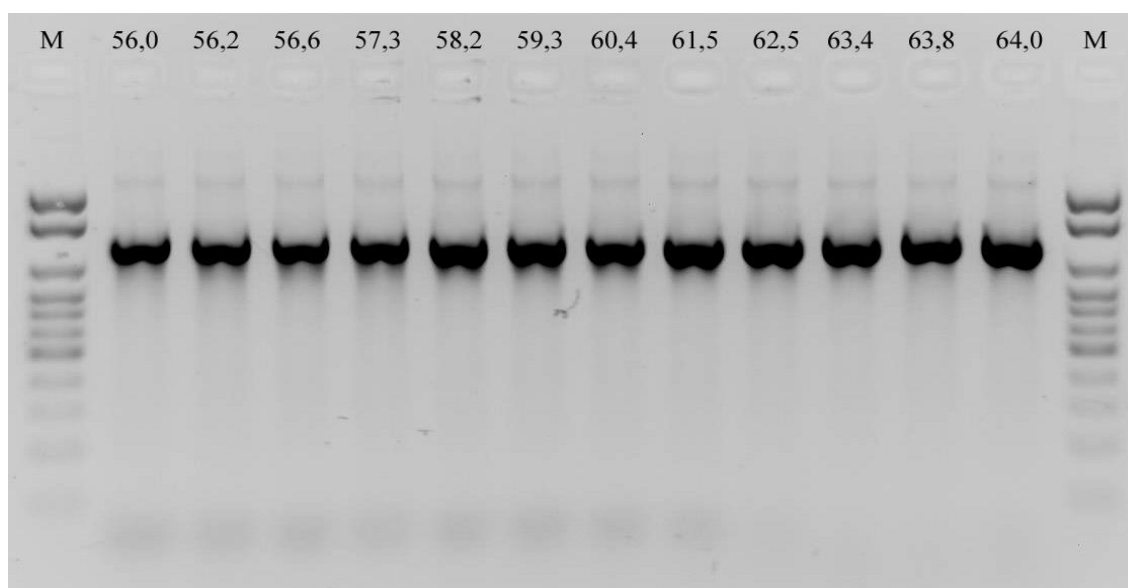


FIGURA 7. Gradiente de temperatura utilizando-se somente os primers STAUR4 e STAUR6 (10 μ M) para a detecção de *S. aureus* em amostra de leite caprino. M: padrão de peso molecular (100 pares de bases).

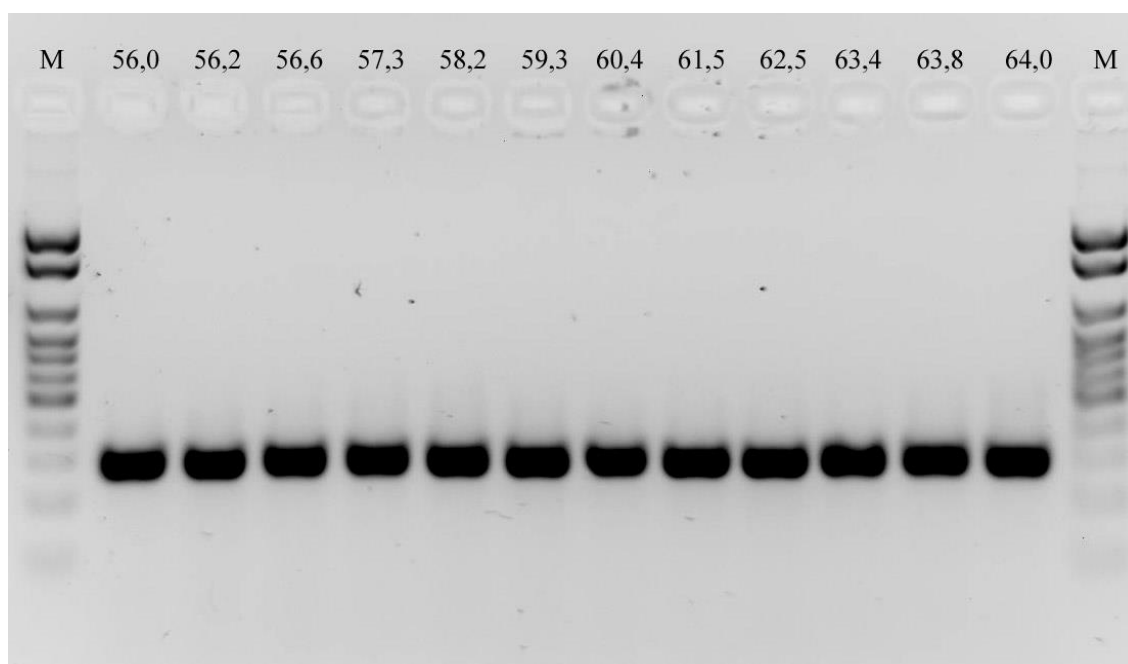


FIGURA 8. Gradiente de temperatura utilizando-se somente os primers SIP1 e SIP2 (10 μ M) para a detecção de *S. agalactiae*. M: padrão de peso molecular (100 pares de bases).

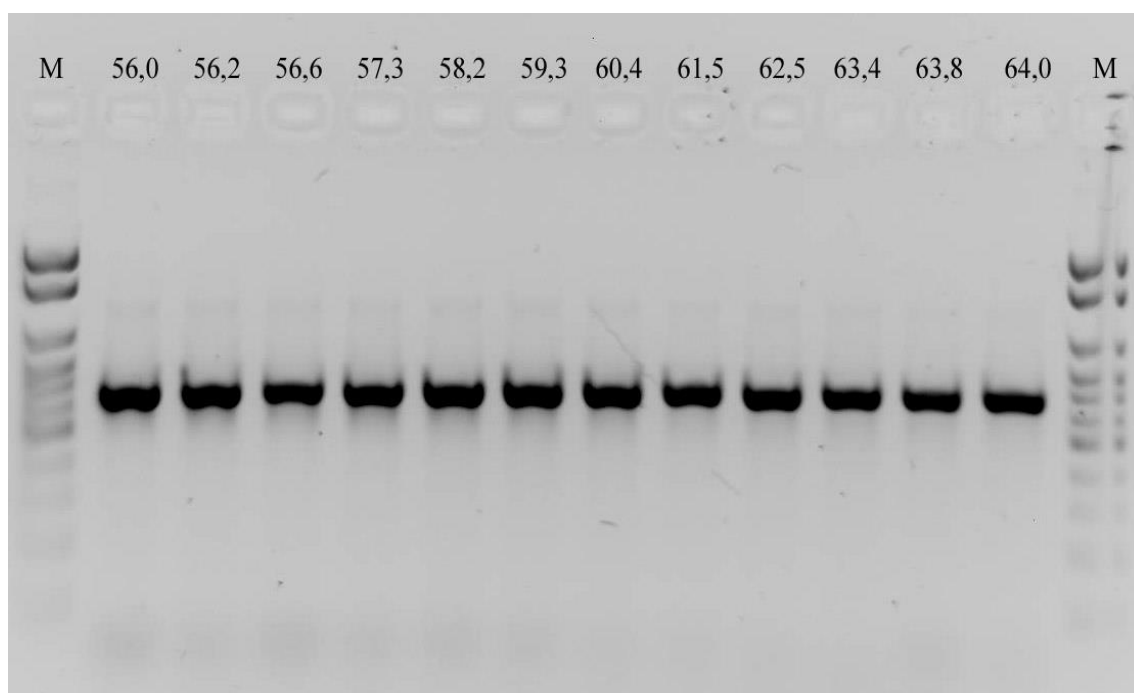


FIGURA 9. Gradiente de temperatura utilizando-se somente os primers Ecol1 e Ecol2 (10 μ M) para a detecção de *E. coli* em amostra de leite caprino. M: padrão de peso molecular (100 pares de bases).

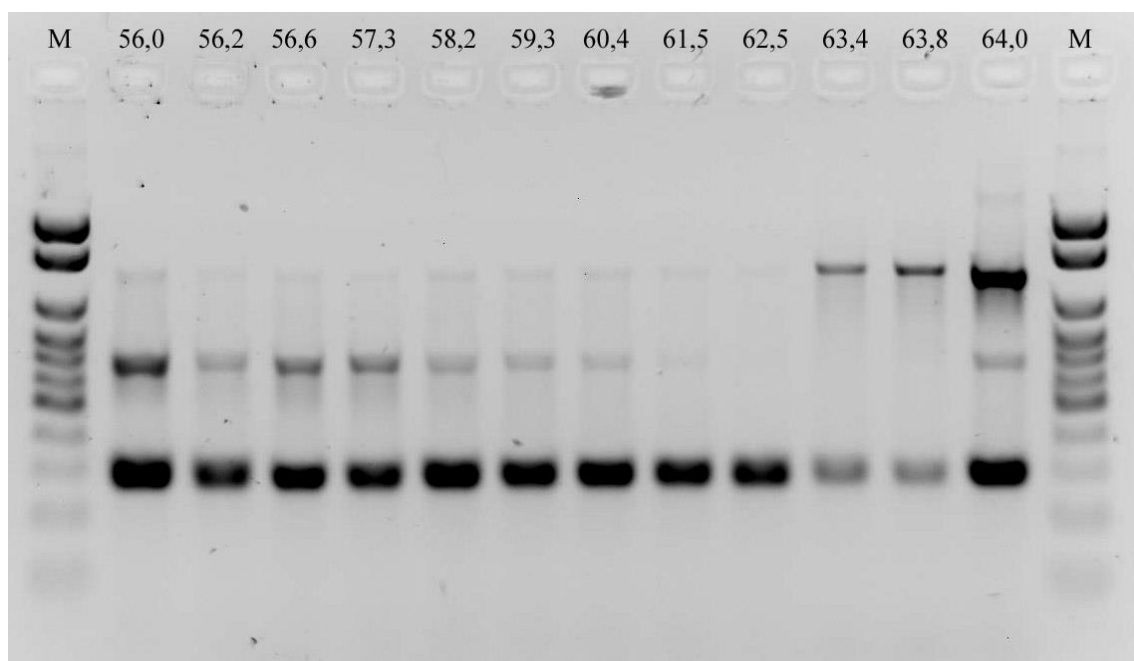


FIGURA 10. Gradiente de temperatura utilizando-se os primers STAUR4 e STAUR6, SIP1 e SIP2, e Ecol1 e Ecol2 (10 μ M) para a detecção em multiplex-PCR de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*, respectivamente, em amostra de leite caprino. M: padrão de peso molecular (100 pares de bases).

Porém ao se analisar o gradiente de temperatura com todos os três pares de primers juntos (STAUR4 e STAUR6, SIP3 e SIP4, e Ecol1 e Ecol2) e

os três agentes presentes na concentração de 10^7 bactérias/mL⁻¹, observou-se que a temperatura de anelamento com melhor resultado na detecção simultânea dos três agentes foi a de 64°C (**Figura 10**), como já descrito por Straub et al. (1999) para a detecção pelo STAUR4 e STAUR6.

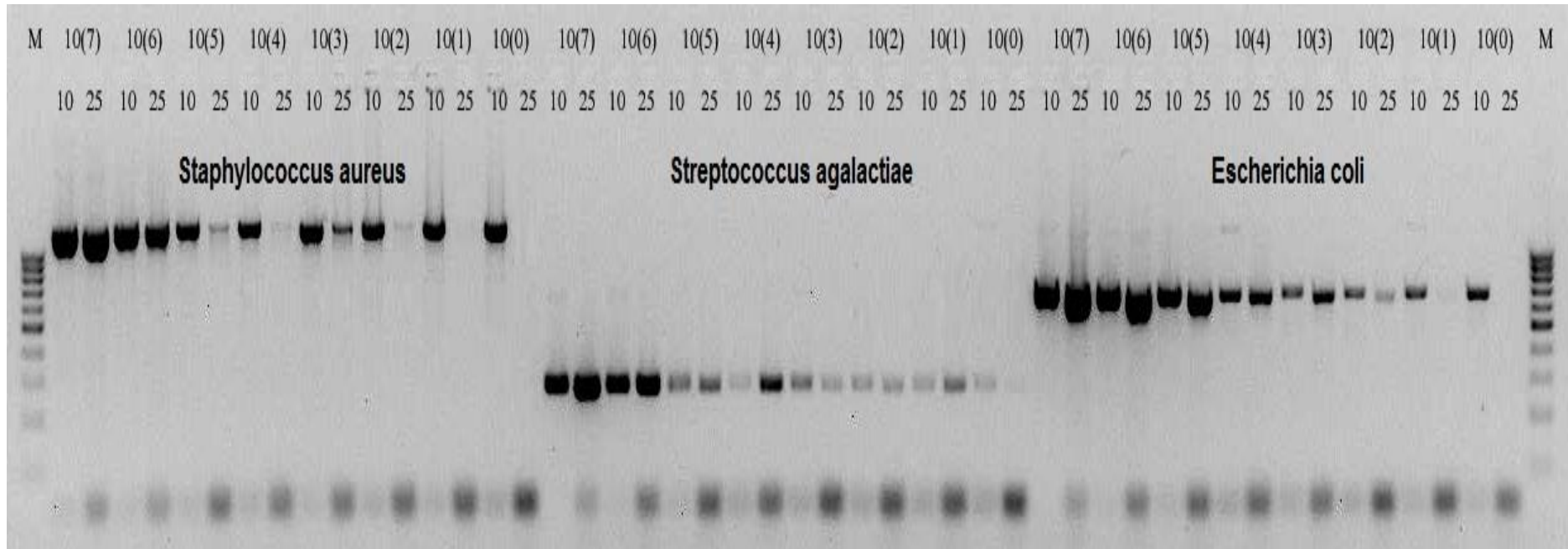


FIGURA 11. Limiar de detecção (10^7 a 10^0) utilizando-se isoladamente os primers STAUR4 e STAUR6, SIP3 e SIP4, Ecol1 e Ecol2 em concentrações diferentes: 10 μ M, de acordo com Straub et al. (1999); 25 μ M, de acordo com Chótar et al. (2006), em amostra de leite caprino, utilizando-se o protocolo de PCR descrito por Straub et al. (1999). M: padrão de peso molecular (100 pares de bases).

Utilizando-se os primers STAUR4 e STAUR6, SIP3 e SIP4, e Ecol1 e Ecol2, e comparando-se as concentrações de primers utilizadas, observou-se que a utilização de primers em menores concentrações (10 μ M), como observado por Straub et al. (1999), apresentou melhores resultados (**Figuras 11 e 12**), obtendo-se uma sensibilidade analítica na detecção de *S. aureus* de até 10⁰ (10 μ M) e 10² (25 μ M) bactérias/mL⁻¹ em amostras de leite caprino. Em relação à detecção de *S. agalactiae*, sensibilidade de até 10⁰ (10 μ M) e 10¹ (25 μ M) bactérias/mL⁻¹ em amostras de leite foi obtida, enquanto que para *E. coli* de até 10⁰ (10 μ M) e 10² (25 μ M) bactérias/mL⁻¹. Outra vantagem observada na detecção de *S. agalactiae* foi em relação ao tamanho das bandas observadas na amplificação com os primers SAGA1 e SAGA2. Esses primers amplificam uma região de 660pb, tamanho próximo e que pode gerar dificuldades na análise do gel de agarose com o amplicon dos primers Ecol1 e Ecol2, de 590pb (**Figuras 5 e 6**). Como os primers SIP3 e SIP4 produzem um amplicon 293pb, esta dificuldade na análise do gel de agarose passa a ser evitada (**Figura 11**).

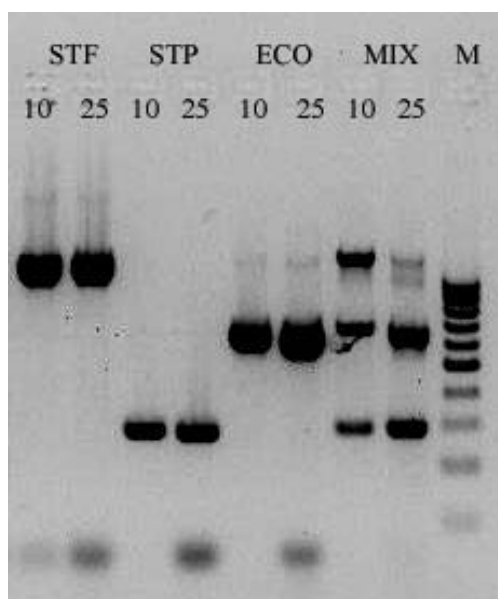


FIGURA 12. Multiplex-PCR com os primers STAUR4 e STAUR6, SIP3 e SIP4, Ecol1 e Ecol2 isolados e em conjunto, utilizando-se diferentes concentrações de primers: 10 μ M, de acordo com Straub et al. (1999); 25 μ M, de acordo com Chótar et al. (2006), em amostra de leite caprino. M: padrão de peso molecular (100 pares de bases).

Da mesma forma como observado na **Figura 11**, mesmo na multiplex-PCR, as concentrações de 10µM apresentaram melhores resultados em comparação aos primers com maior concentração, de 25µM (**Figura 12**).

As prevalências dos patógenos detectados pela multiplex-PCR nas metades mamárias foram: *S. aureus* 9,7% (50/513), *S. agalactiae* 5,5% (28/513) e *E. coli* 16,6% (85/513). As prevalências variaram para *S. aureus* entre 0% e 24,29%, *S. agalactiae* entre 2,27% e 17,39% e *E. coli* entre 0% e 30,15% (**Tabela 24**).

Pela multiplex-PCR foi possível diagnosticar nas amostras de leite das metades mamárias 50 amostras positivas para *S. aureus*, 28 positivas para *S. agalactiae* e 85 positivas para *E. coli*, enquanto que no cultivo microbiano foi possível diagnosticar 24 amostras positivas para *S. aureus*, uma positiva para *Streptococcus* spp. e sete amostras positivas para Enterobacteriaceae (**Tabela 24**).

Das 24 amostras positivas de acordo com o cultivo microbiano, todas foram corretamente diagnosticadas como positivas pela multiplex-PCR (Sensibilidade: 100%). Do total de 463 amostras negativas no cultivo microbiano, 489 foram positivas na multiplex-PCR (Especificidade: 94,68%).

TABELA 24. Distribuição de *S. aureus*, *Streptococcus* spp. e Enterobacteriaceae isolados no cultivo microbiano das metades mamárias e prevalência pela multiplex-PCR de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* nas metades mamárias das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.

P ¹	Análise Microbiológica						Multiplex-PCR					
	<i>S. aureus</i>		<i>Streptococcus</i> spp. ²		Enterobacteriaceae ³		<i>S. aureus</i>		<i>S. agalactiae</i>		<i>E. coli</i>	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
1	7	11,5	0	0	1	1,6	9	14,75	2	3,23	19	30,15
2	9	12,9	0	0	0	0	17	24,29	7	10,00	10	14,29
3	1	2,3	0	0	1	2,3	2	4,55	1	2,27	13	29,55
4	2	4,0	0	0	1	2,0	2	4,00	1	2,00	0	0
5	1	2,2	0	0	0	0	3	6,52	1	2,17	7	15,22
6	1	1,3	0	0	2	2,6	6	7,89	2	2,63	19	25,00
7	3	7,5	0	0	0	0	5	12,50	4	10,00	5	12,50
8	0	0	1	2,2	0	0	4	8,70	8	17,39	2	4,35
9	0	0	0	0	0	0	2	5,00	1	2,50	2	5,00
10	0	0	0	0	2	5,0	0	0	1	2,50	8	20,00
Total	24	4,7	1	0,2	7	1,4	50	9,7	28	5,50	85	16,6

¹P1(São José do Rio Preto), P2 (São Carlos), P3 (Limeira), P4 (Guaratinguetá), P5 (Pirassununga), P6,7 (Botucatu) e P8,9,10 (Jaboticabal).

²No cultivo microbiano a identificação limitou-se ao gênero *Streptococcus* spp.

³No cultivo microbiano a identificação limitou-se a família Enterobacteriaceae.

A prevalência de *S. aureus* nos tanques de expansão foi de 60% (6/10), de *S. agalactiae* 10% (1/10) e de *E. coli* 40% (4/10). A propriedade 2 (São Carlos) foi a única positiva para os três agentes: *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* na multiplex-PCR, enquanto que as propriedades 1 (São José do Rio Preto), 3 (Limeira) e 5 (Pirassununga) foram negativas para todos os agentes (Tabela 25).

TABELA 25. Prevalência de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* no tanque de expansão pela multiplex-PCR das 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.

Propriedades ¹	<i>S. aureus</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>E. coli</i>
1	Negativo	Negativo	Negativo
2	Positivo	Positivo	Positivo
3	Negativo	Negativo	Negativo
4	Positivo	Negativo	Negativo
5	Negativo	Negativo	Negativo
6	Positivo	Negativo	Positivo
7	Positivo	Negativo	Negativo
8	Positivo	Negativo	Positivo
9	Positivo	Negativo	Negativo
10	Negativo	Negativo	Positivo
Total	6	1	4
(%)	60,00	10,00	40,00

¹P1(São José do Rio Preto), P2 (São Carlos), P3 (Limeira), P4 (Guaratinguetá), P5 (Pirassununga), P6,7 (Botucatu) e P8,9,10 (Jaboticabal).

Das 10 propriedades que tiveram as metades mamárias avaliadas pelo cultivo microbiano, em sete foram isolados *S. aureus*, em cinco foram isoladas bactérias da família Enterobacteriaceae e em apenas uma foi isolado *Streptococcus* spp., sendo diagnosticado corretamente pela multiplex-PCR seis tanques de expansão com *S. aureus*, um com *S. agalactiae* e quatro com *E. coli*.

5.7 Fatores de risco para mastite subclínica

Foi observado que as variáveis: tamanho do rebanho, fase de lactação, tipo de instalação, tipo de ordenha, tipo de secagem, ambiente que os animais ficam no período seco e a utilização de antibioticoterapia na secagem, foram associadas à ocorrência de mastite subclínica (**Tabela 26**).

TABELA 26. Análise univariada dos fatores de risco para mastite subclínica nas populações de cabras nas 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.

Variável	N	Positivos (%)	OR	IC(95%)OR	P
Tamanho do rebanho					<0,001
> de 38 animais	91	63 (69,2)		Ref.*	
Até 38 animais	166	64 (38,6)	0,28	0,16-0,48	
Raça					0,3242
Saanen	199	90 (45,2)		Ref.	
Anglo-Nubiana	58	22 (38,0)	1,35	0,7-2,46	
Local de ordenha					0,9261
Plataforma	222	97 (43,7)		Ref.	
Curral	35	15 (43,0)	1,03	0,5-2,12	
Fase de lactação					<0,0001
Inicial	81	76 (94,0)	0,33	0,18-0,58	
Intermediária	154	25 (16,23)	-	-	
Final	22	11 (50,0)	1,06	0,42-2,63	
Tipo de instalação					0,0052
Confinado	199	96 (48,24)		Ref.	
Pasto	58	16 (27,60)	2,44	1,29-4,63	
Tipo de ordenha					0,0499
Manual	82	43 (52,44)		Ref.	
Mecânica	175	69 (39,43)	0,59	0,35-1,00	

*Ref.= Classe de referência.

TABELA 26. (Continuação) Análise univariada dos fatores de risco para mastite subclínica nas populações de cabras nas 10 propriedades estudadas. Botucatu, SP, 2013.

Variável	N	Positivos (%)	OR	IC(95%)OR	P
Lavagem dos tetos					0,5528
Não	98	45 (46,00)		Ref.*	
Sim	159	67 (42,14)	0,85	0,51-1,42	
Secagem dos tetos com papel toalha descartável ou pano esterilizado					0,5528
Não	98	45 (46,00)		Ref.	
Sim	159	67 (42,14)	0,85	0,51-1,42	
Pré-dipping					0,5528
Não	98	45 (46,00)		Ref.	
Sim	159	67 (42,14)	0,85	0,51-1,42	
Pós-dipping					0,5528
Não	98	45 (46,00)		Ref.	
Sim	159	67 (42,14)	0,85	0,51-1,42	
Tipo de secagem					0,0105
Intermitente	110	58 (52,72)		Ref.	
Abrupto	147	54 (36,73)	1,92	1,16-3,17	
Ambiente período seco					0,0056
Pasto	51	31 (61,00)		Ref.	
Confinado	206	81 (39,32)	0,41	0,22-0,78	
Antibioticoterapia no período seco					0,0218
Não	88	47 (53,41)		Ref.	
Sim	169	65 (38,46)	0,54	0,32-0,92	

*Ref.= Classe de referência.

As propriedades foram um fator de confusão para estimativa das associações entre as variáveis e a presença de mastite subclínica, para isso foi realizado o calculo das razões das chances para mastite subclínica ajustadas por propriedade. Observamos o desaparecimento da maioria das associações com diferenças estatísticas significantes entre as variáveis e a presença de mastite subclínica (**Tabela 27**).

TABELA 27. Razão das chances (*Odds Ratio*) para mastite subclínica ajustadas por propriedade. Botucatu, SP, 2013.

Variável	OR	IC(95%)OR	P
Tamanho da rebanho			0,0268
> de 38 animais		Ref. *	
Até 38 animais	0,3	0,10-0,83	
Raça			0,6768
Saanen		Ref.	
Anglo-Nubiana	0,75	0,16-3,6	
Local de ordenha			0,1519
Plataforma		Ref.	
Curral	4,02	0,51-31,82	
Fase de lactação			0,2500
Inicial	1,13	0,15-8,4	
Intermediária	-	-	
Final	0,40	0,01-1,4	
Tipo de instalação			0,0794
Pasto		Ref.	
Confinado	3,33	0,84-13,23	
Tipo de ordenha			0,1405
Mecânica		Ref.	
Manual	2,8	0,66-11,82	

*Ref.= Classe de referência.

TABELA 27. (Continuação) Razão das chances (*Odds Ratio*) para mastite subclínica ajustadas por propriedade. Botucatu, SP, 2013.

Variável	OR	IC(95%)OR	P
Lavagem dos tetos			0,4461
Sim		*Ref.	
Não	1,55	0,44-5,44	
Secagem dos tetos com papel toalha descartável ou pano esterilizado			0,4461
Sim		Ref.	
Não	1,55	0,44-5,44	
Pré-dipping			0,4461
Não		Ref.	
Sim	1,55	0,44-5,44	
Pós-dipping			0,4461
Não		Ref.	
Sim	1,55	0,44-5,44	
Tipo de secagem			0,4085
Intermitente		Ref.	
Abrupto	0,63	1,18-2,15	
Ambiente período seco			0,3771
Pasto		Ref.	
Confinado	0,53	0,11-2,5	
Antibioticoterapia no período seco			0,5779
Sim		Ref.	
Não	1,4	0,38-4,97	

*Ref.= Classe de referência.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1 California mastitis test (CMT)

Todas as 513 amostras de leite das metades mamárias apresentaram resultado positivo ao CMT: 1+ (42,69%), 2+ (29,63%) (152/513) e 3+ (27,68%) **(Tabela 9)**. O CMT positivo pode não ser indicativo de infecção da glândula mamária, isto ocorre devido ao tipo de secreção apócrina da glândula mamária da cabra que permite a presença das células epiteliais, em maior quantidade, quando comparada ao leite de vaca, que juntamente com leucócitos, reagem ao CMT levando a uma interpretação da prova diferente da usada em bovinos (LEWTER et al., 1984). Uma média de 3% dos corpúsculos citoplasmáticos podem conter fragmentos de núcleo (PAAPE e CAPUCO, 1997), que juntamente com as células epiteliais podem elevar, aparentemente, a concentração de leucócitos presentes no leite, mesmo em animais hígidos. Schalm et al. (1971) interpretaram a reação do leite de cabras ao CMT e relacionaram o número de células somáticas com a intensidade da reação. Os autores verificaram que cabras sem mastite podem apresentar reações traços ou 1+. Por outro lado, reações 2+ e 3+ podem ser indicativos de infecção da glândula mamária (SMITH e ROQUINSKI, 1977; BERGONIER et al., 2003; MOTA, 2008; ALMEIDA, 2009; PEIXOTO et al., 2010).

O escore do CMT está diretamente relacionado a CCS automática ou microscópica (SCHALM et al., 1971; ROTA et al., 1994; CONTRERAS et al., 1996; SILVA et al., 1996; SMITH e SHERMAN, 2009), o que foi observado neste estudo, sendo que as médias da CCS automática e microscópica aumentaram segundo os escores do CMT, sendo a maior média da CCS automática e microscópica no escore 3+ **(Tabela 10)**.

A sensibilidade e especificidade do CMT das metades mamárias variaram entre os pontos de corte 2+ e 3+ **(Tabela 11)**. A sensibilidade foi maior para o escore 2+ (68,54%) e a especificidade foi maior para o escore 3+ (73,73%). O ideal no CMT seria o estabelecimento de um ponto de corte que maximizasse simultaneamente a sensibilidade e especificidade do teste, no entanto, em ambos os escores a sensibilidade e especificidade foram baixas. Em decorrência das características fisiológicas do leite caprino, estudos

apontam uma maior confiabilidade do CMT quanto à sensibilidade a partir do escore 2+ (MOTA, 2008; ALMEIDA, 2009).

O VPP e VPN representam a probabilidade perante um resultado positivo ou negativo de existir a mastite ou não, estando relacionado com a sensibilidade e especificidade do teste e a prevalência da doença. O VPP (41,50%) e VPN (74,43%) foram maiores no escore 2+, no entanto, em ambos os escores o VPN foi maior que o VPP (**Tabela 11**). O VPP é a proporção de verdadeiros positivos entre todos os animais com teste positivo, expressando a probabilidade de um animal com teste positivo ter a doença. O VPN é a proporção de verdadeiros negativos entre todos os animais com teste negativo, expressando a probabilidade de um animal com teste negativo não ter a doença (THURSFIELD, 2005). Quanto maior a sensibilidade e especificidade no diagnóstico da mastite subclínica pelo CMT, maior será o VPP e VPN, no entanto, tanto a sensibilidade quanto à especificidade foram baixos nos escores 2+ e 3+, o que refletiu negativamente no VPP e VPN do teste.

Quanto maior a prevalência da doença, maior será o VPP e menor será o VPN, ou seja, quanto mais frequente é uma doença mais provável é encontrar verdadeiros positivos (aumentando o VPP), mas também é mais provável encontrar falsos negativos (diminuindo o VPN) (THURSFIELD, 2005).

A prova do CMT vem sendo utilizada como uma importante ferramenta de avaliação da qualidade do leite do tanque de expansão, na qual reflete indiretamente a CCS do rebanho (BERGONIER et al., 2003; SMITH e SHERMAN, 2009). Neste estudo, 60% dos tanques de expansão apresentaram escore 3+, revelando à alta celularidade do leite produzido na maioria das propriedades (**Tabela 9**).

O CMT é um teste validado para detecção de mastite subclínica na espécie bovina. No entanto, para espécie caprina o CMT não mostrou-se como uma boa ferramenta de diagnóstico para mastite subclínica, apresentando baixa sensibilidade, especificidade, VPP e VPN nos escores 2+ e 3+, na qual são considerados como indicativos de mastite subclínica para pequenos ruminantes na literatura. O CMT pode ser utilizado como prova de triagem para mastite subclínica, devendo sempre estar associado ao exame microbiológico (BERGONIER et al., 2003; SILVA et al., 2001; PEIXOTO et al., 2010).

6.2 Contagem eletrônica e microscópica de células somáticas

Entre as 10 propriedades estudadas as prevalências de mastites subclínicas pela CCS automática e microscópica em nível de população de cabras e metades mamárias não foram homogêneas ($P < 0,01$). A diferença estatística pode ser explicada pelas diferenças nas características de manejo do rebanho, produção e instalações (**Tabela 6, 7 e 8**).

Das 257 amostras de leite compostas analisadas, tendo como ponto de corte para definir uma infecção intramamária 1×10^6 células/mL, não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre a prevalência de mastite subclínica da CCS automática (42%) e CCS microscópica (49,4%) (**Tabela 12**), sendo resultados semelhantes descritos por Bergonier et al. (2003) e Fuquay et al. (2011).

A prevalência de mastite subclínica pela CCS automática na população de cabras (42%) e nas metades mamárias (36,25%) não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$) (**Tabela 13**), no entanto, na CCS microscópica houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre a prevalência de mastite subclínica na população de cabras (49,40%) e nas metades mamárias (40,20%) (**Tabela 14**). Na CCS microscópica utiliza-se a coloração com verde de metil e pironina-Y, que se baseia apenas na contagem de células nucleadas (ZENG e ESCOBAR, 1996), porém alguns corpúsculos citoplasmáticos por possuírem porções nucleares podem ter sido contados durante o exame microscópico, elevando assim a prevalência de mastite subclínica pela CCS microscópica.

A CCS automática do tanque de expansão variou entre 820.000 células/mL e 5.855.000 células/mL, e a CCS microscópica entre 275.146 células/mL e 1.986.580 células/mL. A CBT variou entre 104.000 UFC/mL e 2.410.000 UFC/mL (**Tabela 15**). Esses resultados refletem a sanidade dos rebanhos e a qualidade do leite produzido nas propriedades estudadas.

A CCS no leite de vacas livres de infecção intramamária é, em geral, inferior a 200.000 células/mL (NMC, 1996) e no leite de cabras não infectadas, inferior a 400.000 células/mL (McDOUGALL et al., 2001). No entanto, o limite máximo de células que pode ser encontrado no leite de cabras de boa qualidade são 1×10^6 células/mL, valor estipulado pelo ministério da Agricultura dos Estados Unidos (ZENG, 1996).

Na Instrução Normativa nº 37 de 2000 do MAPA, está em anexo o regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite de cabra, na qual não preconiza no controle da produção leiteira a realização do CMT, CCS automática, CCS microscópica ou qualquer técnica molecular para o diagnóstico de mastites. Ela estabelece que o leite de cabra cru não deve apresentar CBT superior a 500.000 UFC/mL, devendo juntamente a esse ser realizado a determinação da acidez titulável e da densidade relativa 15/15°.

A CBT de 60% das propriedades estavam abaixo do valor determinado pelo MAPA (500.000 UFC/mL), apresentando em média essas propriedades 266.333 UFC/mL. Esse trabalho serve de referência para o pagamento pela qualidade do leite de cabra produzido no estado de São Paulo.

O pagamento diferenciado do leite baseado em critérios de qualidade da matéria-prima representa uma evolução do sistema de comercialização do leite no Brasil e um aprimoramento das relações entre indústria e produtores. Isso permite premiar com bonificação os produtores que produzirem leite de melhor qualidade. Esta prática deveria ser estimulada e com certeza garantiria a melhor qualidade do leite oferecido para consumo à população.

Os resultados da CCS automática e microscópica são influenciados por inúmeros fatores, dentre eles estão o estado de saúde da glândula mamária do hospedeiro e o grau de patogenicidade e virulência do agente causal (HALL e RYCROFT, 2007; PERSSON e OLOFSSON, 2011).

Considerando que a sensibilidade e especificidade constituem dois parâmetros fundamentais no estabelecimento da validade de um teste diagnóstico, é evidente que o teste ideal de diagnóstico seria aquele que reunisse essas duas características em sua intensidade máxima, isto é, que um resultado positivo revelasse, efetivamente, a presença da infecção, e que um resultado negativo fosse indicador seguro de sua ausência (CÔRTES, 1993), sendo tal fato quase impossível no diagnóstico das mastites subclínicas pela CCS automática e microscópica.

Foram determinadas as sensibilidades e especificidades da CCS automática e microscópica para diferentes pontos de corte: 200.000, 400.000, 600.000, 800.000, 1.000.000, 1.200.000 e 1.400.000 células/mL. Observando a sensibilidade e especificidade da CCS automática para os diferentes pontos de corte (células/mL), nota-se que a sensibilidade e o VPP são inversamente

proporcionais aos diferentes pontos de corte e que a especificidade e o VPN são diretamente proporcionais aos diferentes pontos de corte, ou seja, a maior sensibilidade (81,46%) e VPP (80,81%) são encontradas no menor ponto de corte (200.000 células/mL) e a maior especificidade (77,91%) e VPN (52,87%) são encontradas no maior ponto de corte (1.400.000 células/mL) (**Tabela 17**). O ponto de corte de 600.000 células/mL maximiza simultaneamente a sensibilidade (64,04%) e VPP (76,38%) e a especificidade (61,79%) e o VPN (47,11%) do teste, sendo a acurácia neste ponto de corte ruim (**Gráfico 1**). Na CCS microscópica ocorreu o mesmo, como observado para a CCS automática, ou seja, a maior sensibilidade (72,32%) e VPP (78,97%) foram obtidas no menor ponto de corte (200.000 células/mL) e a maior especificidade (89,55%) e VPN (55,70%) foram encontradas no maior ponto de corte (1.400.000 células/mL) (**Tabela 18**). O ponto de corte de 400.000 células/mL maximiza simultaneamente a sensibilidade (58,19%) e VPP (75,74%) e a especificidade (68,96%) e o VPN (49,76%) do teste, sendo a acurácia neste ponto de corte também ruim (**Gráfico 2**).

O ponto de corte pode ser mudado na CCS automática e microscópica de acordo com o objetivo do teste diagnóstico. Quando buscamos o maior número de animais verdadeiramente positivos, teremos que diminuir o ponto de corte, o que leva ao aumento do número de animais falsos positivos e diminuição dos verdadeiros negativos, e quando buscamos o maior número de animais verdadeiramente negativos, teremos que aumentar o ponto de corte, aumentando o número de falsos negativos e diminuindo o número de verdadeiros positivos.

Houve uma associação de grande magnitude entre a CCS automática e microscópica ($R^2=0,95$; $P<0,0001$) (**Gráfico 3**). Entretanto, em média, a CCS automática foi 2,1 vezes maior que a CCS microscópica. Segundo Zeng (1996), a CCS automática realizada por citometro de fluxo calibrado para o leite bovino superestima a CCS microscópica, fato esse explicado principalmente pelo tipo de secreção apócrina da glândula mamária da espécie caprina e pelos tipos de coloração de células adotados pelos citômetros de fluxo (PAAPE et al., 2001).

A CCS do leite de cabra em equipamentos baseados em citometria de fluxo (Somacount 300[®] ou Fossomatic 300[®]) calibrados para o leite bovino, apresentam problemas, pelo fato do corante não ser específico para DNA e

pelo tipo de secreção láctea da cabra. No entanto, a contagem microscópica direta com verde de metil e pironina-Y, que é um corante específico de DNA, é o método referendado como padrão para avaliar a CCS no leite de cabras, possibilitando a coloração apenas das células nucleadas do leite e permitindo a exclusão dos corpúsculos citoplasmáticos resultantes do desprendimento das células do epitélio de revestimento dos alvéolos (CONTRERAS et al., 1996; ZENG et al., 1997; GOMES et al., 2010).

Construiu-se uma equação linear de previsão da CCS microscópica, usando os valores da CCS automática que foi $y=0,9632x-0,1134$, o que permite calcular os valores da CCS microscópica a partir da CCS automática realizada no Somacount 300[®] calibrada para leite bovino para o uso em cabra, fato que pode contribuir para o monitoramento da qualidade do leite caprino a partir da CCS/mL de leite, tanto de tanque como de amostras compostas dos animais.

6.3 Lactocultura

A mastite é a doença mais onerosa do rebanho leiteiro. Na verdade, as perdas relativas à mastite são duas vezes mais elevadas do que as perdas relativas à infertilidade e doenças reprodutivas. Além disso, do ponto de vista da produtividade, do risco de doenças, do comércio internacional e do bem estar animal, a mastite está no topo da lista. A maioria dos produtores de leite percebem essas perdas pelos: casos clínicos que encontram, animais que precisam descartar e custos com veterinários e medicamentos. A perda menos óbvia, porém mais importante é a que ocorre na produção, a qual é provocada pelos casos de mastite subclínica (PHILPOT e NICKERSON, 2002).

A prevalência de mastite subclínica na população de cabras foi de 43,6% e nas metades mamárias 34,7% (**Tabela 19**). A prevalência de mastite subclínica na população de cabras está acima do encontrado por Neves et al. (2010) 11,49% e Bianchini et al. (2010) 6,88% no estado da Paraíba, por Langoni et al. (2012) 12,5% nos estados de São Paulo e Minas Gerais e Peixoto et al. (2012) 29,06% no estado da Bahia.

A maior prevalência de mastite subclínica foi encontrada na propriedade 4 (68,0%) e a menor na propriedade 6 (23,68%) (**Tabela 19**). Segundo Contreras et al. (2007), a mastite subclínica predomina nos rebanhos de

pequenos ruminantes, apresentando prevalência entre 5 e 30%, podendo alcançar taxas elevadas em determinadas situações de manejo.

A propriedade 4 que apresentou a maior prevalência de mastite subclínica diferiu principalmente da propriedade 6 com menor prevalência nas seguintes características (**Tabela 6, 7 e 8**): os animais eram mantidos confinados, a ordenha era realizada manualmente, a secagem das cabras era do tipo intermitente e não realizava-se antibioticoterapia no período de secagem, sendo os casos de mastite clínica tratados apenas com antibioticoterapia pela via intramamária. Frente à essas características de manejo, observamos que os rebanhos confinados, ordenhados manualmente, que não realizavam antibioticoterapia pela via intramamária na secagem e que nos casos de mastite clínica adotam apenas a terapêutica pela via intramamária, estão mais susceptíveis à ocorrência e transmissão das mastites (CONTRERAS et al., 1998; CHAFFER et al., 2003; GONZALO et al., 2004).

A prevalência de mastite clínica na população de cabras foi de 5,84% e nas metades mamárias 2,92% (**Tabela 19**). A prevalência de mastite clínica na população de cabras estava em nível acima do mencionado na literatura (<5%), no entanto, é normal que a prevalência eleve-se na falta de um correto manejo higiênico-sanitário (CONTRERAS et al., 2007).

Pinheiro et al. (2000), estudaram a prevalência da mastite clínica na caprinocultura cearense constatando prevalência de 51,2% em um rebanho de cabras criadas em condições precárias juntamente com outras espécies de animais de produção, o que demonstra que o valor da prevalência é proporcional ao tipo de manejo sanitário adotado na propriedade (SMITH e SHERMAN, 2009; FUQUAY et al., 2011).

Apenas três propriedades apresentaram animais com mastite clínica, sendo as prevalências em nível de cabras: propriedade 2 (34,28%), propriedade 3 (8%) e propriedade 4 (4%) (**Tabela 19**). As propriedades que apresentaram mastite clínica no rebanho mantinham os animais confinados durante os períodos de lactação e período seco, realizavam ordenha manual, sendo que na propriedade 1 o tipo de secagem era abrupto e nas propriedades 3 e 4 intermitente, e apenas as propriedade 2 e 3 utilizavam antibiótico no período seco (**Tabela 7 e 8**). Isso demonstra que vários fatores podem influenciar a ocorrência de mastite clínica no rebanho, dentre eles estão:

resistência natural da glândula mamária, tipo de instalação, estágio de lactação, hereditariedade, idade dos animais, infectividade, patogenicidade e virulência do agente, diagnóstico precoce, antibioticoterapia no período de secagem e tipo de ordenha, além da falta de um programa de prevenção e controle contra mastite (ANDERSON et al., 2004; MOTA, 2008).

6.4 Micro-organismos isolados

Das 513 amostras de leite das metades mamárias examinadas, 178 (34,70%) apresentaram crescimento bacteriano, enquanto 335 (65,30%) mostraram-se negativas (**Tabela 19**). As culturas negativas podem estar relacionadas, provavelmente, a ausência da doença, as mastites assépticas ou a agentes que exigem condições especiais para isolamento (MOTA, 2008).

As análises microbiológicas demonstraram a ocorrência dos mais importantes patógenos das mastites nas 10 propriedades estudadas (**Tabela 20**). Dentre os patógenos mais isolados nas metades mamárias: ECN (23,98%), ECP (8,36%), Enterobacteriaceae (1,4%), *Corynebacterium* spp. (0,60%), *Micrococcus* spp. (0,20%) e *Streptococcus* spp. (0,20%) (**Tabela 21**). Todos esses patógenos com exceção dos ECP (*S. lutrae* e *S. scheleiferi* subsp. *coagulans*) já foram isolados no leite de cabra no Brasil por Mota et al. (2000), Silva et al. (2004), Langoni et al. (2006), Almeida (2009), Neves et al. (2010) e Peixoto et al. (2012).

As propriedades: 2 (58,6%), 4 (58,0%) e 3 (50,0%) apresentaram as maiores prevalências de mastite subclínica nas metades mamária e os maiores percentuais de isolamento de ECN (**Tabela 19 e 21**). Ambas mantinham os rebanhos confinados e realizavam ordenha manual (**Tabela 7**), sendo que essas características podem favorecer a infecção da glândula mamária, pois dentro dos ECN estão algumas espécies comensais na pele dos animais, mucosas e mãos dos ordenhadores, sendo relativamente estáveis no ambiente, podendo causar a mastite contagiosa (OLIVEIRA et al., 2011; PEIXOTO et al., 2012),

A elevada ocorrência de ECN (23,98%) corrobora com os estudos de Silva et al.(2004), Langoni et al. (2006), Peixoto et al. (2010) e Oliveira et al.

(2011), sendo os ECN importantes patógenos das mastites caprina nos diferentes sistemas de criação.

As infecções por ECN são mais compatíveis com a ausência de manifestações clínicas nos animais, sendo importantes agentes das mastites subclínicas em cabras. Estes micro-organismos podem causar infecções subclínicas durante toda lactação, persistir por alguns meses ou até mesmo no período seco (POUTREL, 1984). Em rebanhos de caprinos leiteiros onde não pratica-se a higienização dos tetos, existe uma alta prevalência de *S. epidermidis* (HOGAN et al., 1987; MORONI et al., 2005). No entanto, a pesquisa dos ECN não faz parte dos objetivos deste estudo.

S. aureus, foi o ECP mais isolado neste estudo, considerado o agente clássico da mastite, destacando-se como causador da mastite contagiosa, sendo de difícil tratamento devido à elevada resistência, além dos riscos para a saúde pública pela produção de toxinas termoresistentes (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004; FREITAS et al., 2004). As outras espécies isoladas neste estudo de ECP (*S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. lutrae* e *S. scheleiferi* subsp. *coagulans*) são menos frequentes na ocorrência de mastites e usualmente são isolados do leite de cabras (VASSILIADOU, 1991; KYOZAIRE et al., 2005).

As bactérias do gênero *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Micrococcus* spp. e da família Enterobacteriaceae são agentes isolados com menor frequência nas mastites caprinas (ANDERSON et al., 2004; BERGONIER et al., 2003; CONTRERAS et al., 2007; SMITH e SHERMAN, 2009). O presente estudo encontrou baixa frequência desses patógenos no cultivo microbiano das amostras de leite das metades mamárias, corroborando com os trabalhos acima citados.

Dentre os patógenos isolados nas amostras de leite das metades mamárias, *S. aureus* foi quem apresentou a maior mediana na CCS automática (5.228.000 células/mL) e microscópica (2.103.698 células/mL) (**Tabela 22**). Segundo De Crémoux et al. (1995) e Baudry et al. (1997) a infecção causada por *S. aureus* na glândula mamária de cabras produz valores acima de 1×10^6 células/mL na CCS, sendo uma das espécie mais patogênica dentro do gênero *Staphylococcus* spp.

Foram criados 5 grupos contendo os patógenos isolados na lactocultura para determinar a média da CCS automática das metades mamárias por grupo

de patógenos (**Tabela 23**). Observou-se que o grupo 5 (*S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. lutrae* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans*) apresentou a maior média geométrica da CCS automática 1.604.353,25 células/mL entre os grupos. Esse resultado reforça importância dos ECP na etiologia das mastites caprinas, corroborando com os estudos de Mota et al. (2003), Silva et al. (2004) e Langoni et al. (2006).

Houve diferença estatística nas médias ($P < 0,05$) entre o grupo 4 (ECN e *Micrococcus* spp.) e 3 (Negativos), e entre o grupo 5 (*S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. lutrae* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans*) e 3 (Negativos). O grupo 4 (ECN e *Micrococcus* spp.) apresentou média geométrica de 727.612,24 células/mL, sendo a média deste grupo a segunda maior, mostrando a importância dos ECN. Estes não foram caracterizados neste estudo, mas são considerados patógenos maiores para a espécie caprina (MOTA et al., 2000; BERGONIER et al., 2003; SILVA et al., 2004; PEIXOTO et al., 2010; LANGONI et al., 2012). O grupo 3 (Negativos) apresentou a menor média geométrica 271.456,34 células/mL, o que demonstra que cabras com lactocultura negativa não apresentam valores elevados de CCS, discordando do limite máximo 1×10^6 células/mL para cabras não infectadas considerado por Zeng (1996), e concordando com os trabalhos de McDougall et al. (2001) que considera cabras saudáveis com CCS inferior a 400.000 células/mL e Pearson e Olofsson (2011) que encontraram em cabras com lactocultura negativa CCS média de 481.000 células/mL.

6.5 Multiplex-PCR

Uma das técnicas que vem sendo utilizada de maneira crescente para identificação bacteriana é a multiplex-PCR, pela utilização de mais de um par de primers na mesma reação, amplificando, simultaneamente, várias seqüências de DNA. Essa técnica possibilita a identificação de mais de uma espécie bacteriana na mesma reação de PCR, promovendo uma avaliação mais ampla e rápida de bactérias patogênicas em alimentos (WILSON et al., 1991). Dessa forma, objetivou-se pesquisar diretamente no leite caprino de 513 metades mamárias e 10 tanques de expansão os patógenos: *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*.

Inicialmente, realizou-se PCR específica para cada um dos agentes utilizando-se os primers e protocolo descritos por Chótar et al. (2006). Devido a baixa sensibilidade analítica observada para *S. aureus* e *S. agalactiae*, na qual pode ser sugerida pela baixa frequência de cópias das regiões flanqueadas pelos primers SAU1 e SAU2, e SAGA1 e SAGA2, testou-se os primers STAUR4 e STAUR6, descritos por Straub et al. (1999) para a detecção de *S. aureus*, e SIP3 e SIP4 descritos por Chótar et al. (2006) para a detecção de *S. agalactiae*.

Chótar et al. (2006) padronizaram o protocolo de multiplex-PCR previamente utilizado, e na tentativa de reutilizar o mesmo protocolo modificando-se os primers específicos para *S. aureus* e *S. agalactiae*, testou-se gradiente de temperatura de anelamento, visto que a temperatura de anelamento utilizada por Straub et al. (1999) para STAUR4 e STAUR6 foi de 64°C, considerada muito elevada em relação a temperatura utilizada por Chótar et al. (2006), 55°C (**Figuras 6 a 8**), no entanto, a temperatura descrita por Straub et al. (1999) foi a que melhor resultado apresentou na detecção simultânea dos três agentes (**Figura 10**).

Utilizando-se os primers STAUR4 e STAUR6, SIP3 e SIP4, e Ecol1 e Ecol2, e comparando-se as concentrações de primers utilizadas, observou-se que a utilização de primers em menores concentrações (10µM), como observado por Straub et al. (1999), apresentou melhores resultados (**Figuras 11 e 12**), obtendo-se uma sensibilidade analítica na detecção de *S. aureus* de até 10⁰ (10µM) e 10² (25µM) bactérias/mL⁻¹ em amostras de leite caprino. Em relação à detecção de *S. agalactiae*, sensibilidade de até 10⁰ (10µM) e 10¹ (25µM) bactérias/mL⁻¹ foi obtida nas amostras de leite, enquanto que para *E. coli* de até 10⁰ (10µM) e 10² (25µM) bactérias/mL⁻¹.

Os primers SIP3 e SIP4 produzem um amplicon de 293pb, diferente dos 660pb produzidos por SAGA1 e SAGA2, e dos 590pb produzidos por Ecol1 e Ecol2, não gerando problema na análise do gel de agarose (**Figura 11**).

A prevalência dos agentes nas metades mamárias foram: *E. coli* (16,6%), *S. aureus* (9,7%) e *S. agalactiae* (5,5%) e no tanque de expansão: *S. aureus* (60%), *E. coli* (40%) e *S. agalactiae* (10%) (**Tabela 24 e 25**). Das 24 amostras positivas de acordo com o cultivo microbiano, todas foram

corretamente diagnosticadas como positivas pela multiplex-PCR (Sensibilidade: 100%).

Das 10 propriedades que tiveram as metades mamárias avaliadas pelo cultivo microbiano, em sete foram isolados *S. aureus*, em cinco foram isoladas bactérias da família Enterobacteriaceae e em apenas uma foi isolado *Streptococcus* spp., sendo diagnosticado corretamente pela multiplex-PCR seis tanques de expansão com *S. aureus*, um com *S. agalactiae* e quatro com *E. coli*. Isso mostra a alta sensibilidade da técnica para o diagnóstico desses patógenos e a sua aplicabilidade para o monitoramento sanitário do rebanho e da qualidade do leite dos tanques de expansão, aspecto relevante para a saúde pública.

O tanque de expansão da propriedade 2 foi o único positivo para os três patógenos na multiplex-PCR, no entanto, o tanque de expansão das propriedades: 1, 3 e 5 foram negativas para os três patógenos. A ausência de resultados positivos para *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* pela técnica de multiplex-PCR reforça a questão de que a sensibilidade e especificidade de métodos moleculares para a detecção de agentes bacterianos em amostras de leite estão estreitamente relacionadas, tanto às características dos micro-organismos, como complexidade de parede celular, que podem dificultar a lise durante o processo de extração do DNA, como também aos tipos de iniciadores utilizados (CREMONESI et al., 2006).

Pela análise microbiológica das metades mamárias foram diagnosticadas 24 amostras positivas para *S. aureus*, enquanto que na multiplex-PCR 50 amostras foram positivas, sendo alta a sensibilidade da multiplex-PCR para o diagnóstico de *S. aureus* no leite caprino. *S. aureus* é o agente infeccioso mais patogênico para a glândula mamária das cabras, tanto na forma subclínica como clínica da doença, sendo evidente sua importância em saúde pública pela produção de toxinas termoestáveis, servindo como indicador higiênico-sanitário na indústria alimentícia (MURRAY et al., 1992; ANDERSON et al., 2004).

O *Streptococcus* spp. foi diagnosticado pela lactocultura em apenas uma amostra de leite das metades mamárias, não sendo realizadas provas bioquímicas para diferenciação de espécies dentro do gênero, no entanto, a multiplex-PCR foi capaz de diagnosticar 28 amostras de leite das metades

mamárias positivas para *S. agalactiae*. Esporadicamente, *S. agalactiae* causa mastite em cabras, mas é um importante patógeno na mastite bovina, de alta contagiosidade. A infecção por esse patógeno pode resultar em fibrose e queda na produção de leite (BERGONIER et al., 2003; ANDERSON et al., 2004).

No cultivo microbiano foram diagnosticadas sete amostras de leite das metades mamárias positivas para Enterobacteriaceae não sendo realizadas provas bioquímicas para diferenciação dos gêneros e espécies pertencentes a essa família de bactérias Gram-negativas, que inclui uma grande variedade de bactérias patogênicas. Na multiplex-PCR foram diagnosticadas 85 amostras de leite das metades mamárias positivas para *E. coli*. Essa bactéria é encontrada na matéria orgânica (fezes e solo), na água, ar e na cama dos animais, e dificilmente não estará presente no leite dos animais após ordenha (SMITH e SHERMAN, 2009; FUQUAY et al., 2011). A prevalência de infecção por *E. coli* na espécie caprina é baixa, ocorrendo principalmente nos períodos entre ordenha, representando risco para saúde pública (RADOSTITIS et al., 2007; FUQUAY et al., 2011).

A técnica de multiplex-PCR padronizada nesse estudo apresentou boa acurácia para detecção de *S. areus*, *S. agalactiae* e *E. coli*. A utilização em conjunto com o cultivo microbiano, possibilita maximização da sensibilidade e especificidade da técnica, aumentando a eficiência do diagnóstico da mastite caprina.

6.6 Fatores de risco para mastite subclínica

Pela análise univariada dos fatores de risco para mastite subclínica observou-se que as variáveis: tamanho do rebanho, fase de lactação, tipo de instalação, tipo de ordenha, tipo de secagem, ambiente de permanência dos animais no período seco e utilização de antibioticoterapia no momento da secagem, estavam associadas à presença de mastite subclínica. No entanto, as variáveis: raça, local de ordenha, lavagem dos tetos, secagem dos tetos com papel toalha descartável ou pano esterilizado, realização de pré e pós-dipping, não estavam associadas à doença (**Tabela 26**).

O tamanho do rebanho variou entre 20 e 160 animais. Para a análise univariada, o tamanho do rebanho foi dividido em duas categorias, uma com até 38 animais e outra acima de 38 animais. Houve diferença estatística entre a associação tamanho do rebanho e presença de mastite subclínica ($P < 0,001$; $OR = 0,28$) e na razão de chances (*Odds Ratio*) para mastite subclínica ajustadas por propriedade ($P = 0,0268$; $OR = 0,3$), tendo como referência a categoria: acima de 38 animais (**Tabela 26 e 27**). Propriedades com rebanhos maiores tendem apresentar maiores taxas de prevalência da mastite, em decorrência da dificuldade na execução das atividades de controle e profilaxia de rotina contra a doença (PEIXOTO et al., 2012). A caprinocultura contemporânea busca por rebanhos de alta performance, potencializando o menor número possível de animais com a maior capacidade de produção leiteira, sendo a formação desses rebanhos fundada na adoção de novas tecnologias de produção, capacitação de mão de obra e de programas de prevenção e controle das mastites (GARCIA e TRAVASSOS, 2012).

Não houve diferença estatística significativa ($P = 0,3442$; $OR = 0,3$) entre a associação raça (Saanen ou Anglo-Nubiana) e presença de mastite subclínica (**Tabela 26**). Peixoto et al. (2012) observaram que animais de raça pura ou de maior potencial zootécnico recebem maiores cuidados dos proprietários, especialmente na ordenha, com melhores instalações e condições higiênico sanitárias. Do contrário, rebanhos mais heterogêneos, com animais mestiços, recebiam menores cuidados, justificando o maior percentual encontrado de animais com mastite.

Na associação entre a categoria, local de ordenha (plataforma ou curral) e a presença de mastite subclínica não houve diferença estatística significativa ($P = 0,9261$; $OR = 1,03$) (**Tabela 26**). O local de ordenha é fundamental para a prevenção da mastite. Além disso, quando a ordenha é realizada no curral, os ordenhadores são menos criteriosos aos procedimentos de desinfecção e antissepsia, havendo maior facilidade de transmissão de patógenos entre animais e até no mesmo animal quando os procedimentos antes e após ordenha são inadequados (PRESTE, et al., 2003).

Com relação à fase de lactação, houve diferença estatística significativa na associação entre as diferentes fases de lactação (Inicial, Intermediária e Final) e a presença de mastite subclínica ($P < 0,0001$; OR fase inicial = 0,33; OR

fase final=1,06) (**Tabela 26**). Sabe-se que vários fatores fisiológicos podem afetar a contagem de células somáticas, como a fase de lactação, sendo que as cabras na fase inicial ou final de lactação tendem a aumentar a CCS (FERNANDES, 2002; GOMES, 2003; PEIXOTO et al., 2012), fenômeno observado neste estudo.

Houve diferença estatística significativa ($P=0,0052$; $OR=2,44$) na associação entre a categoria tipo de instalação (pasto ou confinado) e a presença de mastite subclínica (**Tabela 26**). Segundo Anderson et al. (2004), no confinamento deve-se evitar a superpopulação, devendo a cama estar limpa e seca para evitar exposição aos patógenos. Para Smith e Sherman (2009), no caso de criação dos animais soltos a pasto é necessário que o pasto tenha uma adequada drenagem e que os animais sejam mantidos em sistema de rotação contínua de pastagem, evitando segundo Prestes et al. (2002), áreas alagadiças e/ou sombreadas, com forragem grosseira, favorecendo a multiplicação de patógenos ambientais e consequentemente a infecção da glândula mamária.

Na associação entre tipo de ordenha (manual ou mecânica) e a presença de mastite subclínica, houve diferença estatística significativa ($P=0,0499$; $OR=0,59$) (**Tabela 26**). As propriedades que ordenhavam as cabras manualmente foram as propriedades 2, 3 e 4, sendo as únicas a apresentarem animais no rebanho com mastite clínica (**Tabela 9**). A ordenha manual, realizada corretamente predispõe menos ao aparecimento de mastites que a ordenha mecânica, mas as mãos contaminadas do ordenhador e a utilização de equipamento de ordenha sem desinfecção podem favorecer a difusão de patógenos no rebanho durante a ordenha (VILANOVA et al., 2008).

Não houve diferença estatística significativa entre a categoria lavagem dos tetos (Sim ou Não), secagem dos tetos com papel toalha descartável ou pano esterilizado (Sim ou Não) e realização de pré e pós-dipping (Sim ou Não) com a ocorrência de mastite subclínica ($P=0,5528$; $OR=0,85$) (**Tabela 26**). A ocorrência de mastite intensifica-se na medida em que procedimentos básicos de antisepsia dos tetos e desinfecção dos equipamentos de ordenha não são realizados ou realizados inadequadamente (MOTA, 2008), não sendo evidenciado neste estudo.

Houve diferença estatística entre a associação tipo de secagem (Intermitente ou Abrupto) e a ocorrência de mastite subclínica ($P=0,0105$; $OR=1,92$) (**Tabela 26**), tendo como referência a secagem intermitente. A prática mais comum é a interrupção abrupta da ordenha no momento da secagem. Como é recomendada a utilização de antibioticoterapia via intramamária em todas as cabras no momento da secagem, a interrupção de ordenha abrupta tende a facilitar o manejo (FUQUAY e FOX, 2011).

Independente do tipo de secagem o ideal é que no período de duas a uma semana antes da ordenha sejam feitas modificações na dieta das cabras leiteiras, com o objetivo de reduzir a produção durante os procedimentos de secagem (SMITH e SHERMAN, 2009).

Houve diferença estatística entre a associação ambiente de permanência no período seco (Pasto ou Confinado) e a presença de mastite subclínica ($P=0,0056$; $OR=0,41$) (**Tabela 26**), tendo como referência o pasto. O período seco é uma necessidade fisiológica para a cabra leiteira e apresenta relação direta com a saúde da glândula mamária, a produção de leite e prevenção de doenças em geral. Durante este período, independente do ambiente de permanência no período seco, este deve garantir que o animal retorne ao início do próximo parto em bom estado sanitário e nutricional, impedindo infecções intramamárias no período seco, a qual afetaria negativamente a produção leiteira da próxima lactação (THURMOND, 1993; CONTRERAS et al., 2007; MOTA, 2008) .

Houve diferença estatística entre a associação uso de antibioticoterapia na secagem (Sim ou Não) e a presença de mastite subclínica ($P=0,0218$; $OR=0,54$) (**Tabela 26**), tendo como referência a não utilização de antibiótico após a última ordenha, no momento de secagem da cabra. Essa terapia tem-se mostrado como uma ferramenta eficiente na diminuição da prevalência de mastite subclínica no rebanho, diminuição da ocorrência de mastite clínica nas cabras secas e redução da incidência de novas infecções após o parto, proporcionando ganhos na produção (CHAFFER et al., 2003; GONZALO et al., 2004).

Apesar de haver diferença estatística nas análises univariadas, estas não ocorriam quando realizado o ajuste por propriedade (**Tabela 27**), fato explicado pela existência de fatores de confusão que não foram avaliados e

que influenciam na análise dos dados. As propriedades são os principais fatores de confusão devido à existência de inúmeras características de manejo do rebanho, produção e instalações, fazendo as associações positivas entre a presença de mastite subclínica e as variáveis obtidas no questionário epidemiológico desaparecerem.

Nenhuma das propriedades rurais recebia assistência veterinária, e nenhum outro problema sanitário, reprodutivo ou nutricional foi observado nos rebanhos durante a colheita das amostras. A falta de assistência veterinária é um problema que afeta não só a caprinocultura de leite, mas todo tipo de produção animal, refletindo diretamente na saúde do rebanho e na qualidade do leite. Muitas doenças não foram observadas, provavelmente pela falta de monitoramento sanitário do rebanho, pois somente a coleta de amostras de leite e a aplicação do questionário não permitem uma avaliação mais profunda da sanidade dos animais.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

1. O CMT não é uma boa ferramenta para o diagnóstico das mastites subclínicas e qualidade do leite em cabras por apresentar baixa sensibilidade e especificidade nos escores 2+ e 3+, e caso seja utilizado para triagem deverá sempre estar associado a lactocultura.

2. A CCS automática realizada pelo Somacount 300[®] superestima em 2,1 vezes a CCS microscópica padronizada por Prescott e Breed (1910), sendo explicado pelo tipo de secreção apócrina da glândula mamária da espécie caprina e pelo fato do corante (brometo de etídio) utilizado no Somacount 300[®] não ser específico para DNA. A CCS automática e microscópica não são boas ferramentas para o diagnóstico de mastite subclínica em cabras, pois não apresentaram nenhum ponto de corte eficiente para maximização simultânea da sensibilidade e especificidade do teste diagnóstico. Sugere-se seu uso para o monitoramento sanitário do rebanho e o desenvolvimento de novas técnicas para o diagnóstico de mastite subclínica.

3. As prevalências de mastite subclínica (43,6%) e clínica (5,84%) nas populações de cabras estudadas a partir do cultivo microbiano foram superiores às descritas na literatura.

4. Os principais patógenos envolvidos nos casos de mastite subclínica pertencem ao grupo dos ECN. Dentre os ECP, *S. aureus* foi o mais isolado 4,68% nas metades mamárias, o que reforça a importância desse agente contagioso na etiologia das mastites nesta espécie, e nos faz alertar para o risco em saúde pública na gênese das toxi-infecções de origem alimentar. Todos os patógenos isolados nesse trabalho com exceção do *S. lutrae* e *S. scheleiferi* subsp. *coagulans* já foram isolados no leite caprino no Brasil, sendo novo o isolamento dessa espécie no leite caprino mastítico.

5. A multiplex-PCR padronizada nesse estudo apresentou boa acurácia para detecção de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* no leite caprino mastítico das metades mamárias e dos tanques de expansão, podendo ser utilizada como ferramenta para monitorar a sanidade do rebanho e a qualidade do leite do tanque de expansão.

6. Pela análise univariada dos fatores de risco, foi observado que as variáveis: tamanho do rebanho, fase de lactação, tipo de instalação, tipo de

ordenha, tipo de secagem, ambiente de permanência dos animais no período seco e o uso de antibioticoterapia no período de secagem estão associados à ocorrência de mastite subclínica. No entanto, quando essas variáveis foram ajustadas por propriedades as associações na sua maioria desapareceram, pelo fato das propriedades serem um importante fator de confusão, influenciando a análise univariada com características desconhecidas de manejo do rebanho, produção e instalações, que variam de acordo com as propriedades.

7. De acordo com a Instrução Normativa nº37 de 2000 do MAPA, o limite estabelecido para CBT é de 500.000 UFC/mL, devendo juntamente a este parâmetro ser realizado a determinação da acidez titulável e da densidade relativa 15/15º, sem exigência de outros controles. O presente estudo mostrou corroborando com o MAPA que a utilização de outras técnicas de diagnóstico como: CMT, CCS automática e microscópica não são capazes de garantir a confiabilidade do diagnóstico de mastite subclínica na espécie caprina.

8. Pode-se concluir ainda, que os resultados da presente pesquisa servem de referência para o pagamento pela qualidade do leite de cabra produzido no estado de São Paulo, pois a CBT de 60% das propriedades estavam abaixo do valor determinado pelo MAPA que é de 500.000 UFC/mL, com média entre as propriedades de 266.333 UFC/mL. Reforça-se que o pagamento diferenciado do leite baseado em critérios de qualidade da matéria-prima representa uma evolução do sistema de comercialização do leite no Brasil e um aprimoramento das relações entre indústria e produtores.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. *Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales*. Organizacion Panamericana de La Salud. 2 ed., 2003.

ACURI, E.F.; DA SILVA, P.D.L.; BRITO, J.R.F.; SILVA, M.R.; SOUZA, G.N. Emprego do Somacount 300, calibrado com leite de vaca, na contagem de células somáticas no leite de cabra, *Ciência Rural*, v.34, n.5, p.1497-1500, 2004.

ALMEIDA, L.A.B. *Avaliação do tratamento alopático e homeopático de mastite bovina em animais inoculados com Staphylococcus aureus*. 2004. 104p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo.

ALMEIDA, J.F. *Agentes infecciosos causadores de mastite e parâmetros físico-químicos na qualidade do leite de cabra in natura*. 2009. 107p. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói.

ALVES, C.J., VASCONCELLOS, S.A., MORAIS, Z.M., LEITE, E.A., GOMES, A.A.B. Avaliação dos níveis de aglutininas anti-*Brucella* em soros de caprinos de cinco centros de criação do nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v.4, p.89–91, 1997.

AMEH, M.J.A.; TARI, I.S. Observations on the prevalence of caprine mastitis in relation to predisposing factors in Maiduguri. *Small Ruminant Research*, v.35, p.1-5, 2000.

AMORENA, B.; BASELGA, R.; ALBIZU, I. Use of liposome-immuno potentiated exopolysaccharide as a component of an ovine mastitis staphylococcal vaccine. *Vaccine*, v.12, p.243-249, 1994.

ANDERSON, D.E.; HULL, B.H.; PUGH, D.G. *Enfermidades da glândula mamária*. In: PUGH, D.G. (Ed). Clínica de ovinos e caprinos. São Paulo: Roca, 2004. p.379-399.

ANDRADE, P.V.D.; SOUZA, M.R.; PENNA, C.F.A.M.; FERREIRA, J.M. Características microbiológicas e físico-químicas do leite de cabra submetido à pasteurização lenta pós-envase e ao congelamento. *Ciência Rural*, v. 38, n. 5, p. 1424-30, 2008.

ANDRADE, P.V.D.; SOUZA, M.R.; BORGES, I.; PENNA, C.F.A.M. Contagem de células somáticas em leite de cabra. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.53, n.3, p.396-400, 2001.

AZEVEDO, E.O.; ALCÂNTARA, M.D.B.; NASCIMENTO, E.R.; TABOSA, I.M.; BARRETO, M.L.; ALMEIDA, J.F.; ARAÚJO, M.O.; RODRIGUES, A.R.O.; RIET-CORREA, F.; R.S. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants in Brazil: First report. *Brazilian Journal Microbiology*, v.37, p.576-581, 2006.

BABIOR, B.M. The respiratory burst of phagocytes. *Journal Clinical Investigation*, v.73, p.599-601, 1984.

BAEHNER, R.L.; BOXER, L.A.; ALLEN, J.M. Autoxidation a basis for altered function by polymorphonuclear leukocytes. *Blood*, v.50, p.327-335, 1977.

BELTRÃO FILHO, E.M.; COSTA, R.G.; QUEIROGA, R.C.R.E.; MEDEIROS, A.N.; OLIVEIRA, C.J.B.; ROCHA, J.K.P.; SANTOS, J.G. Avaliação higiênico-sanitária do leite de cabra comercializado no estado da Paraíba, Brasil. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.9, n. 4, p.672-9, 2008.

BARCELLOS, T.F.S.; SILVA, N.; MARQUES JÚNIOR, A.P. Mamite caprina em rebanhos próximos a Belo Horizonte – Minas Gerais. I – Etiologia e sensibilidade a antibióticos. II – Métodos de diagnóstico. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.39, p.307-315, 1987.

BARROS, G.C.; LEITÃO, C.H. Influência da mastite sobre as características físico-químicas do leite de cabra. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.12, p.45-48, 1992.

BAUDRY, C.; DE CREMOUX, R.; CHARTIER, C.; PERRIN, G. Impact of the cellular concentration of milk in goats on its production and its composition. *Veterinary Research*, v.28, n.3, p.277-286, 1997.

BERGONIER, D.; DE CRÉMOUX, R.; RUPP, R.; LAGRIFFOUL, G.; BERTHELOT, X. 2003. Mastitis of dairy small ruminants. *Veterinary Research*, v.34, p.689-716, 2003.

BIANCHINI, B.I.S.; DA SILVA, L.B.G.; SILVA, A.P.; LIMA, J.C.O.; FALCÃO, D.P. Frequência e etiologia da mastite caprina na região do Cariri paraibano. *Medicina Veterinária*, v.4, n.1, p.1-5, 2010.

BIRGEL JUNIOR, E.H.; CESTARI, V.; SAMPAIO, R.M.; LARA, M.C.C.S.H. Influência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina nas características físico-químicas e celulares do leite de caprinos. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.74, n.3, p.199-206, 2007.

BLAGITZ, M.G.; BENITES, N.R.; MELVILLE, P.A.; BATISTA, C.F.; RICCIARDI, M.; MANTOVINI, F.D.; GOMES, V.; MACEDO, M.R.; DELLA LIBERA, A.M.M.P. Importância do exame físico da glândula mamária no diagnóstico de mastite infecciosa em ovelhas da raça Santa Inês. *Archives of Veterinary Science*, v.12, p.175-176, 2007.

BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an evolving disease. *Veterinary Journal*, v.164, n.2, p.116-128, 2002.

BRITO, J.R.F.; DIAS, J.C. *A qualidade do leite*. Juiz de Fora: EMBRAPA/São Paulo: TORTUGA, 1998, 88p.

BRITO, M.A.V.P.; LANGE, C.C. *Resíduos de antibióticos no leite*. Comunicado Técnico 44. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, p.4, 2005.

CHAFFER, M.; LEITNER, G.; ZAMIR, S.; WINKLER, M. Efficacy of dry-off treatment in sheep. *Small Ruminant Research*, v.47, n.1, p.11-19, 2003.

CHAPAVAL, L. *Programa de Controle da Mastite Caprina – PCMC*. Comunicado Técnico, EMBRAPA. Sobral, CE, out. 2007. Disponível em: <<http://www.cnpc.embrapa.br/cot80.pdf>>. Acesso em 12 jan. 2013.

CHAPAVAL, L.; PIEKARSKI, P.R.B. *Leite de qualidade: manejo reprodutivo, nutricional e sanitário*. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, p.195, 2000.

CHIARI, C. A.; NEVES, D. P. Toxoplasmose humana adquirida através de ingestão de leite de cabra. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.79, p.337-340, 1984.

CHOTÁR, M.; VIDOVÁ, B.; GODÁNY, A. Development of specific and rapid detection of bacterial pathogens in dairy products by PCR. *Folia Microbiologica*, v.51, n.6, p.639-646, 2006.

COELHO, A.J.C.; PEIXOTO, R.M.; ANDRADE, N.P.C.; NOGUEIRA, D.M.; KREWER, C.C.; ALENCAR, P.H.P.; COSTA, M.M. Eficácia de três métodos empregados no controle da mastite estafilocócica em cabras leiteiras criadas no município de Santa Maria da Boa Vista, PE. *Anais... V Congresso Nordestino de Produção Animal*, Aracaju, SE, 2008.

CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; CORRALES, J.C.; SANCHEZ, A.; GONZALO, C. Diagnostico indirecto de las mamitis caprinas. *Tratado de patologia y producción ovina: Mamitis caprina II*, n.54, p.25-36, 1998.

CONTRERAS, A.; SANCHEZ, A.; CORRALES, J. Health priorities in dairy goats. p.229-243. In: DAZA, A.; FERNÁNDEZ, C.; SANCHEZ, A. *Goat Livestock: Production, Nutrition and Health*. Agrícola Espanola, Espana, 2004.

CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; SANCHEZ, A.; MARCO, J.C. Physiological threshold of somatic cell count and California Mastitis Test for diagnosis of caprine subclinical mastitis. *Small Ruminant Research*, v.21, n.3, p.259-264. 1996.

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

CORRÊA, W.M.C.; CORRÊA, C.N.M. Mastites. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos*. São Paulo: Varela, p.117-131, 1992.

CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B.; Malferrari, G.; BIUNNO, I.; VIMERCATI, C.; MORONI, P.; MORANDI, S.; LUZZANA, M. Technical Note: improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk. *Journal of Dairy Science*, v.89, p.163-169, 2006.

CULLOR, J.S.; TYLER, J.W.; SMITH, B.P. Distúrbios da glândula mamária. In: SMITH, B.P. (Ed.) *Tratado de Medicina Interna dos Grandes Animais*. São Paulo: Manole, v.2, p.1041-1060, 1994.

DE CRÉMOUX, R.; POUTREL, B.; BERNY, F. Use of milk somatic cell count (SCC) for presumptive diagnosis of intramammary infections in goats, in: *Third International Mastitis Seminar, Proceedings II S6*, p.90-91, 1995.

DELLA LIBERA, A.M.M.P. Mastite de pequenos ruminantes. In: Encontro de pesquisadores em mastites, 2007, Botucatu. *Anais...* Botucatu: Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, p. 64-71, 2007.

DOMINGUES, P.F.; LANGONI, H. – *Manejo sanitário animal*. Rio de Janeiro: EPUB, 2001.

DULIN, A.M.; PAAPE, M.J.; SCHULTZE, W.D.; WEINLAND, B.T. Effect of parity, stage of lactation, and intramammary infection on concentration of somatic cells and cytoplasmic particles in goat milk. *Journal Dairy Science*, v.66, p.2426-2433, 1983.

EL-MASANNAT, E.T.S. *A study of ovine mastitis with special reference to mastitis caused by Pasteurella haemolytica*. PhD. (Science Animal), University of London, 1987.

EUZEBY, J.P. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.47, p.590-592, 1997.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Ciência Rural*, v.34, n.4, p.1315-1320, 2004.

FAO - Food and Agriculture Organization. *FAO production yearbook 2009*. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>>. Acesso em: 08 abr. 2013.

FERNANDES, M.A. *Avaliação das características físico-químicas, celulares e microbiológicas do leite de cabras, das raças Saanen, e Alpina, criadas no estado de São Paulo*. 2002. 152p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. *Qualidade do leite e controle de mastite*. 2 edição. São Paulo: Lemos Editorial, 2001.

FOSCHINO, R.; INVERNIZZI, A.; BARUCCO, R.; STRADIOTTO, K. Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goats milk from the Bergamo 42 region of Italy during a lactation year. *Journal of Dairy Research*, v.69, p.213-225, 2002.

FREITAS, M.F.L.; LEAL BALBINO, T.C.; MOTA, R.A.; STAMFORD, T.L.M. Exotoxinas estafilocócicas. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v.7, n.2 e 3, p.63-74, 2004.

FUQUAY, J.W.; FOX, P.; MCSWEENEY, P.L.H. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2nd Edition, Four-Volume set, 2nd Edition, 4170p., 2011.

GOMES, V.; AMATO, A.L.; PONTE, G.C.T.G.; BLAGITZ, M.; MADUREIRA, K.M.; DELLA LIBERA, A.M.M.P. Contagem automática e microscópica direta das células somáticas do leite de ovelhas da raça lacaune, utilizando como corantes o Rosenfeld e verde de metil e pironina-y. *Ciência Animal Brasileira*, v.11, n.1, p.162-167, 2010.

GARCIA, R.V.; TRAVASSOS, A.E.R. Aspectos gerais sobre o leite de cabra: uma revisão. *Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"*, v.67, n.386, p.81-88, 2012.

GARINO JUNIOR, F.; MATOS, R.A.T.; MIRANDA NETO, E.G.; BERNARDINO, J.N.N.; SANTOS, E.D.; AGUIAR, G.M.N. Mastite clínica caprina causada por *Arcanobacterium pyogenes*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.64, n.4, 2012.

GOMES, V. *Influência do estágio de lactação na secreção láctea de cabras (Capra hircus) Saanen*. 2003. 86p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GONI, P.; VERGARA, Y.; RUIZ, J.; ALBIZU, I.; VILA, J.; GOMEZ-LUS, R. Antibiotic resistance and epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* strains from ovine and rabbit mastitis. *International Journal of antimicrobial Agents*, v.23, p.268-272, 2004.

GONZALO, C.; TARDAGUILA, J.A.; DE LA FUENTE, L.F.; SAN PRIMITIVO, F. Effects of selective and complete dry therapy on prevalence of intramammary infection and on milk yield in the subsequent lactation in dairy ewes. *Journal of Dairy Research*, v.71, p.33-38, 2004.

HALL, S.M.; RYCROFT, A.N. Causative organisms and somatic cell counts in subclinical intramammary infections in milking goats in the UK. *The Veterinary Record*, v. 160, p.19-22, 2007.

HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *Journal Dairy Science*, v.77, n.7 p.2103-2113, 1994.

HARMON, R.J; HEALD, C.W. Migration of polymorphonuclear leukocytes into the bovine mammary gland during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *American Journal Veterinary Research*, v.43, p.992, 1982.

HOGAN, J. S.; WHITE, D.G.; PANKEY, J.W. Effects of teat dipping on intramammary infections by staphylococci other than *Staphylococcus aureus*. *Journal Dairy Science*, v.70, p.873–879, 1987.

HOGAN, J.S.; WEISS, W.P.; SMITH, K.L. Role of vitamin E and selenium in host defense against mastitis. *Journal Dairy Science*, v.76, p.2795-2803, 1993.

HORTET, P.; SEEGER, H. Calculated milk production losses associated with elevated somatic cells counts in dairy cows: review and critical discussion. *Veterinary Research*, v.29, n.6, p.497-510, 1998.

JENSEN, H.E.; MONTEROS, A.E.; CARRASCO, L. Caprine mastitis due to Aspergillosis and Zygomycosis: a pathological and immunohistochemical study. *Journal of Comparative Pathology*, v.114, p.183-191, 1996.

LEWTER, M.M.; MULLOWNEY, P.C.; BALDWIN, E.W.; WALKER, R.D. Mastitis in goat. *Compendium of Continuing Education in Veterinary*, v.6, n.7, p.417-425, 1984.

KIRK, J.H.; GLENN, J.S.; MAAS, J.P. Mastitis in a flock of milking sheep. *Small Ruminant Research*, v.22, p.187-191, 1996.

KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus* and *Micrococcus* In: MURRAY, P. R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. *Manual of Clinical Microbiology*. 7. ed. Washington, D.C.: ASM Press, 264p., 1999.

KYOZAIRE, J.K.; VEARY, C.M.; PETZER, I.M.; DONKIN, E.F. Microbiological quality of goat's milk obtained under different production systems. *Journal South African Veterinary Association*, v.76, p.69–73, 2005.

LANGONI, H. Mastite bovina. Conceitos e Fundamentos. In: Encontro de pesquisadores em mastites, 2007, Botucatu. *Anais...* Botucatu: Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, p. 8-17, 2007.

LANGONI, H.; CITADELLA, J.; NÓBREGA, D.B.; FACCIOLI, P.Y.; GUIMARÃES, F.F. Effect of a homeopathic compound on somatic cell count and milk production in “Parda Alpina” goats. *Veterinária e Zootecnia (UNESP)*, v.18, n.4, p.621-631, 2011.

LANGONI, H.; CITADELLA, J.C.C.; MACHADO, G.P.; FACCIOLI, P.Y.; LUCHEIS, S. B.; DA SILVA, A.V. Aspectos microbiológicos e citológicos do leite na mastite caprina subclínica. *Veterinária e Zootecnia (UNESP)*, v.19, n.1, p.815-822, 2012.

LANGONI, H.; DA SILVA, A.V.; CABRAL, K.G.; DOMINGUES, P.F. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.20, p.204-209, 1998.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; LUCHEIS, S.B. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. *Revista brasileira de ciência veterinária*, v.13, n.1, p.51-54, 2006.

LEWTER, M.M.; MULLOWNEY, P.C.; BALDWIN, E.W.; WALKER, R.D. Mastitis in goat. *Compendium of Continuing Education in Veterinary*, v.6, n.7, p.417-425, 1984.

LIMA JÚNIOR, A.D.; NADER FILHO A.; VIANNI, M.C.E. Fatores condicionantes da mastite subclínica caprina em criatórios do Rio de Janeiro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.47, n.4, p.463-474, 1995.

McDOUGALL, S.; MURDOUGH, P.; PANKEY, W.; DELANEY, C.; BARLOW J. Scruton D. Relationships among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacterial status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Ruminant Research*, v.40, n.3, p.245-254, 2001.

MARCO, J.C. et al. Epidemiologia da agalaxia contagiosa. *Tratado de patologia y produccion ovina: Agalaxia contagiosa I*, n.29, p.27-44, 1993.

MARIANO, F.A. *Detecção e identificação de enterotoxinas produzidas por Staphylococcus spp. provenientes do leite de cabras das regiões norte e serrana do Estado do Rio de Janeiro*. 2000. 42p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes.

MARTINS, E.C.; WANDER, A.E; CHAPAVAL, L.; BOMFIM, M.A.D. O mercado e as potencialidades do leite de cabra na cidade de Sobral: a visão do consumidor. In: Congresso Brasileiro de Sistemas de Produção. Agricultura familiar, políticas públicas e inclusão social. 2007. 15f. Fortaleza. *Anais....* Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, CD-ROM.

MELO, L.E.H.; MOTA, R.A.; MAIA, F.C.L.; FERNANDES, A.C.C.; SILVA, T.I.B.; LEITE, J.E.B.; BAPTISTA FILHO, L.C.F.; RAMOS, C.A.N. Ocorrência e caracterização da tuberculose em caprinos leiteiros criados no estado de Pernambuco. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, n.9, p.831-837, 2012.

MENDONÇA, C.L.; AFONSO, J.A.B.; SIMÃO, L.C.V. Aspectos clínicos e característicos do leite em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.27, n.1, p.6-12, 2007.

MENZIES, P.I.; RAMANOON, S.Z. Mastitis of sheep and goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.17, n.2, p.333-355, 2001.

MICHAELIDOU, A. M. Factors influencing nutritional and health profile of milk and milk products. *Small Ruminant Research*, v. 79, p. 42-50, 2008.

MONTE, D.F.M.; OLIVEIRA, C.J.B.; JUNIOR, W.D.L.; MOURA, J.F.P.; SOUSA, F.G.C.; BARBOSA, C.M. *Ocorrência de Salmonella enterica em leite caprino produzidas no Cariri Paraibano*. Associação Brasileira de Zootecnia, Zootec 2009, Águas de Lindóia – SP, FZEA/USP-ABZ, p.1-3, 2009.

MORONI, P.; PISONI, G.; RUFFO, G.; BOETTCHER, P.J. Risk factors for intramammary infections and relationship with somatic-cell counts in Italian dairy goats. *Preventive Veterinary Medicine*, v.69, p.163-173, 2005.

MOTA, R.A. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e controle das mastites em caprinos e ovinos. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*, v.2, n.3, p.57-61, 2008.

MOTA, R.A.; DE CASTRO, F.J.C.; DA SILVA, L.B.G.; OLIVEIRA, A.A.F. Etiologia e sensibilidade a antimicrobianos in vitro das bactérias isoladas do leite de cabras com mastite procedentes da Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. *A Hora Veterinária*, v.19, n.114, p.26-29, 2000.

MURICY, R.F. *Ocorrência de mamite subclínica em caprinos e qualidade higiênicosanitária do leite produzido em propriedades associadas à Cooperativa Languiru, Teutônia, RS*. 2003. 83p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MURRAY, P.R.; DREW, W.L.; KOBAYASHI, G. *Microbiologia Médica*. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992, 513p.

NEVES, P.B.; MEDEIROS, E.S.; SÁ, V.V.; CAMBOIN, E.K.A.; GARINO JÚNIOR, F.; MOTA, R.A.; AZEVEDO, S.S. Perfil microbiológico, celular e fatores de risco associados à mastite subclínica em cabras no semiárido da Paraíba. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.30, n.5, p.379- 384, 2010.

NICHOLAS, R.; AYLING, R.; MCAULIFFE, L. *Mycoplasma diseases of ruminants*, British Library, London, UK, p.254, 2008.

NICKERSON, S.C. Preventing new *Staphylococcus aureus* mastitis infections. *Veterinary Medicine*, v.33, p.368-373, 1993.

NMC (National Mastitis Council). *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis* - Revised Edition, 1999.

OLIVEIRA, C.J.B.; HISRICH, E.R.; MOURA, J.F.P.; GIVISIEZ, P.E.N.; COSTA, R.G.; GERBREYES, W.A. On farm risk factors associated with goat milk in Northeast Brazil. *Small Ruminant Research*, v.98, p.64-69, 2011.

PAAPE, M.J. The leucocytes as a defense mechanism. *Journal of American Medical Association*, v.170, n.10, p.1214-1223, 1997.

PAAPE, M.J.; CAPUCO, A.V. Cellular defense-mechanisms in the udder and lactation of goats. *Journal Animal Science*, v.75, p.556-565, 1997.

PAAPE, M.J.; HAFS, H.D.; SNYDER, W.W. Variations of estimated numbers of milk somatic cells stained with Wright's stains or Pyronin Y-methyl green stain. *Journal Dairy Science*, v.46, n.11, p.1211-1216. 1963.

PAAPE, M.J.; POUTREL, B.; CONTRERAS, A.; MARCO, J.C.; CAPUCO, A.V. Milk somatic cells and lactation in small ruminants. *Journal Dairy Science*, v.84, Suplemento E, p.237-244.2001.

PAES, P.R.O.; LOPES, S.T.A.; KOHAYAGAWA, A.; LOPES, R.S.; LANGONI, H.; BULLA, C.; LANGRAFE, L. Efeitos da administração de vitamina E na infecção mamária e na contagem de células somáticas de cabras primíparas desafiadas experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.55, p.15-20, 2003.

PARK, Y.; HAENLEIN, G. Therapeutic and hypoallergenic values of goat milk and implication of food allergy. In: *Handbook of milk of non bovine mammals*. Blackwell Publishing, Iowa, USA, p. 121-35, 2006.

PERSSON, Y.; OLOFSSON, I. Direct and indirect measurement of somatic cell count as indicator of intramammary infection in dairy goats. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.53, n.15, p.1-5, 2011.

PEIXOTO, R.; MOTA, R.A.; COSTA, M. Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.30, n.9, p.54-762, 2010.

PEIXOTO, R.M.; AMANSO, E.S.; CAVALCANTE, M.B.; AZEVEDO, S.S.; PINHEIRO JUNIOR, J.W.; MOTA, R.A.; COSTA, M.M. Fatores de risco para mastite infecciosa em cabras leiteiras criadas no estado da Bahia. *Arquivo do Instituto Biológico*, São Paulo, v.79, n.1, p.101-105, 2012.

PEIXOTO, R.M.; FRANÇA, C.A.; SOUZA JÚNIOR, A.F.; VESCHI, J.L.A.; COSTA, M.M. Etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos da mastite em pequenos ruminantes e concordância de técnicas empregadas no diagnóstico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.30, n.9, p.735-740, 2010.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. *Vencendo a luta contra a mastite*. São Paulo: Milkbuzz, 2002. 192p.

PILLAI, S.R.; KUNZE, E.; SORDILLO, L.M.; JAYARAO, B.M. Application of differential inflammatory cell count as a tool to monitor udder health. *Journal Dairy Science*, Savoy, v.84, n.6, p.1413-1420, 2001.

PINHEIRO JUNIOR, J.W.; OLIVEIRA, A.A.F.; ALVES, F.S.F.; SILVA, L.B.G.; RABELO, S.S.A.; MOTA, R.A. *Corynebacterium pseudotuberculosis* experimental infection of goats mamary gland. *Arquivo do Instituto Biológico*, v.73, n.4, p.395-400, 2006.

PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S.F.; HADDAD, J.P.A. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52, n.5, p.534-543, 2000.

POESTER, F.P.; PICAIO, V.S.G.; LAGE, A.P. Brucellosis in Brazil. *Veterinary Microbiology*, v.90, p.55-62, 2002.

PORTES, V.M.; WOLFF, C.; VAZ, A.K.; DICK, W. Efeito da vacinação contra a mastite estafilocócica sobre a associação de *Staphylococcus* spp. a células do leite. *Acta Scientific Veterinary*, v.34, n.2, p.137-141, 2006.

POUTREL, B. Udder infection of goats by coagulase-negative staphylococci. *Veterinary Microbiology*, v.9, p.31-137, 1984.

POUTREL, B., LERONDELLE, C. Cell content of goat milk: California Mastitis Test, coulter counter, and fossomatic for predicting half infection. *Journal Dairy Science*, v.66, p.2575-2579, 1983.

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

PRESTES, D.S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: Fatores que influenciam – uma revisão. *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia de Uruguaiana*, v.9, n.1, p.48-59, 2002.

QUINN, P. J., CARTER, M. E., MARKEY, B. et al. Mastitis. *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Mosby-Year Book Europe Limited, 1994. Cap. 36, p. 327-344.

QUINN, P. J; MARKEY, B.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. Ed. Artmed. Porto Alegre, 2005. 512p.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. *Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos*. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, RJ. 10 edição. 2007.

RESENDE, K.T.; TOSETTO, E.M. Avaliação de estratégias de manejo em criatórios de caprinos leiteiros. In: Encontro Nacional para o desenvolvimento da espécie caprina. 2004, Botucatu. *Anais...* Botucatu: UNESP/FMVZ, p.184-98.

RIBEIRO, M.G.; LARA, G.H.B.; BICUDO, S.D.; SOUZA, A.V.G.; SALERNO, T.; SIQUEIRA, A.K.; ERALDO, J.S. An unusual gangrenous goat mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* and *Escherichia coli* co-infection. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, p.810–812, 2007.

RIBEIRO, M.E.R.; PETRINI L.A.; AITA M.F.; BALBINOTTI M.; STUMPF JUNIRO, W.; GOMES, J.F.; SCHRAMM, R.; MARTINS, P.R.; BARBOSA, R.S. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteira na região sul do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Agrociência*, v.9, n.3, p.287-290, 2003.

RIFFON, R.; SAYASITH, K.; KHALIL, H.; DUBREUIL, P.; DROLET, M.; LAGACÉ, J. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, n.7, p. 2584-2589, 2001.

ROTA, A.M.; ROJAS, A.; MARTIN, L.; RODRIGUEZ, P.; TOVAR, J.J. Uso de la prueba de California para la deteccion de mamits em el ganado caprino. *Avances en la Alimentación y Manejo Animal*, v.2, n.34, p.67-69, 1994.

ROWE, J.D. Milk quality and mastitis, *Proceedings of the 1998 Symposium on the Health and Disease of Small Ruminants Western Veterinary Conference*, Las Vegas, NV, 1998.

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

SAS Institute. 2009. *SAS/STAT User's Guide*. Version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC.

SCHALM, O.W.; CARROL, E.J.; JAIN, N.C. Bovine mastitis: Physical and chemical tests for detection of mastitis. *Lea and Febiger*, Philadelphia, p.128-157, 1971.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experiments and observations leading to developments and the California Mastitis Test. *Journal American Medicine Association*, v.130, n.5, p.199-207, 1957.

SCHLUNDT, J. New directions in foodborne disease prevention. *International Journal of Food Microbiology*, n.78, p. 3-17, 2002.

SCHUKKEN, Y.H.; WILSON, D.J.; WELCOME, F.; GARRISON-TIKOFSKY, L.; GONZALEZ, R.N. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Veterinary Research*, v.34, p.579-596, 2003.

SCHÜTTEL, M.; LANGONI, H.; JÖRN, H. Estudo comparativo entre a NAGase no leite, no sangue e na urina de bovinos leiteiros sadios no decorrer da lactação. I. Influência de fatores fisiológicos. *Higiene Alimentar*, v.17, p.101-113, 2002.

SILVA, E.R.; ARAÚJO, A.M.; ALVES, F.S.F.; PINHEIRO, R.R.; SAUKAS, T.N. Associação entre o California Mastitis Test e a Contagem de Células Somáticas na avaliação da saúde da glândula mamária caprina. *Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science*, v.38, p.46-48, 2001.

SILVA, E.R.; BOECHAT, J.U.D.; MARTINS, J.C.D.; FERREIRA, W.P.B.; SIQUEIRA, A.P.; SILVA, N. Hemolysin production by *Staphylococcus aureus* species isolated from mastitic goat milk in Brazilian dairy herds. *Small Ruminant Research*, v.56, p.271-275, 2005.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos*. São Paulo: Livraria Varela, 1997. 295p.

SILVA, E.R.; SAUKAS, T.N.; ALVES, S.F.A.; PINHEIRO, R.R. Contagem de células somáticas e California Mastitis Test no diagnóstico da mastite caprina subclínica. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.18, n.2, p.78-83. 1996.

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

SMITH, M.C.; ROGUINSKY, M. Mastitis and other disease of the goat's udder. *Journal American Veterinary Medicine Association*, v.171, p.1241-1248, 1977.

SMITH, M.C.; SHERMAN, D.M. *Goat medicine*. Willey & Blackwell, Ames, Iowa, USA, 2nd, p.870, 2009.

SOARES, L.C.; PEREIRA, I.A.; COELHO, S.M.O.; CUNHA, C.M.M.; OLIVEIRA, D.F.B.; MIRANDA, A.N.; SOUZA, M.M.S. Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados de amostras animais e humanas. *Ciência Rural*, v.38, n.5, p.1346-1350, 2008.

SORDILLO, L.M.; SHAFER-WEAVER, K.; ROSA, D. Immunobiology of mammary gland. *Journal of Dairy Science*, v.80, n.8, p.1851-1865, 1997.

SOUSA, M.A.; PARENTE, C.E.S.R.; VIEIRA-DA-MOTTA, O.; BONNA, I.C.F.; SILVA, D.A.; LENCASTRE, H. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*, v.73, n.12, p.3845-3849, 2007.

SPANAMBERG, A.; SANCHES, E.M.C.; SANTURIO, J.M.; FERREIRO, L. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras - Revisão Bibliográfica. *Ciência Rural*, v.39, n.1, 2009.

STRAUB, J.A.; HERTEL, C.; HAMMES, W.P. A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *Journal of Food Protection*, v.62, p.1150-1156, 1999.

STEHLING, R.N.; VARGAS, O.L.; SANTOS, E.C.; DUARTE, R.M. Estudo da evolução da mastite caprina induzida por enterotoxina estafilocócica e estreptocócica. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.38, p.701-717, 1986.

TANG, Y.; PERSING, D. Molecular detection and identification of microorganisms. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.S.; PFALLER, M.A. *Manual of clinical microbiology*. Washington, D.C.: ASM, cap.13, p.215-244, 1999.

Thrusfield, M. 2005. *Veterinary Epidemiology*. 2nd Edn. Blackwell Science Ltd., London, UK, 2005. 479p.

THURMOND, M. C. Epidemiologic methods in mastitis treatment and control. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.9, n.3, p.435-444, 1993.

THIERS, F.O.; BENITES, N.R.; COSTA, E.O. Proporção de polimorfonucleares neutrófilos (PMN), mononucleares (MN) no leite comparados com os escorres de CMT. *Revista Napgama*, v.4, n.3, p.3-5, 2001.

TOLLERSRUD, T.; NORSTEBO, P.E.; ENGVIK, J.P.; ANDERSEN, S.R.; REITAN, L.J.; LUND, A. Antibody responses in sheep vaccinated against *Staphylococcus aureus* mastitis: A comparison of two experimental vaccines containing different adjuvants. *Veterinary Research*, v.26, p.587-600, 2002.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu; 2004. 718p.

TURIN, L.; PISONI, G.; GIANNINO, M.L.; ANTONINI, M.; ROSATI, S.; RUFFO, G.; MORONI, P. Correlation between milk parameters in CAEV seropositive and negative primiparous goats during an eradication program in Italian farm. *Small Ruminant Research*, v.57, p.73-79, 2005.

TURNER, C.W.; BEROUSEK, E.R. Blind halves in a goat's udder. *Journal Dairy Science*, v.25, p.549, 1942.

VASSILIADOU, D.K. Mastitis-related pathogens in goat milk. *Small Ruminant Research*, v.4, p.203-212, 1991.

VERNOZY, C.R.; MAZUY, C.; PERRIN, G.; HAOND, F.; BES, M.; BRUN, Y.; FLEURETTE, J. Identification *Micrococcaceae* isolated from goat's milk and cheese in the Poitou-Charentes region. *International Journal of Food Microbiology*, v.30, n.3, p.373-378, 1996.

VILLALOBOS, A.C. Aspectos nutricionales de la leche de cabra (*Capra hircus*) y sus variaciones en el proceso agroindustrial. *Agronomia Mesoamericana*, v. 16, n. 2, p. 239-52, 2005.

VILANOVA, M.; GONÇALVES, M.; OSÓRIO, M.T.M.; ESTEVES, R.; SCHMIDT, V. Aspectos sanitários do úbere e composição química do leite de cabras Saanen. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.36, n.3, p.235-240, 2008.

ZENG, S.S. Comparasion of goat milk standards with cow milk standads for analysis of somatic cell count, fat and protein in goat milk. *Small Ruminat Research*, v.21, n.3, p.221-225, 1996.

ZENG, S.S.; ESCOBAR, E.N. Comparison of goat milk standards with cow milk standards for analyses of somatic cell count, fat and protein in goat milk. *Small Ruminant Research*, v.21, n.3, p.221-225, 1996.

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

ZENG, S.S.; ESCOBAR, E.N.; HART, S.P.; HINCKLEY, L.; BAULTHAUS, M.; ROBINSON, G.T.; JAHNKE, G. Comparative study of the effects of testing laboratory, counting method, storage and shipment on somatic cell counts in goat milk. *Small Ruminant Research*, v.31, p.103-107, 1999.

WHITE, E.A.; PAAPE, M.J.; WEINLAND, A.J.; MATHER, I.H. Virulence of three strains of *Staphylococcus aureus* isolated from clinically infected bovine mammary glands. *Journal Dairy Science*, v.63, p.1128-1233, 1980.

WILSON, I.G.; COOPER, J.E.; GILMOR, A. Detection of enterotoxigenic of *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: use of polymerase chain reaction for amplification and detection of staphylococcal enterotoxin genes entB and entC1 and the thermonuclease gene nuc. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, p. 1793-1798. 1991.

YASSIN, A.F.; HUPFER, H.; SIERING, C.; SCHUMANN, P. Comparative chemotaxonomic and phylogenetic studies on the genus *Arcanobacterium* Collins et al. 1982 emend. Lehnen et al. 2006: proposal for *Trueperella* gen. nov. and emended description of the genus *Arcanobacterium*. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*, v.61, p.1265-1274, 2011.

TRABALHOS CIENTÍFICOS

9. TRABALHOS CIENTÍFICOS

9.1 Artigo redigido de acordo com as normas do periódico científico "Small Ruminant Research"

Microbiological characterization and somatic cell count by flow cytometry (Somacount 300®) and microscopic count (Prescott and Breed, 1910) from mastitic milk of dairy goats

G.P. Machado^a, F.F. Guimarães^a, R.C. Da Silva^a, J.C.F. Pantoja^a, H. Langoni^{a*}

^a Department of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine and Science, São Paulo State University, Botucatu Campus, São Paulo State, Brazil.

* Corresponding author. Tel.: +14 30802094; fax: +14 30802042.
E-mail address: hlangoni@fmvz.unesp.br (H. Langoni).

ABSTRACT

This study was aimed to analyze the milk samples from 257 goats and 10 bulk tanks from 10 dairy goat farms of São Paulo State, Brazil. The microbiological characterizations of coagulase-positive staphylococci - CPS (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus hyicus*), California Mastitis Test (CMT), automatic somatic cell count (SCC) by Somacount 300® calibration for bovine milk and microscopic SCC were carried out. The prevalence of subclinical and clinical mastitis in goat by microbiological culture was 43.6% and 5.84%, respectively. A total of 178 half-udders were positive by microbiological culture and coagulase-positive staphylococci - CNS (70%), *S. aureus* (13.5%), *S. intermedius* (7.9%), and Enterobacteriaceae (4%) were the most prevalent pathogens. No sample was negative to CMT. The distribution of the CMT scores in half-udders were: 1 (42.69%), 2 (29.63%) and 3 (27.68%). The CMT scores 2 and 3 showed low sensitivity and specificity for the diagnosis of subclinical mastitis. The Somacount 300® calibrated to bovine milk overestimated the microscopic SCC in 2.1 times, both of which showed no cut-off point for efficient simultaneous maximization of sensitivity and specificity.

Keywords: Goats, mastitis, coagulase-positive staphylococci, CMT, somatic cell count.

1. Introduction

The importance of goat milk for human feeding is not only the biological value of its nutrients, but also in their characteristics hypoallergenicity, which makes differentiated food. According Langoni et al. (2006), with the improvement of goat breeding and increased milk production, there has been a greater concern with the quality of the milk, which requires the control of diseases that may alter its characteristics, the main one being mastitis.

Mastitis is a complex disease resulting from interaction between the agents, animal and environment associated with the presence of microorganisms in most cases. Constitutes an important health problem animal and public health, with great economic impact in virtually all countries of the world (Smith and Sherman, 2009).

Mastitis can be classified as clinical or subclinical. Animals with clinical mastitis may experience swelling, increased temperature, hardness and pain in the mammary gland, and the presence of lumps, pus, or other changes in the physical characteristics of milk (Fonseca and Santos, 2001; Ribeiro et al., 2003). In the subclinical mastitis the milk remains without macroscopic alterations. Presents the positive California Mastitis Test (CMT) or other tests indicative, confirming by the microbial growth. It can be detected directly or indirectly by counting of somatic cells in milk (Cullor et al., 1994; Ribeiro et al., 2003).

The etiologic agents identified mostly are similar to those found in bovine mastitis as coagulase-positive staphylococci (CPS), coagulase-negative staphylococci (CNS), *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Corynebacterium* spp., *Pseudomonas* sp. and some species of fungi and yeast (Langoni et al., 1998; Contreras et al., 2007).

The goat mastitis-related *Staphylococcus aureus* are the most important for animal and public health and is most often attributed to poor hygiene during milking, the excessive sucking lamb or by contact with contaminated pastures may lead to gangrenous mastitis frames due to specific toxins responsible for severe lesions in the breast, such as α -toxin producing necrosis of the cells (Anderson et al. 2004).

Considering the sources of infection and routes of transmission, the causative agents of mastitis were conventionally classified as contagious and environmental. The contagious are present in the skin microbiota of mammary gland, mucous membranes and conjunctiva of the animals, as well as the milking equipment in cloths used for cleaning and drying of the teats and the milkers own hands. Flies can participate as mechanical vectors of infectious agents (Bradley, 2002).

The infection occur predominantly during milking. The microorganisms, invade the mammary gland, causing immediate inflammatory response. Among the major contagious pathogens highlight *S. aureus* and *S. agalactiae*, which occur with a high prevalence and usually cause subclinical mastitis (Hortet and Seegers, 1998).

The group of environmental agents is present in organic matter (soil and feces), water, air and animal bedding. The infection occurs mainly between milkings, but may also occur during the milking. Fungi, yeasts, algae and enterobacteria are the major environmental pathogens, with special importance in this group *E. coli*. Despite the lower prevalence of mastitis caused by these agents often cause severe clinical mastitis and may take animals died (Radostits et al., 2007).

The prevention and control are the starting points for the adoption of sanitary measures within the property. These measures are applied simultaneously to reduce rates of clinical and subclinical infections in the herd, being related to the hygienic aspects of animals, milking and the people involved in milking. The milking hygiene is the key to the success of a program for mastitis control (Langoni, 2007).

The early detection of mastitis, the treatment of clinical cases, milking starting from healthy animals, hygiene and disinfection during the whole milking process, using pre-dipping and post-dipping, maintaining adequate levels of the parameters of milking vacuum and pulse, treatment at drying are the most important measures for prevention and control of mastitis (Domingues and Langoni, 2001).

The animal welfare and milk quality are directly related to health, nutrition and herd management, as well as training of hand labor, proper management of the facilities and equipment used for milking and transportation to the industry (Langoni et al., 2012).

Given the importance of the goat, the economic losses caused by mastitis and the lack of information about this disease in goats, this study aimed to realization of microbiological diagnosis and biochemical characterization of CPS (*S. aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus*) in goat milk mastitic, the comparison between the methods of automatic SCC (Somacount 300®) calibrated for bovine milk with microscopic SCC standardized by Prescott and Breed (1910), establishing a correlation with the results obtained by the CMT.

2. Methods

2.1 Dairy Farms

The milk samples were collected from 10 dairy goat farms of São Paulo State (Brazil) where mainly Saanen (n=8; 80.0%) e Anglo-Nubiana (n=2; 20.0%) breeds were reared. The rearing systems were intensive (n=8; 80%) and extensive (n=2; 20.0%). The mean flock size was 49.3 ± 44.64 (mean $\pm$ SD) with a range from 20 to 160. The flocks were hand-milking (n=3; 30.0%) and mechanics-milking (n=7; 70.0%) of farms.

2.2 Sampling

A total of 513 half-udder milking sample (257 goats) and 10 bulk tanks were collected in a single sampling time in each of the 10 flocks during the lactation period. The first few streams of milk were discarded, and duplicate half-udder milk sample were aseptically collected into sterile tubes after cleaning and disinfection of the teat end. One sample (10 mL) was used for bacteriological analysis, microscopic Somatic Cell Count (SCC) and the other one (40 mL) was added with bronopol (2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol) and analyzed for automatic SCC. The milk sample were stored at +4°C, and bacteriological and SCC examinations were carried out withing 12 and 24 hours after sampling

2.3 Bacteriological Analysis and Isolation Procedures

Each half-udders milk sample was homogenized and 10 μ L were then inoculated onto 5.0% Sheep Bood Agar (SBA) and MacConkey Agar (MA) plates. The SBA and MA plates were then incubated aerobically at +37°C and examined after 24, 48 and 72 hours. The total bacterial count (TBC) was performed only in bulk tanks. Bacterial strain were isolated on Brain Heart Infusion Agar (BHI, Oxoid, Basingstoke, UK), and identified using routinary microbiological procedures such as colony morphology, microscopic characteristics and Gram staining, hemolysis pattern on SBA, catalase and oxidase reactions.

The coagulase test was performed from cultured for 24 hours on blood agar. Three to five colonies of staphylococci were transferred to tubes containing 0.25 mL rabbit plasma (plasma clot Probac®) and 0.5 mL of BHI broth, followed by incubation at 37 ° C for 24 hours. The positive test result was represented by the formation of a clot gelatinous and firm.

The coagulase-positive staphylococci were identified according Quinn et al. (1994), by the biochemical test that determine the utilization of the sugars maltose, trehalose and mannitol, fermentation of acetoin and the antibiotic susceptibility test (AST) to determine the sensitivity and resistance to oxacillin, vancomycin, novobiocin and polymyxin B.

The standard bacterial strains international reference were used as controls: *S. aureus* (ATCC 25923), *S. intermedius* (ATCC 29663) and *S. hyicus* (ATCC 11249).

2.4 California Mastitis Test (CMT)

The CMT was carried out in the milking room. According to manufacturer's recommendations (CMT-Fatec®), reactions were scored as: 0 (absence of any variation in viscosity) and traces (slight slime which disappear); 1 (slime without gel), 2 (appreciate gel) and 3 (gel adhered to the bottom of the cup). We sampled all animals with a score starting from 1.

2.5 Automatic and Microscopic SCC

The SCC was determined by flow cytometry (Somacount 300®) calibration for bovine milk and microscopic SCC standardized by Prescott and Breed (1910), fixed in Carnoy's solution and stained with methyl green-pyronin-Y (Zeng, 1996). The cut-off to define an intramammary infection was 1×10^6 cells/mL.

2.7 Statistical Analysis

Descriptive statistics PROC FREQ and PROC MEANS (SAS Institute, 2009) were produced to characterize the study population, describe the etiologic agents of mastitis and to estimate the prevalence of clinical and subclinical mastitis. The chi-square or Fisher (PROC FREQ, SAS Institute, 2009) was used to test hypothesis that the prevalence of mastitis was heterogeneous among farms. The counting of somatic cells and bacteria were transformed to logarithmic scale for analysis. Analysis of variance (PROC MIXED, SAS Institute, 2009) was used to compare the mean of automatic and microscopic SCC between CMT scores, and mean automatic SCC between groups of mastitis pathogens.

Diagnostic characteristics of CMT, automatic and microscopic SCC to identify mammary infections were estimated using sensitivity, specificity, predictive value of positive and predictive value of negative test.

The linear association between automatic SCC and CBT in bulk tanks milk was estimated using Pearson correlation coefficient. A linear regression model (PROC REG, SAS Institute, 2009) was used to assess the correlation between automatic and microscopic SCC.

3. Results

3.1 Mastitis

Were examined 257 lactating goats. One half-udder was lost. Microbiological tests were performed on 513 samples of half-udders milk, which showed positive reactions to CMT as well as determination of CCS.

No sample showed negative to CMT or contaminated, and 34.7% (178/513) had bacterial growth and 65.3% (335/513) did not.

The prevalence of subclinical mastitis by microbiological culture was 43.6% (112/257) and 5.84% of clinical mastitis (15/257). In half-udders prevalence of subclinical mastitis in microbiological culture was 34.7% (178/513) and 2.92% of clinical mastitis (15/513). In subclinical mastitis has mean of 1.6 (178/112) infected half-udders by goat.

The prevalence of clinical and subclinical mastitis in goats and half-udders was not homogeneous in the properties ($P<0.01$), varying the prevalence of subclinical mastitis in goats between 23.68% and 68% and in half-udders between 14.5% and 58.6%. The prevalence of clinical mastitis in goats ranged between 4% and 34.28% and in half-udders between 2% and 17.14%.

3.2 Etiology

From 178 positive half-udders, the frequency of isolated pathogens were: CNS (n=123; 70%), *S. aureus* (n=24; 13.5%), *S. intermedius* (n=14; 8.0%), Enterobacteriaceae (n=7; 4%), *Corynebacterium* spp. (n=3; 1.7%), *S. hyicus* (n=3; 1.7%), *Streptococcus* spp. (n=1; 0.6%), Micrococcus spp. (n=1; 0.6%), *S. schleiferi* subsp. *coagulans* (n=1; 0.6%) e *S. lutrae* (n=1; 0.6%).

Among the 513 half-udders evaluated the pathogens most frequently isolated are CNS (n=132; 24%), *S. aureus* (n=24; 4.7%), *S. intermedius* (n=14; 2.73%), Enterobacteriaceae (n=7; 1.4%), *Corynebacterium* spp. (n=3; 0.6%) and *S. hyicus* (n=3; 0.6%).

The frequency of CNS in dairy goat farms ranged between 2.5%-50%, *S. intermedius* between 1.4%-13.1%, *S. aureus* between 1.3%-12.9%, Enterobacteriaceae between 1.6%-5%, *Corynebacterium* spp. between 2.2%-2.5% and *S. hyicus* between 2.5%-3.4%. The distribution of pathogens isolated from milk samples of half-udders was not homogeneous in the dairy farms ($P<0.01$).

3.3 California Mastitis Test (CMT)

Were evaluated by CMT 513 half-udders samples and 10 bulk tanks. None of the samples were negative in the CMT test.

The distributions of scores CMT on the 513 half-udders were: 1 (42.69%), 2 (29.63%) and 3 (27.68%). Regarding to the results of CMT on the bulk tanks were: 3 (60%), 2 (30%) and 1 (10%).

The mean scores automatically and microscopic SCC increased according to the CMT and the largest average automatically and microscopic SCC were in the score 3 (Table 1).

TABLE 1. Mean, Median and Standard Deviation of automatically and microscopic CCS by CMT scores of milk half-udders samples.

SCC (Cells/mL)	Half-udders CMT scores		
	1 ¹	2	3
N	219	152	142
Automatic			
Mean	642.821,9	1.208.427,6	3.701.366,2
Median	205.000,0	631.500,0	1.956.500,0
Standard Deviation	1.156.757,5	155.1047,2	3.771.273,8
Mean (Log10) ²	5.3 ^a	5.6 ^b	6.1 ^c
Standard Deviation (Log10)	0.7	0.8	0.9
Microscopic			
Mean	307.535,9	583.070,4	1.918.049,3
Median	102.478,0	317.700,0	812.947,0
Standard Deviation	551.931,9	790.935,2	2.283.473,8
Mean (Log10) ³	5.0 ^a	5.3 ^b	5.8 ^c
Standard Deviation (Log10)	0.7	0.8	0.8

¹Classification CMT score: 0 (absence of any variation in viscosity) and traces (slight slime which disappear); 1 (slime without gel), 2 (appreciate gel) and 3 (gel adhered to the bottom of the cup).

^{2,3}Different letters in the same row indicate statistical difference between the means (P<0.05).

The sensitivity, specificity, predictive value positive (PVP) and predictive value negative (PVN) of half-udders CMT with reference to microbiological culture, ranging between of the cut-off 2 and 3. The sensitivity ranged between 30.34% for score 3 and 68.54% for score 2. The specificity ranged between 48.66% for score 2 and 73.73% for score 3. The PVP ranged between 38.03% for score 3 and 41.5% for score 2, while the PVN ranged between 66.58% for score 3 and 74.43% for score 2 (Table 2).

TABLE 2. Sensitivity, specificity, predictive value positive and predictive value negative of the CMT of half-udders with reference to microbiological culture.

Cut-off (Half-udder CMT)	Sensitivity	Specificity	Predictive Value Positive	Predictive Value Negative
2	68.54%	48.66%	41.50%	74.43%
3	30.34%	73.73%	38.03%	66.58%

5.5 Automatic and microscopic SCC

The prevalence of subclinical mastitis determined by automatic and microscope SCC (cut-off: 1×10^6) was not homogeneous among the farms (P<0.01). However, there was no statistical difference between the prevalence of automatic SCC 42% (108/257) and microscopic 49.7% (127/257) in milk samples (Table 3).

TABLE 3. Prevalence of subclinical mastitis based on automatic and microscopic SCC in composite milk samples.

Farms	Goats (N)	Automatic SCC (Positive)		Microscopic SCC (Positive)	
		N	% ¹	N	% ¹
1	31	20	64.52	18	58.06
2	35	26	74.29	27	77.14
3	22	16	72.73	13	59.09
4	25	13	52.00	18	72.00
5	23	14	60.87	7	30.43
6	38	6	15.79	9	23.68
7	20	8	40.00	5	25.00
8	23	3	13.40	11	47.83
9	20	1	5.00	6	30.00
10	20	1	5.00	13	65.00
Total	257	108	42.00^a	127	49.40^a

¹P<0.01 for test of homogeneity of prevalence between farms; ^aEqual letters in the same row did not mean statistical difference between the prevalences (P>0,05).

The prevalence of subclinical mastitis determined by automatic SCC in goats and half-udders were not homogeneous between farms (P<0.01). There was no statistical difference between the prevalence of automatic SCC in goats 42% (108/257) and half-udders 36.25% (186/513) in composite milk samples (Table 4).

TABELA 4. Prevalence of subclinical mastitis according to automatic SCC composite milk samples of goats and half-udders.

Farms	Goats (N)	Positive		Half-udders (N)	Positive	
		N	% ¹		N	% ¹
1	31	20	64.52	61	38	62.29
2	35	26	74.29	70	43	61.43
3	22	16	72.73	44	32	72.73
4	25	13	52.00	50	20	40.00
5	23	14	60.87	46	28	60.87
6	38	6	15.79	76	6	7.89
7	20	8	40.00	40	14	35.00
8	23	3	13.40	46	3	6.52
9	20	1	5.00	40	1	2.50
10	20	1	5.00	40	1	2.50
Total	257	108	42.00^a	513	186	36.25^a

¹P<0.01 for test of homogeneity of prevalence between farms; ^aEqual letters in the same row did not mean statistical difference between the prevalences (P>0,05).

The prevalence of subclinical mastitis determined by microscopic SCC in goats and half-udders were not homogeneous between farms (P<0.01). However, statistically difference (P<0.05) between the prevalence of automatic SCC in goats 49% (127/257) and half-udders 40.20% (206/513) (Table 5).

TABLE 5. Prevalence of subclinical mastitis according to microscopic SCC in goats and half-udders. The cut-off to define an intramammary infection was 1×10^6 cells/mL.

Farms	Goats (N)	Positive		Half-udders (N)	Positive	
		N	% ¹		N	% ¹
1	31	18	58.06	61	45	73.77
2	35	27	77.14	70	45	64.29
3	22	13	59.09	44	34	77.27
4	25	18	72.00	50	23	46.00
5	23	7	30.43	46	29	63.04
6	38	9	23.68	76	8	10.53
7	20	5	25.00	40	16	40.00
8	23	11	47.83	46	4	8.70
9	20	6	30.00	40	1	2.50
10	20	13	65.00	40	1	2.50
Total	257	127	49.40^a	513	206	40.20^b

¹P<0.01 for test of homogeneity of prevalence between farms; ^aDifferent letters in the same row indicate statistical difference between the means (P<0.05).

The automatic SCC bulk tanks for farm ranged between 820.000 cells/mL and 5.855.000 cells/mL and microscopic SCC ranged between 257,000 cells/mL and 1.986.580 cells/mL. The TBC ranged between 104.000 CFU/mL and 2.410.000 CFU/mL. There was no correlation between automatic SCC and TBC of milk in bulk tank ($r=0.06$; $P=0.34$). CMT scores ranged between 1 and 3, and (60%) bulk tanks showed score 3, (30%) score 2 and (10%) score 1 (Table 6).

TABLE 6. Automatic and microscopic SCC, TBC and CMT in milk samples of bulk tanks of dairy goat farms.

Farms	CMT score	Automatic SCC (Cells/mL)	Microscopic SCC (Cells/mL)	TBC (CFU/mL)
1	1	820.000	296.014	286.000
2	3	944.000	317.452	104.000
3	2	5.855.000	1.986.580	171.000
4	3	1.782.000	813.081	2.410.000
5	3	2.429.000	1.180.752	257.000
6	2	983.000	275.146	1.321.000
7	2	1.620.000	693.274	680.000
8	3	1.110.000	425.291	710.000
9	3	1.360.000	525.214	410.000
10	3	1.840.000	713.648	370.000

There was no correlation between the prevalence of subclinical mastitis and automatic SCC in bulk tank ($r=-0.07$; $P=0.28$). The highest prevalence of automatic SCC in goats was 74.29% (26/35) on the farm 1, this farm is found to lower automatic SCC in bulk tank 820.000 cells/mL. Most automatic SCC in bulk tank was 5.855.000 cells/mL was found on the farm 3, not corresponding with the lowest prevalence of subclinical mastitis 5% (1/20) found on the farms 9 and 10 identically (Table 7).

TABLE 7. Prevalence of subclinical mastitis by automatic SCC in milk samples of goat and automatic SCC of bulk tanks.

Farms	Goats (N)	Automatic SCC (Goats Positive)		Automatic SCC (Bulk Tank)
		N	%	
1	31	20	64.52	820.000
2	35	26	74.29	944.000
3	22	16	72.73	5.855.000
4	25	13	52.00	1.782.000
5	23	14	60.87	2.429.000
6	38	6	15.79	983.000
7	20	8	40.00	1.620.000
8	23	3	13.40	1.110.000
9	20	1	5.00	1.360.000
10	20	1	5.00	1.840.000
Total	257	108	42.00	

Among the pathogens, *S. aureus* showed the highest median automatic SCC 5.228.000 cells/mL, followed by *S. hyicus* 1.292.000 cells/mL, CNS 1.105.000 cells/mL, *S. intermedius* 791.000 cells/mL, Enterobacteriaceae 596.000 cells/mL and *Corynebacterium* spp. 287.000 cells/mL. In microscopic SCC *S. aureus* showed the highest median 2.103.698 cells/mL, followed by CNS 4.93.082 cells/mL, *Corynebacterium* spp. 401.629 cells/mL, *S. intermedius* 300.613 cells/mL, Enterobacteriaceae 297.341 cells/mL and *S. hyicus* 459.176 cells/mL.

Were created five groups of pathogens: group 1 (Enterobacteriaceae), group 2 (*Corynebacterium* spp.), Group 3 (Negative), group 4 (CNS and *Micrococcus* spp.) and Group 5 (*S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. lutrae* and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*) to determine the mean of automatic SCC half-udders by group of pathogens isolated by microbiological culture. Were found statistical difference ($P < 0.05$) between groups 4 and 3 and between groups 5 and 3 (Table 8).

TABLE 8. Mean automatic SCC of half-udders by group of pathogens isolated from milk samples of half-udders.

Group	Pathogens	N	Mean*	Standard Deviation	Geometric Mean
1	Enterobacteriaceae	7	5,87 ^{ab}	0,67	745.418,42
2	<i>Corynebacterium</i> spp.	3	5,47 ^{ab}	1,52	295.596,98
3	Negative	335	5,43 ^a	0,85	271.456,34
4	CNS <i>Micrococcus</i> spp.	124	5,86 ^b	0,72	727.612,24
5	<i>S. aureus</i> <i>S. intermedius</i> <i>S. hyicus</i> <i>S. lutrae</i> <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	43	6,20 ^b	0,82	1.604.353,25

*Different letters in the same row indicate statistical difference between the means ($P < 0.05$).

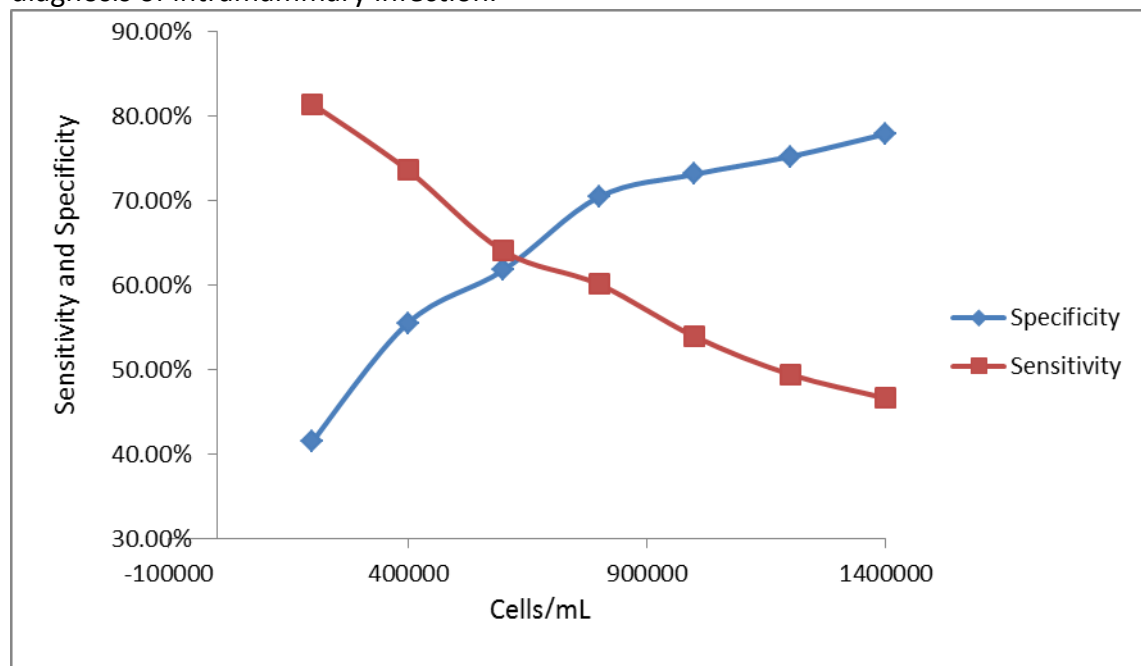
The sensitivity, specificity, PVP and PVN of automatic SCC ranged between cut-offs 200.000 and 1.400.000 cells/mL. The sensitivity ranged between 46.63% and

81.46%, specificity between 41.49% and 77.91%, PVP between 73.31% and 80.81% and PVN between 42.52% and 52.87% (table 9). The simultaneous maximization of sensitivity and specificity was at the cut-off of 600.000 cells/mL with a sensitivity of 64.04% and specificity 61.79% (Graph 1).

TABLE 9. Sensitivity, specificity, predictive value positive and predictive value negative of automatic SCC of half-udders.

Cut-offs (Cells/mL)	Sensitivity	Specificity	Predictive Value Positive	Predictive Value Negative
200.000	81.46%	41.49%	80.81%	42.52%
400.000	73.60%	55.52%	79.83%	46.79%
600.000	64.04%	61.79%	76.38%	47.11%
800.000	60.11%	70.45%	76.87%	51.94%
1.000.000	53.93%	73.13%	74.92%	51.61%
1.200.000	49.44%	75.22%	73.68%	51.46%
1.400.000	46.63%	77.91%	73.31%	52.87%

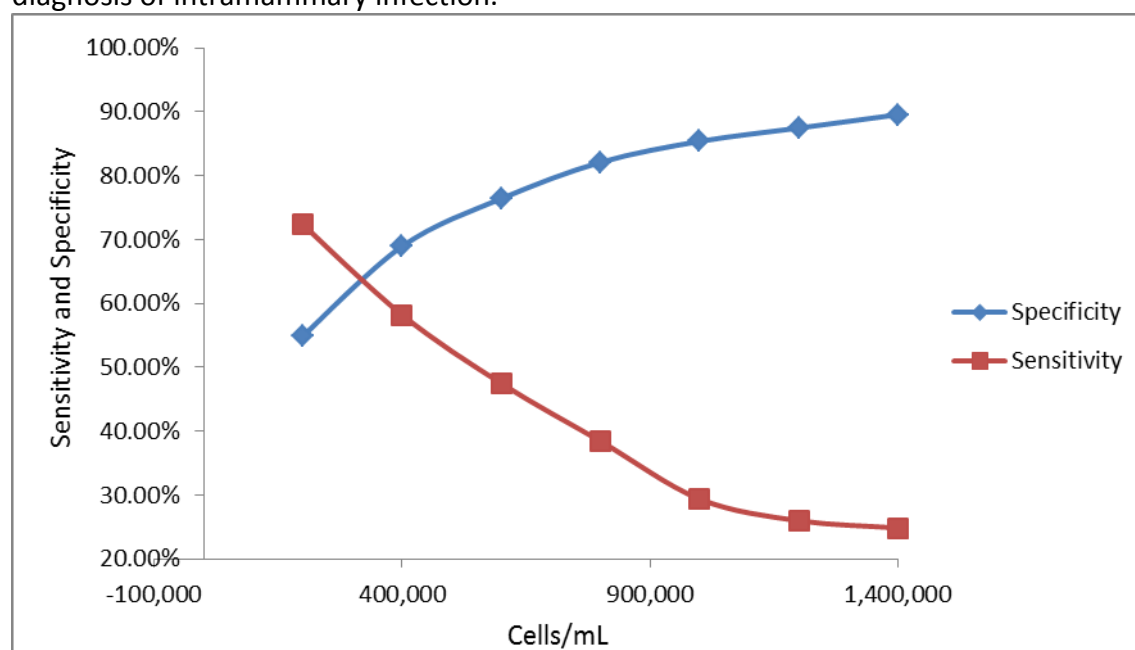
GRAPH 1. Sensitivity and specificity for different cut-off points automatic SCC diagnosis of intramammary infection.



The sensitivity, specificity, predictive value positive and predictive value negative of microscopic SCC ranged between cut-offs 200.000 and 1.400.000 cells/mL. The sensitivity ranged between 24.86% and 72.32%, specificity between 54.93% and 89.55%, PVP between 69.28% and 78.97% and PVN between 45.88% and 55.70% (Table 10). Maximizing sensitivity and specificity at the cutoff of 400.000 cells/mL with sensitivity of 58.19% and specificity 68.96% (Figure 2).

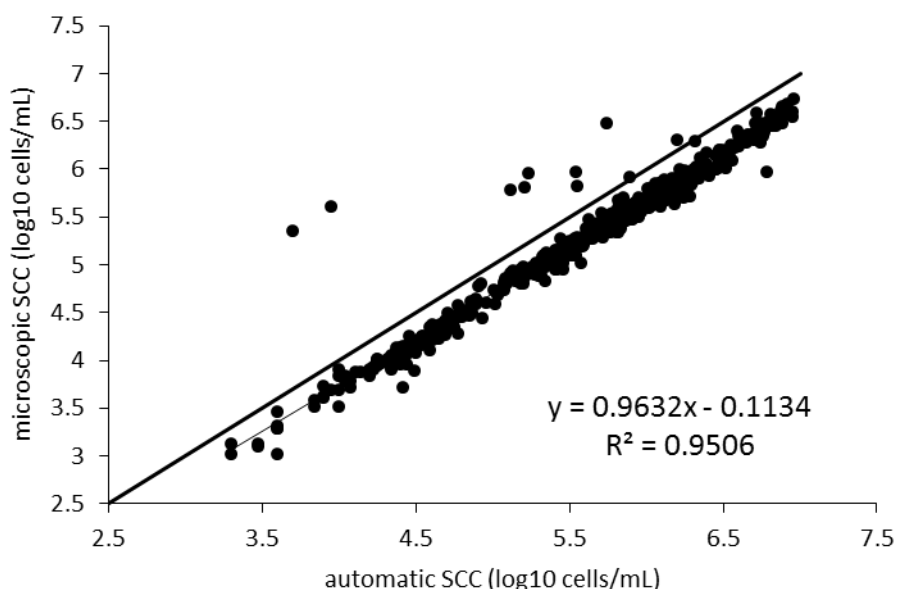
TABLE 10. Sensitivity, specificity, predictive value positive and predictive value negative of microscopic SCC of half-udders.

Cut-offs (Cell/mL)	Sensitivity	Specificity	Predictive Value Positive	Predictive Value Negative
200.000	72.32%	54.93%	78.97%	45.88%
400.000	58.19%	68.96%	75.74%	49.76%
600.000	47.46%	76.42%	73.35%	51.53%
800.000	38.42%	82.09%	71.61%	53.13%
1.000.000	29.38%	85.37%	69.59%	51.49%
1.200.000	25.99%	87.46%	69.10%	52.27%
1.400.000	24.86%	89.55%	69.28%	55.70%

GRAPH 2. Sensitivity and specificity for different cut-off points microscopic SCC diagnosis of intramammary infection.

To determine the association between automatic and microscopic SCC were excluded results from milk samples of half-udders with SCC > 10.000.000 cells/mL, being the maximum limit for the data does not get truncated. There was an association of great magnitude between the microscopic and automatic SCC ($R^2=0.95$; $P<0.0001$) (Graph 3). However, in mean, the automatic SCC (geometric mean: 404,948 cells/mL) was 2.1 times larger than the microscopic SCC (geometric mean: 195.209 cells/mL). The linear equation for predicting the microscopic SCC, using the values of automatic SCC was $y=0.9632x - 0.1134$.

GRAPH 3. Linear regression of automatic and microscopic SCC. The central solid line indicates perfect agreement between the variables.



4. Discussion

Mastitis is the most expensive disease of dairy herd. In fact, the losses related to mastitis are two times higher than the losses related to infertility and reproductive disorders. Moreover, from the point of view of productivity, disease risk, international trade and animal welfare, mastitis tops the list. Most dairy farmers realize these losses through: clinical cases, discard of animals and veterinary medicine costs. The loss less obvious but more important is what happens in the production, which is caused by subclinical mastitis (Philpot and Nickerson 2002).

The prevalence of subclinical mastitis in goats was 43.6% and 34.7% in the half-udders. The prevalence of subclinical mastitis in goats is higher than that found by Neves et al. (2010) 11.49% and Bianchini et al. (2010) 6.88% in the state of Paraíba, for Langoni et al. (2012) 12.5% in the states of São Paulo and Minas Gerais and Peixoto et al. (2012) 29.06% in the state of Bahia.

The higher prevalence of subclinical mastitis was found in farm 4 (68.0%) and lowest in the farm 6 (23.68%). According Contreras et al. (2007), subclinical mastitis predominates in herds of small ruminants, with prevalence between 5% and 30%, reaching high rates in certain management situations.

The farm 4, which had the highest prevalence of subclinical mastitis differed mainly farm 6 with lower prevalence of the following characteristics: the animals were kept confined, milking was performed manually, drying of the goats was the intermittent type and antibiotics were not realized during drying, being cases of clinical treated by intramammary antibiotic infusion. Faced with these management characteristics, we observed that the flocks confined, milking manually, don't treated by intramammary antibiotic infusion on drying and that in cases of clinical mastitis therapy only by intramammary antibiotic infusion, are more susceptible to the occurrence and transmission of mastitis (Contreras et al. 1998; Chaffer et al. 2003; Gonzalo et al. 2004).

The prevalence of mastitis in goats was 5.84% and 2.92% in half-udders. The prevalence of mastitis in goats was above the level mentioned in the literature (<5%),

however, is normal to increased prevalence in the absence of a proper management hygienic-sanitary (Contreras et al., 2007).

Pinheiro et al. (2000) studied the prevalence of clinical mastitis goats in Ceará noting prevalence of 51.2% in a flock of goats in poor conditions along with other species of livestock, which demonstrates that the prevalence value is proportional to the type sanitary management adopted in dairy goat farm (Smith and Sherman, 2009; Fuquay et al., 2011).

The farms that had clinical mastitis in the herd, maintained animals confined during lactation and dry period, performed manual milking, and the farm 1 drying was abrupt and farms 3 and 4 intermittent and only farm 2 and 3 used antibiotics in the drying. This shows that several factors may influence the occurrence of clinical mastitis in the herd, among them are: natural resistance of the mammary gland, installation type, stage of lactation, heredity, age of animals, infectivity, pathogenicity and virulence of the agent, early diagnosis, antibiotics during drying and type of milking, and the lack of a program to prevent and control mastitis (Anderson et al., 2004; Mota, 2008).

The bacterial culture is considered the gold standard in the diagnosis of infections of the mammary gland. Of the 513 milk samples of half-udders examined, 178 (34.70%) had bacterial growth, while 335 (65.30%) were negative. Negative cultures may be related, probably, the absence of disease, aseptic mastitis or agents that require special conditions for isolation (Mota, 2008).

Microbiological analysis showed the occurrence of important mastitis pathogens in the 10 dairy goat farms. Among the most frequently isolated pathogens in the mammary gland: CNS (23.98%), CPS (8.36%), Enterobacteriaceae (1.4%), *Corynebacterium* spp. (0.60%), *Micrococcus* spp. (0.20%), and *Streptococcus* spp. (0.20%). All these pathogens with the exception of CPS (*S. scheleiferi* subsp. *coagulans* and *S. lutrae*) have been isolated in goats milk in Brazil by Mota et al. (2000), Silva et al. (2004), Langoni et al. (2006), Almeida, (2009), Neves et al. (2010) and, Peixoto et al. (2012).

The farms with highest prevalence of subclinical mastitis in half-udders and highest percentages of isolation of CNS were: farm 2 (58.6%), farm 4 (58.0%) and farm 3 (50.0%). These farms maintained confined herds and milking manually, and these characteristics may favor infection of the mammary gland, as the CNS that are some commensal species on animal skin, mucosal and hands of milkers, being relatively stable in the environment and can cause contagious mastitis (Oliveira et al., 2011; Peixoto et al., 2012).

The high prevalence of CNS (23.98%) corroborates the findings of Silva et al., 2004, Langoni et al. (2006), Peixoto et al. (2010) and Oliveira et al. (2011), being the most important genus of mastitis in goats in different husbandry systems.

Infections caused by CNS are more compatible with the absence of clinical signs in animals and are important agents of subclinical mastitis in goats. These microorganisms can cause subclinical infections throughout lactation persist for a few months or even in the dry period (Poutrel, 1984). In herds of dairy goats where don't practice sanitation of teats, there is a high prevalence of *S. epidermidis* (Hogan et al. 1987; Moroni et al. 2005). However, the research of the CNS is not part of the objectives of this study.

S. aureus, was the CPS more isolated in this study, considered classic agent of mastitis, especially as cause of contagious mastitis, being difficult to treat due to high resistance and risks to public health by production of heat-resistant toxins (Fagundes e Oliveira, 2004; Freitas et al., 2004). Other species isolated in this study CPS (*S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. scheleiferi* subsp. *Coagulans* and *S. lutrae*) are less frequent in occurrence of mastitis and usually are isolated from goats (Vassiliadou, 1991; Kyozaire et al. 2005).

Bacteria of the genus *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Micrococcus* spp. and Enterobacteriaceae are less frequently isolated agents mastitis in goats (Anderson et al., 2004; Bergonier et al., 2003; Contreras et al., 2007; Smith and Sherman, 2009). The present study found a low frequency of these pathogens in microbiological culture of milk samples of mammary gland, supporting the authors cited above.

All 513 samples of milk from half-udders were positive to CMT: score 1 (42.69%), score 2 (29.63%), and score 3 + (27.68%). The CMT positive may not be indicative of infection of the mammary gland, this is by type of apocrine secretion of the mammary gland of the goat that allows the presence of epithelial cells in higher amount compared to bovine milk, which together with leukocytes, leading CMT to react to an interpretation of different test used in cattle (Lewter et al. 1984). A mean of 3% of the cytoplasmic corpuscles contain DNA fragments (Paape and Capuco, 1997), which together with the epithelial cells can increase apparently the leukocyte concentration present in the milk, even in healthy animals. Schalm et al. (1971) interpreted the reaction of goat milk to CMT and relacioned with the number of somatic cells with the intensity of the reaction. The authors found that goats mastitis without may have reactions traits or score 1. Moreover, score 2 and 3 may be indicative of infection of the mammary gland (Smith and Roguinski, 1977; Bergonier et al. 2,003; Mota, 2008; Almeida, 2009; Peixoto et al. 2010).

The CMT score is directly related to automatically and microscopic SCC (Schalm et al., 1971; Rota et al., 1994; Contreras et al., 1996; Silva et al., 1996; Smith and Sherman, 2009), which was observed in this study, and the means of automatically and microscopic SCC increased according to the CMT scores, with the highest mean in the automatically and microscopic SCC in the score 3 + (Table 1).

The sensitivity and specificity of the CMT of half-udders varied between cut-offs 2 and 3 (Table 2). Sensitivity was higher for the score 2 (68.54%) and specificity was higher for the score 3 (73.73%). The ideal would be CMT determining a cutoff point that simultaneously maximizes the sensitivity and specificity of the test, however, both sensitivity and specificity were low. Because the physiological character goat milk, studies show a higher reliability for the CMT for sensitivity starting score 2 (Mota, 2008; Almeida, 2009).

The predictive value positive and negative representing the probability of the presence of a positive or negative result of the disease exists or not, being related with sensitivity and specificity of the test and prevalence of disease. The predictive value positive (41.50%) and predictive value negative (74.43%) were higher in score 2, however, both scores the predictive value negative was higher than the predictive value positive (Table 2). The predictive value positive is the proportion of true positives among all animals tested positive by expressing the probability of an animal with a positive test having the disease. The predictive value negative is the proportion of true

negatives among all animals tested negative, expressing the probability of a negative test animal does not have the disease (Thursfield, 2005).

The higher prevalence of the disease, the greater the positive predictive value and lower the negative predictive value, in other words, the more frequent a disease is more likely to find true positives (increasing the positive predictive value), but also is more likely to find false negative (decreasing the negative predictive value) (Thursfield, 2005).

The CMT test has been used as an important tool for assessing the quality of the milk of the expansion tank, which indirectly reflects the herd SCC (Bergonier et al., 2003; Smith and Sherman, 2009). In this study, 60% of the expansion tanks had score 3, revealing the high cellularity of the milk produced in most farms (Table 6).

The CMT is a validated test for detection of subclinical mastitis in cattle. However, to goats the CMT is not a good diagnostic tool for subclinical mastitis due to its low sensitivity and specificity scores 2 and 3, however, can be used as a screening test for subclinical mastitis must always be associated with the microbiological test (Bergonier et al. 2003; Silva et al. 2001; Peixoto et al. 2010).

Among the 10 farms the prevalence of subclinical mastitis by automatic and microscopic SCC in goat and half-udders were not homogeneous ($P < 0.01$). The statistical difference could be explained by differences in the characteristics of herd management, production and facilities.

Of 257 composite milk samples analyzed, taking as cutoff to define an intramammary infection 1×10^6 cells/mL, there was no statistical difference ($P > 0.05$) between the prevalence of subclinical mastitis in automatic (42%) and microscopic (49.4%) SCC (Table 3), similar results being described by Bergonier et al. (2003) and Fuquay et al. (2011).

The are prevalence of subclinical mastitis by automatic SCC in goat (42%) and half-udders (36.25%) did not differ statistically ($P > 0.05$) (Table 4), however, the microscopic SCC statistically difference ($P < 0.05$) between the prevalence of subclinical mastitis in goats (49.40%) and half-udders (40.20%) (Table 5). In microscopic SCC using staining methyl green-pyronin-Y, which is based only on the count of nucleated cells (Zeng and Escobar, 1996), but few corpuscles cytoplasmic portions by having DNA may have been counted during microscopic examination, thus increasing the prevalence of subclinical mastitis by microscopic SCC.

The automatic SCC bulk tank ranged between 820.000 cells/mL and 5.855.000 cells/mL, and microscopic SCC between 275.146 cells/mL and 1.986.580 cells/mL. TBC varied between 104.000 CFU/mL and 2.410.000 CFU/mL (Table 6). These results reflect the health of livestock and quality of milk produced in the farms studied.

The SCC in milk from cows free intramammary infection is generally less than 200.000 cells/mL (NMC, 1996) and in goats milk, less than 400.000 cells/mL (McDougall et al. 2001). However, the maximum cells that can be found in the milk of goats free intramammary infection is 1×10^6 cells/mL, the amount stipulated by the Ministry of Agriculture of the United States (Zeng, 1996).

Among the pathogens in milk samples of half-udders, *S. aureus* was that showed the highest median in automatic SCC (5.228.000 cells/mL) and microscopic (2.103.698 cells/mL). In accordance De Crémoux et al. (1995) and Baudry et al. (1997) Infection caused by *S. aureus* in the mammary gland of goats produces values greater

than 1×10^6 cells/mL in SCC, one of the most pathogenic species within the genus *Staphylococcus* spp.

The results of microscopic and automatic SCC are influenced by numerous factors, among which are the state of health of the mammary gland of the host and the degree of pathogenicity and virulence of agent (Hall and Rycroft, 2007; Persson and Olofsson, 2011)

Five groups were created with the isolated pathogens in microbiological culture to determine the mean automatic SCC of half-udders by group of pathogens (Table 8). It was observed that the group 5 (*S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* and *S. lutrae*) showed the highest geometric mean automatic SCC 1.604.353.25 cells/mL between groups. This result reinforces the importance of CPS in the etiology of mastitis goat, corroborating studies Mota et al. (2003), Silva et al. (2004) and Langoni et al. (2006).

There statistical difference in mean ($P < 0.05$) between group 4 (CNS and *Micrococcus* spp.) and 3 (Negative), and between the group 5 (*S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. lutrae* and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*) and 3 (Negative). The group 4 (CNS and *Micrococcus* spp.) had geometric mean of 727.612,24 cells/mL, and the mean of this group is second largest, showing the importance of CNS, was not characterized in this study are considered major pathogens in caprine (Mota et al., 2003; Bergonier et al., 2003; Silva et al., 2004; Peixoto et al., 2010; Langoni et al., 2012). Group 3 (negative) had the lowest geometric mean 271.456,34 cells/mL, which demonstrates that goats with negative microbiological culture not have very high values of SCC, disagreeing with maximum limited of 1×10^6 cells/mL to uninfected goats considered by Zeng (1996), and agreeing with the work of McDougall et al. (2001) considers that goats healthy with SCC less than 400.000 cells/mL and Persson and Olofsson (2011) found that in goats with negative microbiological culture showed SCC mean 481.000 cells/mL.

We determined the sensitivity and specificity of microscopic and automatic SCC for different cut-offs: 200.000, 400.000, 600.000, 800.000, 1.000.000, 1.200.000 and 1.400.000 cells/mL. Noting the sensitivity and specificity of the automatic SCC for the different cut-off points (cells/mL), we note that the sensitivity and predictive value positive are inversely proportional to the different cut-offs points and that the specificity and predictive value negative are directly proportional to the different cut-offs points, or is, the higher sensitivity (81.46%) and predictive value positive (80.81%) are found in the lower cut-off (200.000 cells/mL) and higher specificity (77.91%) and predictive value negative (52.87%) are found in higher cut-off (1.400.000 cells/mL) (Table 9). The cut-off of 600.000 cells/mL simultaneously maximizes sensitivity (64.04%) and predictive value positive (76.38%), and specificity (61.79%) and predictive value negative (47.11%) of the test, and the accuracy of this cut-off poor (Graph 1). In microscopic SCC had the same findings of automatic SCC, or is, the highest sensitivity (72.32%) and predictive value positive (78.97%) were found in lower cut-off point (200.000 cells/mL) and higher specificity (89.55%) and predictive value negative (55.70%) were found at higher cut-off point (1.400.000 cells/mL) (Table 10). The cut-off of 400.000 cells/mL simultaneously maximizes sensitivity (58.19%) and predictive value positive (75.74%), and specificity (68.96%) and predictive value negative (49.76%) of the test, and the accuracy of this cut-off too bad (Graph 2).

The cut-off can be changed in automatic and microscopic SCC according to the purpose of the diagnostic test. When seeking the largest number of true positive animals, we have to lower the cut-off, which leads to increasing the number of livestock reduction of false positives and true negatives, and when seek the greatest number of animals true negatives, which will increase the cut-off point, increasing the number of false negative and decreasing the number of true positives.

There was an association of great magnitude between the microscopic and automatic SCC ($R^2=0.95$, $P < 0.0001$) (Graph 3). However, in mean, automatic SCC was 2.1 times greater than the microscopic SCC. According to Zeng (1996), the automatic SCC performed by flow cytometers calibrated for bovine milk overestimate SCC microscopic, fact explained by type of apocrine secretion of the mammary gland of goats and type of staining used in flow cytometers (PAAPE et al. 2001).

The somatic cell count of goat milk in equipment based on flow cytometry (Somacount 300® or Fossomatic 300®) calibrated for bovine milk have problems, because the colorant is not specific to DNA and by type of milk secretion goat. However, direct microscopic count with methyl green-pyronin-Y and which is a DNA specific corant is endorsed as a standard method to evaluate the SCC in the milk of goats, allowing only the staining of nucleated cells (Contreras et al., 1996, Zeng et al., 1997; Gomes et al., 2010).

Constructed a linear prediction equation microscopic SCC using the values of automatic SCC that was $y=0.9632x-0,1134$, that allows to calculate the values of microscopic SCC starting of automatical SCC held in the Somacount 300® calibrated for bovine milk for use in goats.

5. Conclusion

The prevalence of subclinical mastitis (43.6%) and clinical (5.84%) in goats populations were similar to those described in the literature, subclinical mastitis varying between 5 to 30% and the clinical mastitis below 5%, with rates higher second management conditions. CNS were the main pathogens involved in cases of subclinical mastitis. Among the CPS, *S. aureus* was the most frequently isolated with 4.68% in half-udder, which reinforces the importance of this infectious agent in the etiology of mastitis and public health. The CMT is not a good tool for the diagnosis of subclinical mastitis in goats, showed low sensitivity and specificity in scores 2 and 3 for diagnosis, if used for screening should be associated with the microbiological culture. The Somacount 300® calibrated to bovine milk overestimated the microscopic SCC in 2.1 times, explained by the type of milk secretion goats and because the dye (ethidium bromide) used in Somacount 300® is not specific to DNA. Both of which showed no cut-off point for efficient simultaneous maximization of sensitivity and specificity. Suggest its use for monitoring herd health and developing new techniques for the diagnosis of subclinical mastitis.

Acknowledgement

We would like to thank the São Paulo Research Foundation (FAPESP) for PhD grant and financial support, Processes (# 2010/17254-7) and (# 2011/07107-0).

References

- Almeida, J.F. Agentes infecciosos causadores de mastite e parâmetros físico-químicos na qualidade do leite de cabra in natura. 2009. 107p. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói.
- Anderson, D.E., Hull, B.H., Pugh, D.G., 2004. Enfermidades da glândula mamária. In: PUGH, D.G. (Ed). Clínica de ovinos e caprinos. São Paulo: Roca, pp. 379-399.
- Baudry, C., De Crémoux, R., Chartier, C., Perrin, G., 1997. Impact of the cellular concentration of milk in goats on its production and its composition. Vet. Res. 28 (3), 277-286.
- Bergonier, D., De Crémoux, R., Rupp, R., Lagriffoul, G., Berthelot, X., 2003. Mastitis of dairy small ruminants. Vet. Res. 34 (5), 689-716.
- Bianchini, B.I.S.; Da Silva, L.B.G.; Silva, A.P.; Lima, J.C.O.; Falcão, D.P., 2010. Frequência e etiologia da mastite caprina na região do Cariri paraibano. Med. Vet. 4 (1), 1-5.
- Bradley, A. J., 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. Vet. J. 164 (2), 116-128.
- Chaffer, M., Leitner, G., Zamir, S., Winkler, M., 2003. Efficacy of dry-off treatment in sheep. Small Ruminant Res. 47 (1), 11-19.
- Contreras, A., Sierra, D., Corrales, J.C., Sanchez, A., Gonzalo, C., 1998. Diagnostico indirecto de las mamitis caprinas. Mamitis caprina II. 54, 25-36.
- Contreras, A., Sierra, D., Sanchez, A., Marco, J.C., 1996. Physiological threshold of somatic cell count and California Mastitis Test for diagnosis of caprine subclinical mastitis. Small Ruminant Res. 21 (3), 259-264.
- Contreras, A., Sierra, D., Sanchez, A., Corrales, J.C., Marco, J.C., Paape, M.J., Gonzalo, C., 2007. Mastitis in small ruminants. Small Ruminant Res. 68 (1), 145-153.
- Cullor, J.S., Tyler, J.W., Smith, B.P., 1994. Distúrbios da glândula mamária. In: SMITH, B.P. (Ed.) Tratado de Medicina Interna dos Grandes Animais. São Paulo: Manole, v.2, p.1041-1060.
- De Crémoux, R., Poutrel, B., Berny, F., 1995. Use of somatic cell counts for presumptive diagnosis of intramammary infections in goats. The 3rd International Mastitis Seminar, Proceedings II S6:90.
- Domingues, P.F., Langoni, H., 2001. Manejo sanitário animal, 1 ed. Epub, Rio de Janeiro.
- Fagundes, H., Oliveira, C.A.F., 2004. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. Cienc. Rural. 34 (4), 1315-1320.
- Fonseca, L.F.L., Santos, M.V., 2001. Qualidade do leite e controle de mastite, 1 ed. Lemos, São Paulo.
- Freitas, M.F.L., Leal Balbino, T.C., Mota, R.A., Stamford, T.L.M., 2004. Exotoxinas estafilocócicas. Cienc. Vet. Trop. 7 (2), 63-74.
- Fuquay, J.W., Fox, P., McSweeney, P.L.H., 2011. Encyclopedia of Dairy Sciences, 2nd Edition, Four-Volume set, p. 4170.
- Gonzalo, C., Tardaguila, J.A., De La Fuente, L.F., San Primitivo, F., 2004. Effects of selective and complete dry therapy on prevalence of intramammary infection and on milk yield in the subsequent lactation in dairy ewes. J. Dairy Res. 71 (1), 33-38.
- Gomes, V., Amato, A.L., Ponte, G.C.T.G., Blagitz, M., Madureira, K.M., Della Libera, A.M.M.P., 2010. Contagem automática e microscópica direta das células somáticas

- do leite de ovelhas da raça lacaune, utilizando como corantes o Rosenfeld e verde de metil e pironina-y. Cienc. Anim. Bras. 11 (1), 162-167.
- Hall, S.M., Rycroft, A.N., 2007. Causative organisms and somatic cell counts in subclinical intramammary infections in milking goats in the UK. Vet. Record. 160 (1), 19-22.
- Hogan, J. S., White, D.G., Pankey, J.W., 1987. Effects of teat dipping on intramammary infections by staphylococci other than *Staphylococcus aureus*. J. Dairy Sci. 70 (4), 873-879.
- Hortet, P., Seegers, H., 1998. Calculated milk production losses associated with elevated somatic cells counts in dairy cows: review and critical discussion. Vet. Res. 29 (6), 497-510.
- Kyozaire, J.K., Veary, C.M., Petzer, I.M., Donkin, E.F., 2005. Microbiological quality of goat's milk obtained under different production systems. J. S. Afr. Vet. Assoc. 76 (2), 69-73.
- Langoni, H., 2007. Mastite bovina. Conceitos e Fundamentos. In: Encontro de pesquisadores em mastites, 2007, Botucatu. Anais... Botucatu: Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, p. 8-17.
- Langoni, H., Citadella, J.C.C., Machado, G.P., Faccioli, P.Y., Lucheis, S.B., Da Silva, A.V., 2012. Aspectos microbiológicos e citológicos do leite na mastite caprina subclínica. Vet. e Zootec. 19 (1), 815-822.
- Langoni, H., Da Silva, A.V., Cabral, K.G., Domingues, P.F., 1998. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. Rev. Bras. Med. Vet. 20 (5), 204-209.
- Langoni, H., Domingues, P.F., Lucheis, S.B., 2006. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. Rev. Bras. Cienc. Vet. 13 (1), 51-54.
- Lewter, M.M., Mullooney, P.C., Baldwin, E.W., Walker, R.D., 1984. Mastitis in goat. Comp. Cont. Educ. Vet. 6 (7), 417-425.
- Mcdougall, S., Murdough, P., Pankey, W., Delaney, C., Barlow J., Scruton, D., 2001. Relationships among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacterial Status Of Milk In Goats And Sheep In Early Lactation. Small Ruminant Res. 40 (3), 245-254.
- Moroni, P.; Pisoni, G.; Ruffo, G.; Boettcher, P.J., 2005. Risk Factors For Intramammary Infections And Relationship With Somatic-Cell Counts In Italian Dairy Goats. Prev. Vet. Med. 69 (3-4), 163-173.
- Mota, R.A., 2008. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e controle das mastites em caprinos e ovinos. Tec. Cienc. Agropec. 2 (3), 57-61.
- Mota, R.A., De Castro, F.J.C., Da Silva, L.B.G., Oliveira, A.A.F., 2000. Etiologia e sensibilidade a antimicrobianos in vitro das bactérias isoladas do leite de cabras com mastite procedentes da Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. Hora Vet. 19 (114), 26-29.
- Neves, P.B., Medeiros, E.S., Sá, V.V., Camboin, E.K.A., Garino Júnior, F., Mota, R.A., Azevedo, S.S., 2010. Perfil microbiológico, celular e fatores de risco associados à mastite subclínica em cabras no semiárido da Paraíba. Pesq. Vet. Bras. 30 (5), 379-384.
- Oliveira, C.J.B., Hisrich, E.R., Moura, J.F.P., Givisiez, P.E.N., Costa, R.G., Gerbreys, W.A., 2011. On farm risk factors associated with goat milk in Northeast Brazil. Small Ruminant Res. 98 (1-3), 64-69.

- Paape, M.J., Capuco, A.V., 1997. Cellular defense-mechanisms in the udder and lactation of goats. *J. Anim. Sci.* 75 (2), 556-565.
- Paape, M.J., Poutrel, B., Contreras, A., Marco, J.C., Capuco, A.V., 2001. Milk somatic cells and lactation in small ruminants. *J. Dairy Sci. Supplement*, 84, E237-E244.
- Persson, Y., Olofsson, I. 2001. Direct and indirect measurement of somatic cell count as indicator of intramammary infection in dairy goats. *Acta Vet. Scand.* 53 (15), 1-5.
- Peixoto, R., Mota, R.A., Costa, M., 2010. Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 30 (9), 54-762.
- Peixoto, R.M., Amanso, E.S., Cavalcante, M.B., Azevedo, S.S., Pinheiro Junior, J.W., Mota, R.A., Costa, M.M., 2012. Fatores de risco para mastite infecciosa em cabras leiteiras criadas no estado da Bahia. *Arq. Inst. Biológico.* 79 (1), 101-105.
- Philpot, W.N., Nickerson, S.C., 2002. Vencendo a luta contra a mastite. São Paulo: Milkbuzz, p.192.
- Pinheiro, R.R., Gouveia, A.M.G., Alves, F.S.F., Haddad, J.P.A., 2000. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 52 (5), 534-543.
- Poutrel, B., 1984. Udder infection of goats by coagulase-negative staphylococci. *Vet. Microbiol.* 9 (2), 31-137.
- Prescott, S.C., Breed, R.S., 1910. The determination of the number of the body cells in milk by a direct method. *J. Infect. Dis.* 7 (5), 632-640.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B., Carter, G.R., 1994. *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Mosby-year Book Europe Limited. Cap. 36, p. 327-344.
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., Hinchcliff, K.W., 2007. *Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos*. 10 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.1737.
- Ribeiro, M.E.R., Petrini L.A., Aita M.F., Balbinotti M., Stumpf Juniro, W., Gomes, J.F., Schramm, R., Martins, P.R., Barbosa, R.S., 2003. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteira na região sul do Rio Grande do Sul. *Ver. Bras. Agrociência.* 9 (3), 287-290.
- Rota, A.M., Rojas, A., Martin, L., Rodriguez, P., Tovar, J.J., 1994. Uso de la prueba de California para la deteccion de mamitis em el ganado caprino. *Avances Alim. Mej. Anim.* 2 (34), 67-69.
- SAS Institute., 2009. *SAS/STAT User's Guide*. Version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Schalm, O.W., Carrol, E.J., Jain, N.C., 1971. *Bovine mastitis: Physical and chemical tests for detection of mastitis*. Lea and Febiger, Philadelphia, p.128-157.
- Silva, E.R., Araújo, A.M., Alves, F.S.F., Pinheiro, R.R., Saukas, T.N., 2011. Associação entre o California Mastitis Test e a Contagem de Células Somáticas na avaliação da saúde da glândula mamária caprina. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 38 (1), 46-48.
- Silva, E.R., Saukas, T.N., Alves, S.F.A., Pinheiro, R.R., 1996. Contagem de células somáticas e California Mastitis Test no diagnóstico da mastite caprina subclínica. *Ver. Bras. Med. Vet.* 18 (2), 78-83.
- Silva, E.R., Siqueira, A.P., Martins, J.C.D., Ferreira, W.P.B., Silva, N., 2004. Identification and in vitro antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis in the Northeast of Brazil. *Small Ruminant Res.* 55 (1), 45-49.
- Smith, M.C., Roguinsky, M., 1977. Mastitis and other disease of the goat's udder. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 171 (12), 1241-1248.

- Smith, M.C., Sherman, D.M., 2009. Goat medicine. Willey & Blackwell, Ames, Iowa, USA, 2nd, p. 870.
- Thrusfield, M., 2005. Veterinary Epidemiology. 2nd end. Blackwell Science Ltd., London, UK, 479p.
- Vassiliadou, D.K., 1991. Mastitis-related pathogens in goat milk. Small Ruminant Res. 4 (2), 203–212.
- Zeng, S.S., 1996. Comparasion of goat milk standards with cow milk standads for analysis of somatic cell count, fat and protein in goat milk. Small Ruminant Res. 21 (3), 221-225.
- Zeng, S.S., Escobar, E.N., Popham, T., 1997. Daily variations in somatic cell count, composition, and production of Alpine goat milk. Small Ruminant Res. 26 (1), 253-260.

9.2 Artigo redigido de acordo com as normas do periódico científico "Small Ruminant Research"

Standardization of multiplex-PCR for the detection of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli* in mastitic milk goats

G.P. Machado^a, R.C. Da Silva^a, F.F. Guimarães^a, J.C.F. Pantoja^a, H. Langoni^{a*}

^a Department of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine and Science, São Paulo State University, Botucatu Campus, São Paulo State, Brazil.

* Corresponding author. Tel.: +14 30802094; fax: +14 30802042.
E-mail address: hlangoni@fmvz.unesp.br (H. Langoni).

ABSTRACT

This study aimed to analyze milk samples from 257 goats, 513 half-udders, and 10 bulk tanks from 10 dairy goat farms of São Paulo State, Brazil. The microbiological culture (gold-standard) for diagnosing mastitis, and multiplex-PCR with different protocols for detection of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli* in all samples. A total of 178 half-udders were positive by microbiological culture and coagulase-negative staphylococci - CNS (70%), *S. aureus* (13.5%), *Staphylococcus intermedius* (7.9%), and Enterobacteriaceae (4%) were the most prevalent pathogens. The prevalence of pathogens in multiplex-PCR of half-udders were: *S. aureus* (9.7%), *S. agalactiae* (5.5%) and *E. coli* (16.6%) and bulk tanks: *S. aureus* (60%), *S. agalactiae* (10%) and *E. coli* (40%). The multiplex-PCR showed good accuracy for the detection of three bacteria at a time in mastitic goat milk.

Keywords: Goats, mastitis, half-udders, bulk tanks, microbiological culture, multiplex-PCR.

1. Introduction

Mastitis is an inflammation of mammary gland, caused by over 150 different contagious or environmental micro-organisms (Kuang et al., 2009). Although a wide spectrum of bacterial species have been identified as causative agents of mastitis, only a few species of staphylococci, streptococci and coliforms are of economic and epidemiological importance. In many countries, *Staphylococcus aureus* is the most significant pathogen causing intra-mammary infection in dairy animals (Graber et al., 2007; Kuang et al., 2009). In addition, coagulase-negative staphylococci (CNS), a group of *Staphylococcus* spp., have become the predominant pathogens causing subclinical or clinical mastitis in several countries (Pyorala and Taponen, 2009; Schukken et al., 2009).

Streptococcus agalactiae is important pathogen in caprine mastitis, leading to fibrosis and reduced milk production (Bergonier et al., 2003). *Escherichia coli* is one of the main pathogens associated with environmental mastitis leading to a wide range of disease severity from acute to severe systemic disease (Günther et al., 2011). Raw milk and dairy products made from nonpasteurized milk have been responsible for *S.*

aureus, *E. coli* outbreaks and could represent a potential hazard for consumers (Little et al., 2008). Accurate species identification is essential to enable rapid intervention and the use of appropriate treatment for the control of disease. Similarly accurate species identification is also essential for mastitis pathogen research (Ghebremedhin et al., 2008).

As number of pathogens responsible for mastitis is large and many of these are genetically closely related, differentiation of the different species within this large group is difficult (Koskinen et al., 2009). Moreover, identification based on phenotypic differences is unreliable because there is lack of unique biochemical markers for species identification (Capurro et al., 2009). Although DNA sequencebased molecular methods have proved to be proficient approach for species identification, reliable identification methods that are fast and accurate still remain a necessity (Cremonesi et al., 2009; Zadoks and Watts, 2009).

The objective of the study was to develop and evaluate a multiplex-PCR assay for the simultaneous detection of mastitis pathogens. In this study, to achieve simple, rapid, reliable and accurate identification and detection of a number of species, the multiplex-PCR was devised for simultaneous detection of three common mastitis pathogens.

2. Methods

2.1 Sampling

A total of 513 half-udder milking sample (257 goats) and 10 bulk tanks were collected in a single sampling time in each of the 10 flocks during the lactation period. The first few streams of milk were discarded, and duplicate half-udder milk sample were aseptically collected into sterile tubes after cleaning and disinfection of each teat end. One sample (10mL) was used for bacteriological and molecular analysis. The milk sample were stored at +4°C, and bacteriological examinations were carried out within 12 and 24 hours after sampling.

2.2 Bacteriological Analysis and Isolation Procedures

Each half-udder's milk sample was homogenized and 10µL were then inoculated onto 5.0% Sheep Blood Agar (SBA) and MacConkey Agar (MA) plates. The SBA and MA plates were then incubated aerobically at +37°C and examined after 24, 48 and 72 hours. Bacterial strains were isolated on Brain Heart Infusion Agar (BHI, Oxoid, Basingstoke, UK), and identified using routine microbiological procedures such as colony morphology, microscopic characteristics and Gram staining, hemolysis pattern on SBA, catalase and oxidase reactions.

Staphylococcus aureus showed colonies with size between 1-3mm diameter, white to golden yellow, and hemolytic and Gram-positive. After observation of morphological characteristics, the colonies were passaged on brain heart infusion broth, brain heart, and incubated for 24 hours at 37°C and then subjected to biochemical tests, with positive tests (coagulase, catalase and urease), positive production of acetoin, and fermenting glucose, maltose and mannitol (Quinn et al., 2005).

Streptococcus agalactiae showed colonies with size around 0.5mm in diameter, translucent, hemolytic or not, and Gram positive. After observation of morphological characteristics, colonies were passaged on brain heart infusion broth, and incubated

for 24 hours at 37°C and then subjected to biochemical tests, with positive tests (lactose, salicin, trehalose and hippurate sodium) negative evidence inulin, raffinose, sorbitol, and esculin hydrolysis negative growth in 6.5% NaCl, and positive for test CAMP (Quinn et al., 2005).

On 5% SBS colonies of *E. coli* showed colony with size between 1.5-2.5 mm diameter, with or without production of beta-hemolysis. Bacterial strains isolated in MacConkey and lactose-fermenting were subjected to biochemical tests for Enterobacteriaceae using solid culture media and semi-solids, distributed in test tubes, determining the following parameters: gas production (glucose), H₂S, urease, L-TD (L-tryptophan deaminase), motility, indol, lysine and Simmons citrate. Were classified as *E. coli* strains positive in tests of gas (glucose), indol and lysine, motility (variable) and negative for H₂S, urease, L-TD and Simmons citrate (Trabulsi et al., 2005).

2.3 DNA extraction

The milk samples were aliquoted and frozen in microtubes DNase and RNase free at -80°C. The extraction of DNA from milk samples of 10 dairy goats farms were performed using the commercial kit illustra genomicPrep blood Mini Spin Kit (GE Healthcare, USA) according to the manufacturer's instructions with some modifications. Extractions were performed in all samples of milk of half-udders, bulk tanks, and standard strains ATCC.

2.4 Determination of the analytical sensitivity

For the determination of the PCR detection threshold for each analyzed bacteria, each bacterium was inoculated into BHI broth and incubated for 24 hours at 37°C. After this period, 900µL of sterile ultrapure water were aliquoted into sterile microtubes free DNase and RNase, and other microtubes 900µL goat milk long life commercialized in Botucatu, SP. Were diluted 100mL of the suspension of 10⁹ bactérias/mL⁻¹ obtained according to the McFarland scale 4 (1.2 x 10⁹ bacteria/mL⁻¹) in 900µL of ultrapure water to obtain dilution series of 10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹ and 10⁰ bactérias/mL⁻¹. Likewise, the same suspension 10⁸ bactérias/mL⁻¹ was diluted in 900µL goat milk sample, to obtain dilution series of 10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹, and 10⁰ bacteria/mL⁻¹.

2.5 Multiplex-PCR

All samples were subjected to PCR detection of *S. aureus*, *S. agalactiae* and *E. coli* by multiplex PCR using the primers described in Table 1. The primers are targeted to species-specific regions of DNA encoding regions *spi*, 16S rRNA and 23S rRNA, sequences based on the GenBank database. The concentrations of reagents used in the multiplex PCR was used to compare the work of Straub et al. (1999) and Chótar et al. (2006). Each reaction microtube of 0.2mL received 25µL of a solution, consisting of buffer 10x PCR, without magnesium (50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH8, 0), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM solution desoxynucleotidyl, 0, 5U (Straub et al. 1999) Platinum *Taq* DNA polymerase (Life Technologies, USA) 10µM (Straub et al. 1999) or 25µM (Chótar et al. 2,006) of each oligonucleotide (Integrated DNA Technologies, USA) 10ng sample, and ultrapure water q.s.p (GIBCO, USA). All amplifications were tested in thermocycler Mastercycler EP gradient (Eppendorf, USA). Two protocols were tested for amplification: the first described by Chótar et al. (2006) using the primers SAU1 and

SAU2, SIP3 and SIP4 or SAGA1 and SAGA2, Ecoli1 and Ecoli2, consisted of an initial incubation of 5 minutes at 96°C followed by 30 cycles of 1 minute at 96°C, 1 minute at 55°C and 2 minutes 72°C, with a final incubation of 8 minutes at 72°C. The second described by Straub et al. (1999), using the primers STAUR4 and STAUR6, SIP3 and SIP4, Ecoli1 and Ecoli2, consisted of an initial incubation of 5 minutes at 96°C followed by 37 cycles of 1 minute at 96°C, 1 min (gradient annealing: 56°C, 56.2°C, 56.6°C, 57.3°C, 58.2°C, 59.3°C, 60.4°C, 61.5°C, 62.5°C, 63.4°C, 63.8°C, 64°C) and 2 minutes at 72°C with final incubation of 8 minutes at 72°C.

Aliquots of 8µL of the amplified samples were mixed with 2µL solution of bromophenol blue and subjected to horizontal electrophoresis in 1.5% agarose gel containing 0.3 ethidium bromide µL/mL⁻¹ diluted in tris-borate-EDTA (TBE) 1x. The race was held at 100 voltz for 40 minutes. After the race, the amplification product was visualized and photographed in digital photo documentation system, Gel-Doc System it (UVP, USA) software VisionWorks LS under ultraviolet light and in particular computer.

TABLE 1. Primers used for amplification of DNA of *S. aureus*, *S. agalactiae* and *E. coli* goat milk samples by multiplex-PCR.

Agent	Target	Primers ¹	Primers ²	Sequence of oligonucleotide (5'-3')	Produto (pb)	Reference
<i>Staphylococcus aureus</i>	23S rRNA	Sau 327	SAU1	GGACGACATTAGACGAATCA	1300	Riffon et al. (2001)
		Sau 1645	SAU2	CGGGCACCTATTTTCTATCT		Chótar et al. (2006)
	23S rRNA	STAUR4	-	ACGGAGTTACAAAGGACGAC	1250	Straub et al. (1999)
		STAUR6	-	AGCTCAGCCTTAACGAGTAC		
<i>Streptococcus agalactiae</i>	16S rRNA	Sag 432	SAGA1	CGTTGGTAGGAGTGGAAAAT	590	Riffon et al. (2001)
		Sag 1018	SAGA2	CTGCTCCGAAGAGAAAGCCT		Chótar et al. (2006)
	sip*	SIP3	SIP3	TGAAAATGCAGGGCTCCAACCTCA	293	Chótar et al. (2006)
		SIP4	SIP4	GATCTGGCATTGCATTCCAAGTAT		
<i>Escherichia coli</i>	23S rRNA	Eco 2083	Ecoli1	GCTTGACACTGAACATTGAG	660	Riffon et al. (2001)
		Eco 2745	Ecoli2	GCACTTATCTCTTCCGCATT		Chótar et al. (2006)

* sip: surface immunogenic protein (protein immunogenic surface), designated as Sequence Specific Sip (SSS) - only for GBS (Lancefield Group B *Streptococcus*); ¹Names of primers of according with original reference; ²Names of primers for multiplex PCR of according Chótar et al. (2006).

3. Results

3.1 Microbiological Culture

From 178 positive half-udders, the frequency of isolated pathogens were: CNS (n=123; 70%), *S. aureus* (n=24; 13.5%), *S. intermedius* (n=14; 8.0%), Enterobacteriaceae (n=7; 4%), *Corynebacterium* spp. (n=3; 1.7%), *S. hyicus* (n=3; 1.7%), *Streptococcus* spp. (n=1; 0.6%), *Micrococcus* spp. (n=1; 0.6%), *S. schleiferi* subsp. *coagulans* (n=1; 0.6%) e *S. lutrae* (n=1; 0.6%).

Among the 513 half-udders evaluated the pathogens most frequently isolated are CNS (n=132; 24%), *S. aureus* (n=24; 4.7%), *S. intermedius* (n=14; 2.73%), Enterobacteriaceae (n=7; 1.4%), *Corynebacterium* spp. (n=3; 0.6%) and *S. hyicus* (n=3; 0.6%).

The frequency of CNS in dairy goat farms ranged between 2.5%-50%, *S. intermedius* between 1.4%-13.1%, *S. aureus* between 1.3%-12.9%, Enterobacteriaceae between 1.6%-5%, *Corynebacterium* spp. between 2.2%-2.5% and *S. hyicus* between 2.5%-3.4%.

3.2 Multiplex-PCR

Specific PCR was performed for each agents using the protocol and primers described by Chótar et al. (2006), which uses an annealing temperature of 55°C. When examining the efficiency of the primer in the detection of the agent in water samples and goat milk samples contaminated, was observed that the primers SAU1 SAU2, and SAGA1 SAGA2 and Ecol1 and Ecol2 detected until 10^0 bacteria/mL⁻¹ in water, but when analyzing milk samples contaminated, the same primers detected a minimum of 10^2 bacteria *S. aureus*/mL⁻¹, 10^4 bacteria *S. agalactiae*/mL⁻¹, and 10^0 bacteria *E. coli*/mL⁻¹. The low analytical sensitivity observed for *S. aureus* and *S. agalactiae* may be suggested by the low frequency of copies of regions flanked by primers SAU1 and SAU2, and SAGA1 and SAGA2, used in the work described Chótar et al. (2006).

Based on the above results, we tested the primers and STAUR4 and STAUR6, described by Straub et al. (1999) for detection of *S. aureus*, and SIP3 and SIP4 described by Chótar et al. (2006) for detection of *S. agalactiae*. Chótar et al. (2006) standardized multiplex PCR protocol used previously, and attempt to reuse the same protocol modifying primers specific for *S. aureus* and *S. agalactiae*, we tested the temperature gradient annealing, since the annealing temperature used by Straub et al. (1999) for STAUR6 and STAUR4 was 64°C, considered very high in relation to the temperature used for Chótar et al. (2006), with 55°C. It was observed that separately by testing concentrations of 10^6 bacterias/mL⁻¹, the same amplification standard was obtained in all temperatures tested.

However, when analyzing the temperature gradient with all three pairs of primers together (STAUR4 and STAUR6, SIP3 and SIP4, and Ecol1 and Ecol2) and the three agents present at concentration of 10^7 bacterias/mL⁻¹, it was observed that the annealing temperature with better results in simultaneous detection of three agents was 64°C, as described by Straub et al. (1999) for detecting by STAUR4 and STAUR6.

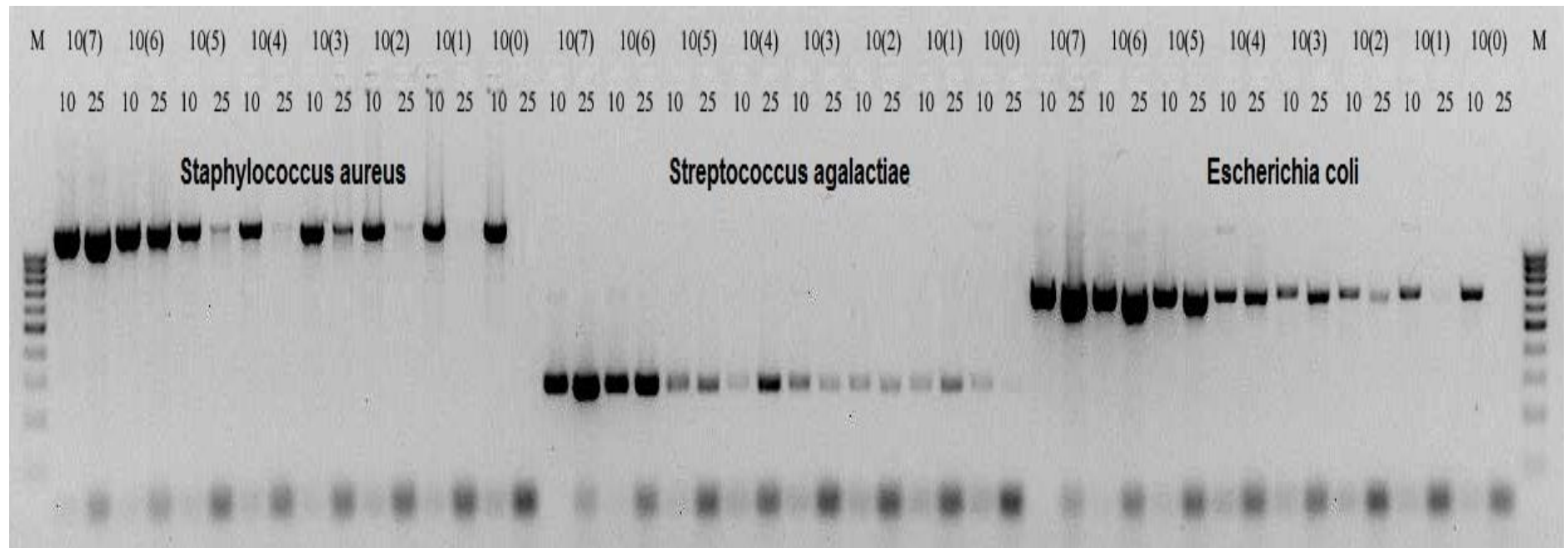


FIGURE 7. Detection threshold (10^7 to 10^0) separately using primers STAUR4 and STAUR6, SIP3 and SIP4, and Ecol1 and Ecol2 in different concentrations: 10μM, according with Straub et al. (1999); 25μM according Chótar et al. (2006) in goat milk sample, using the PCR protocol described by Straub et al. (1999). M: molecular weight standard (100 base pairs).

Using primers STAUR4 and STAUR6, SIP3 and SIP4, and Ecol1 and Ecol2 and comparing the concentrations of primers, was observed that the use of primers in lower concentrations (10 μ M), as shown by Straub et al. (1999) showed better results (Figures 1 and 8), obtaining analytical sensitivity in detecting *S. aureus* 10⁰ (10 μ M) and 10² (25 μ M) bacterias/mL⁻¹ goat milk samples. For the detection of *S. agalactiae*, sensitivity of until 10⁰ (10 μ M) and 10¹ (25 μ M) bacterias/mL⁻¹ in milk samples was obtained, while for *E. coli* 10⁰ (10 μ m) and 10² (25 μ M) bacterias/mL⁻¹. Another advantage observed for the detection of *S. agalactiae* was compared to the size of the bands observed on amplification with primers SAGA1 and SAGA2. These primers amplify a region of 660pb, next size and can cause difficulties in the analysis of agarose gel amplicon with the primers Ecol1 and Ecol2 of 590pb. As the primers SIP3 and SIP4 produce an amplicon 293pb, this difficulty in the analysis of agarose gel starts to be avoided (Figure 2).

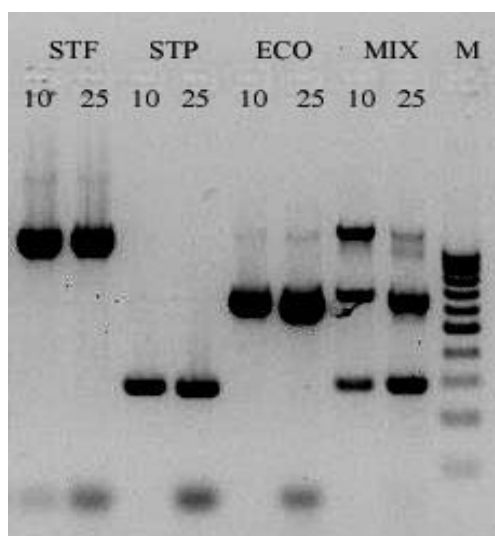


FIGURE 2. Multiplex-PCR with primers STAUR4 and STAUR6, SIP3 and SIP4, and Ecol1 and Ecol2 isolated and together, using various concentrations of primers: 10 μ M, according with Straub et al. (1999), 25 μ M according Chótar et al. (2006), in sample of goat milk. M: molecular weight standard (100 base pairs).

Likewise as seen in Figure1, concentrations of 10 μ M showed better results in comparison with primers with a higher concentration, of 25 μ M (Figure 8).

The prevalence of pathogens detected by multiplex-PCR in half-udders were: *S. aureus* 9.7% (50/513), *S. agalactiae* 5.5% (28/513), and *E. coli* 16.6% (85/513). Prevalence for *S. aureus* varied between 0% and 24.29%, *S. agalactiae* between 2.27% and 17.39%, and *E. coli* between 0% and 30.15% (Table 2).

By multiplex-PCR was possible diagnosing on milk samples of half-udders, 50 samples positive for *S. aureus*, 28 positive for *S. agalactiae* and 85 positive for *E. coli*, while as microbiological culture was possible diagnosing 24 samples positive for *S. aureus*, one positive for *Streptococcus* spp. seven positive for Enterobacteriaceae (Table 2).

Of the 24 positive samples according with microbiological culture, all were correctly diagnosed as positive by multiplex-PCR (sensitivity: 100%). Of the total of 463 samples negative in microbiological culture, 489 were positive in multiplex-PCR (specificity: 94.68%).

TABLE 2. Distribution of *S. aureus*, *Streptococcus* spp. and Enterobacteriaceae isolates in microbiological culture of half-udders and prevalence by multiplex-PCR of *S. aureus*, *S. agalactiae* and *E. coli* in half-udders of 10 dairy goat farms.

Farms	Microbiological Culture						Multiplex-PCR					
	<i>S. aureus</i>		<i>Streptococcus</i> spp.		Enterobacteriaceae		<i>S. aureus</i>		<i>S. agalactiae</i>		<i>E. coli</i>	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
1	7	11.5	0	0	1	1.6	9	14.75	2	3.23	19	30.15
2	9	12.9	0	0	0	0	17	24.29	7	10.00	10	14.29
3	1	2.3	0	0	1	2.3	2	4.55	1	2.27	13	29.55
4	2	4.0	0	0	1	2.0	2	4.00	1	2.00	0	0
5	1	2.2	0	0	0	0	3	6.52	1	2.17	7	15.22
6	1	1.3	0	0	2	2.6	6	7.89	2	2.63	19	25.00
7	3	7.5	0	0	0	0	5	12.50	4	10.00	5	12.50
8	0	0	1	2.2	0	0	4	8.70	8	17.39	2	4.35
9	0	0	0	0	0	0	2	5.00	1	2.50	2	5.00
10	0	0	0	0	2	5.0	0	0	1	2.50	8	20.00
Total	24	4.7	1	0.2	7	1.4	50	9.7	28	5.5	85	16.6

The prevalence of *S. aureus* in bulk tanks was 60% (6/10), *S. agalactiae* 10% (1/10) and *E. coli* 40% (4/10). Of the 10 dairy goat farms that had the half-udders evaluated by microbiological culture, seven were isolated *S. aureus*, five were isolated Enterobacteriaceae and in one was isolated *Streptococcus* spp., being correctly diagnosing by multiplex-PCR six bulk tanks with *S. aureus*, one with *S. agalactiae* and four with *E. coli*.

4. Discussion

A technique that has been used in an increasing order for bacterial identification is the multiplex-PCR, which uses more than one pair of primers in the same reaction, amplifying simultaneously various DNA sequences. This technique allows the identification of more than one bacterial species in the same PCR, promoting a more rapid and wide of pathogenic bacteria in food (Wilson et al., 1991). Thus, the objective was to research directly in the milk of 513 half-udders and 10 bulk tanks pathogens: *S. aureus*, *S. agalactiae* and *E. coli*.

Specific PCR was performed for each of the agents using the protocol and primers described by Chótar et al. (2006). By low analytical sensitivity observed for *S. aureus* and *S. agalactiae*, which may be suggested by low frequency copies of regions flanked by the primers SAU1 and SAU2, and SAGA1 and SAGA2, and was tested primers STAUR6 and STAUR4 described by Straub et al. (1999) for detection of *S. aureus*, and SIP3 and SIP4 described by Chótar et al. (2006) for detection of *S. agalactiae*.

Chótar et al. (2006) standardized multiplex-PCR protocol used previously, and attempt to reuse the same protocol modifying primers specific for *S. aureus* and *S. agalactiae*, we tested the temperature gradient annealing, since the annealing temperature used by Straub et al. (1999) for STAUR6 and STAUR4 to 64°C, was considered very high in relation to the temperature used for Chótar et al. (2006), 55°C, however, the temperature described by Straub et al. (1999) was the best result presented in the simultaneous detection of three agents.

Utilizing primers STAUR4 and STAUR6, SIP3 and SIP4, and Ecol1 and Ecol2, and comparing the concentrations of primers, was observed that the use of primers in lower concentrations (10µM), as shown by Straub et al. (1999) showed better results (Figures 1 and 2), obtaining analytical sensitivity in detecting *S. aureus* 10⁰ (10µM) and 10² (25µM) bacterias/mL⁻¹ goat milk samples. For the detection of *S. agalactiae*, sensitivity to 10⁰ (10µM) and 10¹ (25µM) bacterias/mL⁻¹ was obtained in samples of milk, while for *E. coli* 10⁰ (10µM) and 10² (25µM) bacterias/mL⁻¹.

The primers SIP3 and SIP4 produce an amplicon 293pb, different of the 660pb produced by SAGA1 and SAGA2, and 590pb produced by Ecol1 and Ecol2, no problem in the agarose gel analysis (Figure 1).

The prevalence of agents in half-udders were: *E. coli* (16.6%), *S. aureus* (9.7%) and *S. agalactiae* (5.5%) and in bulk tanks: *S. aureus* (60%), *E. coli* (40%) and *S. agalactiae* (10%). Of the 24 positive samples according to the microbiological culture, all were correctly diagnosed as positive by multiplex-PCR (sensitivity: 100%).

Of the 10 dairy goat farms that had the half-udders evaluated by microbiological culture, seven were isolated *S. aureus*, five were Enterobacteriaceae family and in only one was isolated *Streptococcus* spp., being correctly diagnosed by multiplex-PCR six bulk tanks with *S. aureus*, one with *S. agalactiae* and four *E. coli*. This

shows the high sensitivity of the technique for the diagnosis of these pathogens and their applicability to monitoring the health of livestock and quality of milk bulk tanks.

The bulk tank of farm 2 was positive for the three agents in the multiplex PCR, however, the bulk tanks of the farms 1, 3 and 5 were negative for all three bacteria. The absence of positive results for *S. aureus*, *S. agalactiae* and *E. coli* by multiplex-PCR technique reinforces the point that the sensitivity and specificity of molecular methods for the detection of bacterial pathogens in milk samples are closely related to both the characteristics of microorganisms, such as complexity of the cell wall, which may hinder lysis during the extraction of DNA, as well as the types of primers used (Cremonesi et al., 2006).

For the microbiological analysis of half-udders were diagnosed 24 samples positive for *S. aureus*, while the multiplex-PCR in 50 samples were positive with a high sensitivity of multiplex PCR agent for the diagnosis of *S. aureus* in goat milk. *S. aureus* is the most pathogenic infectious agent to the mammary gland of goats, both subclinical and clinical disease, its importance is evident in public health by the production of toxins, serving as an indicator of sanitary-hygiene in the food industry (Murray et al. , 1992; Anderson et al. 2004).

Streptococcus spp. was diagnosed only by microbiological culture in a milk sample of half-udders, however, the multiplex PCR was able to diagnose 28 samples of milk from half-udders positive for *S. agalactiae*. Sporadically, *S. agalactiae* causes mastitis in goats. The infection with this pathogen may result in fibrosis and decrease in milk production (Bergonier et al. 2003; Anderson et al. 2004).

In microbiological culture were diagnosed seven milk samples of half-udders positive for Enterobacteriaceae. In multiplex PCR were diagnosed 85 milk samples of half-udders positive for *E. coli*. This bacterium is found in organic matter (faeces and soil), water, earth, air and animal bedding, and hardly will not be present in the milk of animals after milking (Smith and Sherman, 2009; Fuquay et al., 2011) . The prevalence of infection with *E. coli* in goats is low, occurring mainly in the periods between milking, representing public health risk (Radostitis et al., 2007; Fuquay et al., 2011).

The multiplex-PCR technique standardized in this study showed good accuracy for the detection of *S. aureus*, *S. agalactiae* and *E. coli*. The use in conjunction with microbiological culture techniques, allows maximizing the sensitivity and specificity of technique, increasing the efficiency of diagnosis of mastitis goats.

5. Conclusion

The multiplex-PCR standardized in this study showed good accuracy for the detection of *S. aureus*, *S. agalactiae* and *E. coli* in goat milk of mastitic mammary gland and bulk tanks. As correct species identification is important for mastitis treatment, prevention, control and in epidemiological investigations, as well as in understanding of the significance of infections caused by different bacterial species, this assay would prove to be an adequate tool for the identification of the most common mastitis pathogens, independent of their phenotypic characteristics for diagnosis of clinical mastitis as well as continuous monitoring of herd health. In conclusion, the developed multiplex-PCR assay can be used for rapid, sensitive, specific and reliable identification of the major mastitis pathogens from milk and may be used in which quality programs.

Acknowledgment

We would like to thank the São Paulo Research Foundation (FAPESP) for PhD grant and financial support, Processes (# 2010/17254-7) and (# 2011/07107-0).

References

- Anderson, D.E., Hull, B.H., Pugh, D.G., 2004. Enfermidades da glândula mamária. In: PUGH, D.G. (Ed). Clínica de ovinos e caprinos. São Paulo: Roca, pp. 379-399.
- Bergonier, D., De Crémoux, R., Rupp, R., Lagriffoul, G., Berthelot, X., 2003. Mastitis of dairy small ruminants. Vet. Res. 34 (5), 689-716.
- Chotár, M., Vidová, B., Godány, A., 2006. Development of specific and rapid detection of bacterial pathogens in dairy products by PCR. Folia Microbiol. 51 (6), 639-646.
- Cremonesi, P., Castiglioni, B., Malferrari, G., Biunno, I., Vimercati, C., Moroni, P., Morandi, S. and Luzzana, M., 2006. Technical note: improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk. J. Dairy Sci. 89 (1), 163-169.
- Capurro, A., Artursson, K., Waller, K.P., Bengtsson, B., Unnerstad, E.H. and Aspan, A., 2009. Comparison of a commercialized phenotyping system, antimicrobial susceptibility testing, and tuf gene sequence-based genotyping for species-level identification of coagulase-negative staphylococci isolated from cases of bovine mastitis. Vet. Microbiol. 134 (3-4), 327-333.
- Cremonesi, P., Pisoni, G., Severgnini, M., Consolandi, C., Moroni, P., Raschetti, M., Castiglioni, B., 2009. Pathogen detection in milk samples by ligation detection reaction- mediated universal array method. J. Dairy Sci. 92 (7), 3027-3039.
- Fuquay, J.W., Fox, P., McSweeney, P.L.H., 2011. Encyclopedia of Dairy Sciences, 2nd Edition, Four-Volume set, p. 4170.
- Ghebremedhin, B., Layer, F., König, W., König, B., 2008. Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial gap, 16S rRNA, hsp60, rpoB, sodA and tuf gene sequences. J. Clin. Microbiol. 46 (3), 1019-1025.
- Graber, H.U., Casey, M.G., Naskova, J., Steiner, A., Schaeren, W., 2007. Development of highly sensitive and specific assay to detect *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis milk. J. Dairy Sci. 90 (10), 4661-4669.
- Günther, J., Esch, K., Poschadel, N., Petzl, W., Zerbe, H., Mitterhuemer, S., Blum, H., Seyfert, H.M., 2011. Comparative kinetics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* specific activation of key immune pathways in mammary epithelial cells demonstrates that *S. aureus* elicits a delayed response dominated by interleukin-6 (IL-6) but not by IL-1A or tumor necrosis factor alpha. Infect. Immun. 79 (2), 695-707.
- Koskinen, M.T., Holopainen, J., Pyorala, S., Bredbacka, P., Pitkala, A., Barkema, H.W., Bexiga, R., Roberson, J., et al., 2009. Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. J. Dairy Sci. 92 (3), 952-959.
- Kuang, Y., Tani, K., Synnott, A.J., Ohshima, K., Higuchi, H., Nagahata, H., Tanji, Y., 2009. Characterization of bacterial population of raw milk from bovine mastitis by culture-independent PCR-DGGE method. J. Biochem. Engg. 45 (1), 76-81.
- Little, C.L., Rhoades, J.R., Sagoo, S.K., Harris, J., Greenwood, M., Mithani, V., Grant, K., McLauchlin, J., 2008. Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. Food Microbiol. 25 (2), 304-312.

- Murray, P.R., Drew, W.L., Kobayashi, G., 1992. Microbiologia Médica. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp. 513.
- Pyorala, S., Taponen, S., 2009. Coagulase-negative staphylococci – emerging mastitis pathogens. Vet. Microbiol. 134 (1-2), 3–8.
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., Hinchcliff, K.W., 2007. Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 10 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.1737.
- Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M., Lagacé, J., 2001. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. J. Clin. Microbiol. 39 (7), 2584-2589.
- Schukken, Y.H., Gonzalez, R.N., Tikofsky, L.L., Schulte, H.F., Santisteban, C.G., Welcome, F.L., Bennett, G.J., Zurakowski, M.J. et al., 2009. CNS mastitis: nothing to worry about? Vet. Microbiol. 134 (1-2), 9–14.
- Straub, J.A., Hertel, C., Hammes, W.P. A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. Journal of Food Protection, v.62, p.1150-1156, 1999.
- Wilson, I.G., Cooper, J.E., Gilmor, A., 1991. Detection of enterotoxigenic of *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: use of polymerase chain reaction for amplification and detection of staphylococcal enterotoxin genes entB and entC1 and the thermonuclease gene nuc. Appl. Environ. Microbiol. 57 (6), 1793-1798.
- Zadoks, R.N., Watts, J.L., 2009. Species identification of coagulase-negative staphylococci: genotyping is superior to phenotyping. Vet. Microbiol. 134 (1-2), 20–28.

9.3 Artigo redigido de acordo com as normas do periódico científico "Pesquisa Veterinária Brasileira"

Fatores de risco para mastite subclínica em cabras leiteiras¹

Gustavo P. Machado², Felipe F. Guimarães², Benedito Donizete Menozzi², Anelise Salina², José C. F. Pantoja², Helio Langoni^{2*}

ABSTRACT: Machado G.P., Guimarães F.F., Da Silva R.C., Salina A., Pantoja, J.C.F., Langoni H. [**Risk factors for subclinical mastitis in dairy goats**] Fatores de risco para mastite subclínica em cabras leiteiras. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18.618-970, Brazil. E-mail: hlangoni@fmvz.unesp.br

The present study was aimed to identify the risk factors associated to subclinical mastitis in goats. Were analyzed by microbiological culture milk samples from 257 goats and 513 half-udders of 10 dairy goat farms, to evaluate the sanitary management an epidemiological questionnaire was used. The analyzes of risk factors were performed by univariate analysis of risk factors for subclinical mastitis in goats populations and by ratio of chances (*Odds Ratio*) adjusted for subclinical mastitis for farm. The prevalence of subclinical mastitis in goats by microbiological culture was 43.6% and clinical mastitis 5.84%. Of 178 half-udders positive by microbiological culture, the most prevalent pathogens were: coagulase-negative staphylococci - CNS (70%), *S. aureus* (13.5%), *S. intermedius* (7.9%), and Enterobacteriaceae (4%). There were some significant differences in univariate analysis of risk factors for subclinical mastitis, however, when the analysis was adjusted for farm, the associations disappeared because the farms are a confounding factor for data analysis.

INDEX TERMS: Goat mastitis, epidemiology, risk factors.

RESUMO.- Objetivou-se neste estudo identificar os fatores de risco associados à presença de mastite subclínica em cabras. Foram analisadas pelo cultivo microbiano amostras de leite de 257 cabras e 513 metades mamárias de 10 propriedades de cabras leiteiras, além da aplicação de um questionário epidemiológico. As análises dos fatores de risco foram efetuadas pela análise univariada dos fatores de risco para mastite subclínica nas populações de cabras e pela razão de chances (*Odds Ratio*) para mastite subclínica ajustadas por propriedade. A prevalência de mastite subclínica em nível de cabra pelo cultivo microbiano foi de 43,6% e de mastite clínica 5,84%. Das 178 metades mamárias positivas no cultivo microbiano, os patógenos mais prevalentes foram: estafilococos coagulase-negativo - ECN (70%), *S. aureus* (13,5%), *S. intermedius* (7,9%) e Enterobacteriaceae (4%). Houve algumas diferenças estatísticas significantes nas análises univariadas dos fatores de risco para mastite subclínica, no entanto, quando a análise foi ajustada por propriedade, as associações na sua grande maioria desapareceram pelo fato das propriedades serem um fator de confusão para análise dos dados.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Mastite caprina, epidemiologia, fatores de risco.

¹Recebido em

²Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Distrito de Rubião Júnior s/n, Botucatu, SP 18.618-970, Brazil. *Autor para correspondência: hlangoni@fmvz.unesp.br

INTRODUÇÃO

A mastite caprina é uma enfermidade complexa, que gera graves prejuízos econômicos devido ao descarte do leite, custos com medicamentos e assistência veterinária, aumento da mão de obra, redução da qualidade e quantidade do leite e seus subprodutos (Dulin et al. 1983, Stehling et al. 1986, Barros & Leitão, 1992), além de ser importante problema de saúde pública (Mota et al. 2000).

A mastite pode ser classificada como clínica ou subclínica. Os animais com mastite clínica podem apresentar edema, aumento da temperatura, endurecimento e dor na glândula mamária, além da presença de grumos, pus ou outras alterações nas características físicas do leite. O

diagnóstico é realizado pela prova de Tamis, com a visualização de alterações macroscópicas do leite (Fonseca & Santos 2001, Ribeiro et al. 2003). Na forma subclínica não ocorrem alterações macroscópicas e sim alterações na composição do leite, não evidenciando sinais de inflamação nas metades mamárias. A mastite subclínica apresenta resultado positivo ao CMT ou outros testes indicativos, confirmando-se pelo crescimento microbiano. Ela pode ser detectada pela contagem direta ou indireta de células somáticas no leite (Cullor et al. 1994, Ribeiro et al. 2003).

Embora em pequenos ruminantes a mastite clínica seja responsável por perdas expressivas, à mastite subclínica apresenta maior ocorrência, gerando elevados prejuízos na produção láctea. Estima-se que as perdas na produção de leite de cabras portadoras de mastite subclínica possam variar de 55 a 132 kg de leite/ano e uma redução de 3g de gordura/kg de leite por animal (Baudry et al. 1997).

Estudos epidemiológicos prévios sobre fatores de risco identificaram características relacionadas ao animal, ao ambiente, aos procedimentos de manejo e ao equipamento de ordenha, associadas à mastite caprina (Neves et al. 2010, Peixoto et al. 2012). Em programas de controle e prevenção de mastite, deve-se levar em consideração não apenas os fatores de risco relacionados às características de animal, de ambiente, de manejo e de equipamento de ordenha, mas também o suporte laboratorial (Bergonier et al. 2003). A importância do diagnóstico microbiológico é discutida por Langoni et al. (2006), pois fornece o padrão de infecção do rebanho, o que auxiliaria no controle e na erradicação de determinados patógenos.

Os agentes etiológicos identificados na sua maioria, são semelhantes aos encontrados na mastite bovina, como estafilococos coagulase-positivos (ECP), estafilococos coagulase-negativos (ECN), *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Corynebacterium* spp., *Pseudomonas* sp. e algumas espécies de fungos menos frequentes (Langoni et al. 1998, Contreras et al. 2007, Langoni et al. 2012).

A prevenção e o controle são pontos de partida para adoção de medidas sanitárias dentro da propriedade. Essas medidas aplicadas simultaneamente devem reduzir as taxas de infecções subclínicas e clínicas no rebanho, estando relacionadas aos aspectos higiênicos dos animais, da ordenha e das pessoas envolvidas na ordenha. A higiene da ordenha é a chave para o êxito de um programa de controle de mastite (Langoni 2007).

A detecção precoce dos animais com mastite, o tratamento dos casos clínicos, a ordenha iniciando a partir dos animais sadios colocando para o final aqueles que estejam em tratamento, a higiene e desinfecção durante todo processo de ordenha, com a utilização de pré e pós-dipping, a manutenção em níveis adequados dos parâmetros de vácuo e pulso das ordenhadeiras e o tratamento a secagem são as medidas mais importantes para a prevenção e controle das mastites (Domingues & Langoni 2001).

Tendo em vista a importância da caprinocultura, as perdas econômicas ocasionadas pela mastite subclínica e a escassez de informações sobre essa doença em caprinos, objetivou-se nesse trabalho identificar os principais fatores de risco associados à presença de mastite subclínica em cabras leiteiras.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram colhidas amostras de leite de 257 cabras, perfazendo um total de 513 metades mamárias examinadas em 10 propriedades leiteiras localizadas em sete diferentes municípios do estado de São Paulo, Brasil.

Para a colheita das amostras de leite, os tetos das cabras em lactação foram lavados previamente com água e secados com toalha de papel descartável. Após o descarte dos três primeiros jatos, foi realizada antissepsia do óstio do teto com algodão umedecido em solução de álcool 70%, e amostras de 10mL foram colhidas em frascos de vidro esterilizados e identificados em duplicata e encaminhadas ao laboratório em caixa isotérmica contendo gelo reciclável.

Todas as amostras de leite foram semeadas em duplicata nos meios de ágar sangue ovino 5% e ágar MacConkey, mantidas a 37°C em aerobiose, por 72 horas com leitura a cada 24 horas. As linhagens de micro-organismos de origem bacteriana foram identificadas segundo as características de cultivo, morfo-tintoriais e bioquímicas (Quinn et al. 1994), independente do gênero bacteriano isolado.

Foi aplicado um questionário epidemiológico em cada uma das propriedades, sendo entrevistado o proprietário ou responsável pelos animais. Foram avaliadas as condições gerais de manejo dos animais e higiene de ordenha, considerando os seguintes itens: produção leiteira (média diária), tipos de equipamentos de ordenha e de armazenamento do leite, manejo de ordenha, hábitos de higiene dos ordenhadores, medidas de diagnóstico e prevenção de mastite,

prevalência de mastite clínica e/ou subclínica, rotina de tratamentos rotineiramente utilizados nos animais com mastite, além da idade dos animais e número de lactações.

Estatísticas descritivas PROC FREQ e PROC MEANS (SAS Institute 2009) foram produzidas para caracterizar a população do estudo, descrever os agentes etiológicos causadores de mastite e estimar as prevalências de mastite subclínica e clínica. O teste de Qui-quadrado ou de Fisher PROC FREQ (SAS Institute, 2009) foi usado para testar a hipótese de que a prevalência de mastite foi heterogênea entre as fazendas.

Associações entre possíveis fatores de risco e a presença de mastite subclínica em nível de animal foram testadas por meio do teste de Qui-quadrado. Como “propriedade” foi o principal fator de confusão na estimativa dessas associações, modelos de regressão logística PROC GENMOD (SAS Institute 2009) foram usados para produzir associações (estimadas usando a razão das chances) ajustadas por propriedade. Significância estatística foi definida como $P < 0.05$.

RESULTADOS

Os tamanhos das 10 propriedades rurais foram heterogêneos, variando entre 17 e 150 hectares, sendo a caprinocultura de leite a atividade principal de todas.

O número total de cabras em lactação nas propriedades variou entre 20 a 160 animais. A idade variou entre 2 e 6,5 anos, sendo 77,43% (199/257) Saanen e 22,57% (58/257) Anglo-Nubiana.

Todas as propriedades ordenhavam os animais duas vezes ao dia. A produção diária de leite dos rebanhos variou entre 30 e 120 litros e a produção leiteira média do rebanho variou entre 0,75 e 2,94 litros. Com relação à fase de lactação, 31,52% (81/257) das cabras estavam na fase inicial, 59,92% (154/257) intermediária e 8,56% (22/257) final (Tabela 6).

Foram examinadas pelos testes de triagem (prova de Tamis e CMT), 257 cabras em lactação, perfazendo um total de 514 metades mamárias avaliadas, sendo apenas uma metade mamária perdida. Foram realizados exames microbianos em 513 amostras de leite das metades mamárias.

Nenhuma amostra apresentou-se negativa ao CMT ou contaminada, sendo que 34,7% (178/513) apresentaram crescimento bacteriano e 65,3% (335/513) foram negativas.

A prevalência de mastite subclínica na população de cabras pela lactocultura foi de 43,6% (112/257) e de mastite clínica 5,84% (15/257). Nas metades mamárias a prevalência de mastite subclínica na lactocultura foi de 34,7% (178/513) e de mastite clínica 2,92% (15/513). Na mastite subclínica tem-se em média 1,6 (178/112) metades mamárias infectadas por cabra.

As prevalências de mastites subclínicas e clínicas em nível de cabras e metades mamárias não foram homogêneas entre as propriedades ($P < 0,01$), variando as prevalências de mastites subclínicas na população de cabras entre 23,68% e 68% e nas metades mamárias entre 14,5% e 58,6%. As prevalências de mastites clínicas na população de cabras variaram entre 4% e 34,28% e nas metades mamárias entre 2% e 17,14%.

Dentre as 513 metades mamárias avaliadas os patógenos mais isolados foram: 132 (24%) ECN, 24 (4,7%) *S. aureus*, 14 (2,73%) *S. intermedius*, 7 (1,4%) Enterobacteriaceae, 3 (0,6%) *Corynebacterium* spp., 3 (0,6%) *S. hyicus*, 1 (0,2%) *Streptococcus* spp., 1 (0,2%) *Micrococcus* spp., 1 (0,2%) *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e 1 (0,2%) *S. lutrae*.

Das 178 metades mamárias positivas, os patógenos isolados foram: 123 (70%) ECN, 24 (13,5%) *S. aureus*, 14 (7,9%) *S. intermedius* e 7 (4%) Enterobacteriaceae,

Nas propriedades a frequência dos ECN variaram entre 2,5% e 50%, *S. intermedius* entre 1,4% e 13,1%, *S. aureus* entre 1,3% e 12,9%, Enterobacteriaceae entre 1,6% e 5%, *Corynebacterium* spp. entre 2,2% e 2,5%, e *S. hyicus* entre 2,5% e 3,4%. As distribuições dos patógenos isolados das amostras de leite das metades mamárias não foram homogêneas entre as propriedades ($P < 0,01$).

Foi observado que as variáveis: tamanho do rebanho, fase de lactação, tipo de instalação, tipo de ordenha, tipo de secagem, ambiente que os animais ficam no período seco e a utilização de antibiototerapia na secagem, foram associadas à ocorrência de mastite subclínica (Tabela 1).

As propriedades foram um fator de confusão para estimativa das associações entre as variáveis e a presença de mastite subclínica, para isso foi realizado o cálculo das razões das chances para mastite subclínica ajustadas por propriedade. Observamos o desaparecimento da maioria das associações com diferenças estatísticas significantes entre as variáveis e a presença de mastite subclínica (Tabela 2).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A mastite é a doença mais onerosa do rebanho leiteiro. Na verdade, as perdas relativas à mastite são duas vezes mais elevadas do que as perdas relativas à infertilidade e doenças reprodutivas. Além disso, do ponto de vista da produtividade, do risco de doenças, do comércio internacional e do bem estar animal, a mastite está no topo da lista. A maioria dos produtores de leite percebem essas perdas pelos: casos clínicos que encontram, animais que precisam descartar e custos com veterinários e medicamentos. A perda menos óbvia, porém mais importante é a que ocorre na produção, a qual é provocada pelos casos de mastite subclínica (Philpot & Nickerson 2002).

A prevalência de mastite subclínica na população de cabras foi de 43,6% e nas metades mamárias 34,7%. A prevalência de mastite subclínica na população de cabras está acima do encontrado por Neves et al. (2010) 11,49% e Bianchini et al. (2010) 6,88% no estado da Paraíba, por Langoni et al. (2012) 12,5% nos estados de São Paulo e Minas Gerais e Peixoto et al. (2012) 29,06% no estado da Bahia.

A maior prevalência de mastite subclínica foi de 68,0% e a menor 23,68%. Segundo Contreras et al. (2007), a mastite subclínica predomina nos rebanhos de pequenos ruminantes, apresentando prevalência entre 5 e 30%, podendo alcançar taxas elevadas em determinadas situações de manejo.

A propriedade que apresentou a maior prevalência de mastite subclínica diferiu principalmente da propriedade com menor prevalência nas seguintes características: os animais eram mantidos confinados, a ordenha era realizada manualmente, a secagem das cabras era do tipo intermitente e não realizava-se antibioticoterapia no período de secagem, sendo os casos de mastite clínica tratados apenas com antibioticoterapia pela via intramamária. Frente à essas características de manejo, observamos que os rebanhos confinados, ordenhados manualmente, que não realizavam antibioticoterapia pela via intramamária na secagem e que nos casos de mastite clínica adotam apenas a terapêutica pela via intramamária, estão mais susceptíveis à ocorrência e transmissão das mastites (Contreras et al. 1998, Chaffer et al. 2003, Gonzalo et al. 2004).

A prevalência de mastite clínica na população de cabras foi de 5,84% e nas metades mamárias 2,92%. A prevalência de mastite clínica na população de cabras foi superior ao mencionado na literatura (<5%), no entanto, é normal que a prevalência eleve-se na falta de um correto manejo higiênico-sanitário (Contreras et al. 2007).

Pinheiro et al. (2000), estudaram a prevalência da mastite clínica na caprinocultura cearense constatando prevalência de 51,2% em um rebanho de cabras criadas em condições precárias juntamente com outras espécies de animais de produção, o que demonstra que o valor da prevalência é proporcional ao tipo de manejo sanitário adotado na propriedade (Smith & Sherman, 2009, Fuquay et al. 2011).

Apenas três propriedades apresentaram animais com mastite clínica, sendo que as prevalências em nível de cabras variou entre 4% e 34,28%. As propriedades que apresentaram mastite clínica no rebanho mantinham os animais confinados durante os períodos de lactação e período seco, realizavam ordenha manual, secagem intermitente e não utilizavam antibiótico no período seco. Isso demonstra que vários fatores podem influenciar a ocorrência de mastite clínica no rebanho, dentre eles estão: resistência natural da glândula mamária, tipo de instalação, estágio de lactação, hereditariedade, idade dos animais, infectividade, patogenicidade e virulência do agente, diagnóstico precoce, antibioticoterapia no período de secagem e tipo de ordenha, além da falta de um programa de prevenção e controle contra mastite (Anderson et al. 2004, Mota 2008).

O cultivo bacteriológico é considerado padrão ouro no diagnóstico das infecções da glândula mamária. Das 513 amostras de leite das metades mamárias examinadas, 34,70% apresentaram crescimento bacteriano, enquanto 65,30% mostraram-se negativas. As culturas negativas podem estar relacionadas, provavelmente, a ausência da doença, as mastites assépticas ou a agentes que exigem condições especiais para isolamento (Mota 2008).

As análises microbiológicas demonstraram a ocorrência dos mais importantes patógenos das mastites nas 10 propriedades estudadas. Dentre os patógenos mais isolados nas metades mamárias: ECN (23,98%), ECP (8,36%), Enterobacteriaceae (1,4%), *Corynebacterium* spp. (0,60%), *Micrococcus* spp. (0,20%) e *Streptococcus* spp. (0,20%). Todos esses patógenos com exceção dos ECP (*S. lutrae* e *S. scheleiferi* subsp. *coagulans*) já foram isolados no leite de cabra no Brasil por Mota et al. (2000), Silva et al. (2004), Langoni et al. (2006), Almeida (2009), Neves et al. (2010) e Peixoto et al. (2012).

As propriedades que apresentaram as maiores prevalências de mastite subclínica nas metades mamárias e os maiores percentuais de isolamento de ECN, mantinham os rebanhos em

confinamentos e realizavam ordenha manual, sendo que essas características podem favorecer a infecção da glândula mamária, pois dentro dos ECN estão algumas espécies comensais na pele dos animais, mucosas e mãos dos ordenhadores, sendo relativamente estáveis no ambiente, podendo causar a mastite contagiosa (Oliveira et al. 2011, Peixoto et al. 2012).

A elevada ocorrência de ECN (23,98%) corrobora com os estudos de Silva et al. (2004), Langoni et al. (2006), Peixoto et al. (2010) e Oliveira et al. (2011), sendo os ECN importantes patógenos de mastite subclínica caprina nos diferentes sistemas de criação.

As infecções por ECN são mais compatíveis com a ausência de manifestações clínicas nos animais, sendo importantes agentes das mastites subclínicas em cabras. Estes micro-organismos podem causar infecções subclínicas durante toda lactação, persistir por alguns meses ou até mesmo no período seco (Poutrel 1984). Em rebanhos de caprinos leiteiros onde não pratica-se a higienização dos tetos, existe uma alta prevalência de *S. epidermidis* (Hogan et al. 1987, Moroni et al. 2005).

S. aureus, foi o ECP mais isolado neste estudo, considerado o agente clássico da mastite, destacando-se como causador da mastite contagiosa, sendo de difícil tratamento devido à elevada resistência, além dos riscos para a saúde pública pela produção de toxinas termoresistentes (Fagundes & Oliveira 2004, Freitas et al. 2004). As outras espécies isoladas neste estudo de ECP (*S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. lutrae* e *S. scheleiferi* subsp. *coagulans*) são menos frequentes na ocorrência de mastites e usualmente são isolados do leite de cabras (Vassiliadou 1991, Kyozaire et al. 2005).

As bactérias do gênero *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Micrococcus* spp. e da família Enterobacteriaceae são agentes isolados com menor frequência nas mastites caprinas (Anderson et al. 2004, Bergonier et al. 2003, Contreras et al. 2007, Smith & Sherman, 2009). O presente estudo encontrou baixa frequência desses patógenos no cultivo microbiano das amostras de leite das metades mamárias, corroborando com os trabalhos acima citados.

Pela análise univariada dos fatores de risco para mastite subclínica observou-se que as variáveis: tamanho do rebanho, fase de lactação, tipo de instalação, tipo de ordenha, tipo de secagem, ambiente de permanência dos animais no período seco e utilização de antibioticoterapia no momento da secagem, estavam associadas à presença de mastite subclínica. No entanto, as variáveis: raça, local de ordenha, lavagem dos tetos, secagem dos tetos com papel toalha descartável ou pano esterilizado, realização de pré e pós-dipping, não estavam associados à presença da doença (Tabela 1).

O tamanho do rebanho variou entre 20 e 160 animais. Para a análise univariada, o tamanho do rebanho foi dividido em duas categorias, uma com até 38 animais e outra acima de 38 animais. Houve diferença estatística entre a associação tamanho do rebanho e presença de mastite subclínica ($P < 0,001$; OR=0,28) e na razão de chances (*Odds Ratio*) para mastite subclínica ajustadas por propriedade ($P = 0,0268$; OR=0,3), tendo como referência a categoria acima de 38 animais (Tabela 1 e 2). Propriedades com rebanhos maiores tendem a apresentar maiores taxas de prevalência da mastite, em decorrência da dificuldade na execução das atividades de controle e profilaxia de rotina contra a doença (Peixoto et al. 2012). A caprinocultura contemporânea busca por rebanhos de alta performance, potencializando o menor número possível de animais com a maior capacidade de produção leiteira, sendo a formação desses rebanhos fundamentada na adoção de novas tecnologias de produção, capacitação de mão de obra e de programas de prevenção e controle das mastites (Garcia & Travassos 2012).

Não houve diferença estatística significativa ($P = 0,3442$; OR=0,3) entre a associação raça (Saanen ou Anglo-Nubiana) e presença de mastite subclínica (Tabela 1). Peixoto et al. (2012) observaram que animais de raça pura ou de maior potencial zootécnico recebem maiores cuidados dos proprietários, especialmente na ordenha, com melhores instalações e condições higiênicas sanitárias. Do contrário, rebanhos mais heterogêneos, com animais mestiços, recebiam menores cuidados, justificando o maior percentual encontrado de animais com mastite.

Na associação entre a categoria local de ordenha (plataforma ou curral) e a presença de mastite subclínica não houve diferença estatística significativa ($P = 0,9261$; OR=1,03) (Tabela 1). O local de ordenha é fundamental para a prevenção da mastite. Além disso, quando a ordenha é realizada no curral, os ordenhadores são menos criteriosos aos procedimentos de desinfecção e antissepsia, havendo maior facilidade de transmissão de patógenos entre animais e até no mesmo animal quando os procedimentos antes e após ordenha são inadequados (Prestes et al. 2003).

Com relação à fase de lactação, houve diferença estatística significativa na associação entre as diferentes fases de lactação (Inicial, Intermediária e Final) e a presença de mastite subclínica ($P < 0,0001$; OR fase inicial=0,33; OR fase final=1,06) (Tabela 1). Sabe-se que vários fatores fisiológicos podem afetar a contagem de células somáticas, como a fase de lactação, sendo que as

cabras na fase inicial ou final de lactação tendem a aumentar a CCS (Fernandes 2002, Gomes 2003, Peixoto et al. 2012), fenômeno observado neste estudo.

Houve diferença estatística significativa ($P=0,0052$; $OR=2,44$) na associação entre a categoria tipo de instalação (pasto ou confinado) e a presença de mastite subclínica (Tabela 1). Segundo Anderson et al. (2004), no confinamento deve-se evitar a superpopulação, devendo a cama estar limpa e seca para evitar exposição aos patógenos. Para Smith e Sherman (2009), para criação dos animais soltos a pasto é necessário que o pasto tenha uma adequada drenagem e que os animais sejam mantidos em sistema de rotação contínua de pastagem, evitando segundo Prestes et al. (2002), áreas alagadiças e/ou sombreadas, com forragem grosseira, favorecendo a multiplicação de patógenos ambientais e consequentemente a infecção da glândula mamária.

Na associação entre tipo de ordenha (manual ou mecânica) e a presença de mastite subclínica, houve diferença estatística significativa ($P=0,0499$; $OR=0,59$) (Tabela 1). As propriedades que ordenhavam as cabras manualmente foram as únicas a apresentarem animais no rebanho com mastite clínica. A ordenha manual, realizada corretamente predispõe menos ao aparecimento de mastites que a ordenha mecânica, mas as mãos contaminadas do ordenhador e a utilização de equipamento de ordenha sem desinfecção podem favorecer a difusão de patógenos no rebanho durante a ordenha (Vilanova et al. 2008).

Não houve diferença estatística significativa entre a categoria lavagem dos tetos (Sim ou Não), secagem dos tetos com papel toalha descartável ou pano esterilizado (Sim ou Não) e realização de pré e pós-dipping (Sim ou Não) com a presença de mastite subclínica ($P=0,5528$; $OR=0,85$) (Tabela 1). A ocorrência de mastite intensifica-se na medida em que procedimentos básicos de antissepsia dos tetos e desinfecção dos equipamentos de ordenha não são realizados ou realizados inadequadamente (Mota 2008), não sendo evidenciado neste estudo.

Houve diferença estatística entre a associação tipo de secagem (Intermitente ou Abrupto) e a presença de mastite subclínica ($P=0,0105$; $OR=1,92$) (Tabela 1), tendo como referência a secagem intermitente. A prática mais comum é a interrupção abrupta da ordenha no momento da secagem. Como é recomendada a utilização de antibioticoterapia via intramamário em todas as cabras no momento da secagem, a interrupção de ordenha abrupta tende a facilitar o manejo (Fuquay et al. 2011).

Independente do tipo de secagem o ideal é que no período de duas a uma semana antes da ordenha sejam feitas modificações na dieta das cabras leiteiras, com o objetivo de reduzir a produção durante os procedimentos de secagem (Smith & Sherman 2009).

Houve diferença estatística entre a associação ambiente de permanência no período seco (Pasto ou Confinado) e a presença de mastite subclínica ($P=0,0056$; $OR=0,41$) (Tabela 1), tendo como referência o pasto. O período seco é uma necessidade fisiológica para a cabra leiteira e apresenta relação direta com a saúde da glândula mamária, a produção de leite e prevenção de doenças em geral. Durante este período, independente do ambiente de permanência no período seco, este deve garantir que o animal retorne ao início do próximo parto em bom estado sanitário e nutricional, impedindo infecções intramamárias no período seco, a qual afetaria negativamente a produção leiteira da próxima lactação (Thurmond 1993, Contreras et al. 2007, Mota 2008).

Houve diferença estatística entre a associação uso de antibioticoterapia na secagem (Sim ou Não) e a presença de mastite subclínica ($P=0,0218$; $OR=0,54$) (Tabela 1), tendo como referência a não utilização de antibiótico após a última ordenha, no momento de secagem da cabra. Essa terapia tem-se mostrado como uma ferramenta eficiente na diminuição da prevalência de mastite subclínica no rebanho, diminuição da ocorrência de mastite clínica nas cabras secas e redução a incidência de novas infecções após o parto, proporcionando ganhos na produção (Chaffer et al. 2003, Gonzalo et al. 2004).

Apesar de haver diferença estatística nas análises univariadas, estas na sua grande maioria não ocorriam quando realizado o ajuste por propriedade (Tabela 2), fato explicado pela existência de fatores de confusão que não foram avaliados e que influenciam a análise dos dados. As propriedades são os principais fatores de confusão devido à existência de inúmeras características de manejo do rebanho, produção e instalações, fazendo as associações positivas entre a presença de mastite subclínica e as variáveis obtidas no questionário epidemiológico desaparecerem.

Nenhuma das propriedades rurais recebia assistência veterinária, e nenhum outro problema sanitário, reprodutivo ou nutricional foi observado nos rebanhos durante a colheita das amostras. A falta de assistência veterinária é um problema que afeta não só a caprinocultura de leite, mas todo tipo de produção animal, refletindo diretamente na saúde do rebanho e na qualidade do leite. Muitas doenças não foram observadas, provavelmente pela falta de monitoramento sanitário

do rebanho, pois somente a colheita de amostras de leite e o procedimento do questionário não permitem uma avaliação mais profunda da sanidade dos animais.

As prevalências de mastite subclínica (43,6%) e clínica (5,84%) nas populações de cabras estudadas foram superiores às descritas na literatura. Os principais patógenos envolvidos nos casos de mastite subclínica pertenciam aos ECN. Dentre os ECP, *S. aureus* foi o mais isolado 4,68% nas metades mamárias, o que reforça a importância desse agente contagioso na etiologia das mastites nesta espécie, e nos faz alertar para o risco em saúde pública na gênese das toxi-infecções de origem alimentar.

Pela análise univariada dos fatores de risco, foi observado que as variáveis: tamanho do rebanho, fase de lactação, tipo de instalação, tipo de ordenha, tipo de secagem, ambiente de permanência dos animais no período seco e o uso de antibioticoterapia no período de secagem foram associados à ocorrência de mastite subclínica. No entanto, quando essas variáveis foram ajustadas por propriedades as associações na sua maioria desapareceram, pelo fato das propriedades serem um importante fator de confusão, influenciando a análise univariada com características desconhecidas de manejo do rebanho, produção e instalações, na qual variam por propriedade.

Agradecimentos.- A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de doutorado (2010/17254-7) e de auxílio à pesquisa (2011/07107-0).

REFERÊNCIAS

- Anderson D.E., Hull B.H. & Pugh D.G. 2004. Enfermidades da glândula mamária. In: PUGH, D.G. (Ed). Clínica de ovinos e caprinos. São Paulo: Roca, p.379-399.
- Almeida J.F. 2009. Agentes infecciosos causadores de mastite e parâmetros físico-químicos na qualidade do leite de cabra *in natura*. Tese de Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 107p.
- Barros G.C. & Leitão C.H. 1992. Influência da mastite sobre as características físico-químicas do leite de cabra. Pesq. Vet. Bras. 12:45-48.
- Baudry C., De Cremoux R., Chartier C. & Perrin G. 1997. Impact of the cellular concentration of milk in goats on its production and its composition. Vet. Res. 28:277-286.
- Bianchini B.I.S., Da Silva L.B.G., Silva A.P., Lima J.C.O. & Falcão, D.P. 2010. Frequência e etiologia da mastite caprina na região do Cariri paraibano. Med. Vet. 4:1-5.
- Bergonier D., De Crémoux R., Rupp R., Lagriffoul G. & Berthelot, X. 2003. Mastitis of dairy small ruminants. Vet. Res. 34:689-716.
- Contreras A., Sierra D., Corrales J.C., Sanchez A. & Gonzalo C. 1998. Diagnostico indirecto de las mamitis caprinas. Tratado de patologia y producción ovina: Mamitis caprina II. 54:25-36.
- Contreras A., Sierra D., Sanchez A., Corrales J.C., Marco J.C., Paape M.J. & Gonzalo, C. 2007. Mastitis in small ruminants. Small Rumin. Res. 68:145-153.
- Chaffer M., Leitner G., Zamir S. & Winkler, M. 2003. Efficacy of dry-off treatment in sheep. Small Rumin. Res. 47:11-19.
- Cullor J.S., Tyler J.W. & Smith B.P. 1994. Distúrbios da glândula mamária. In: SMITH, B.P. (Ed.) Tratado de Medicina Interna dos Grandes Animais. São Paulo: Manole, v.2, p.1041-1060.
- Domingues P.F. & Langoni H. 2001. Manejo sanitário animal. Rio de Janeiro: EPUB, p.210.
- Dulin A.M., Paape M.J., Schultze W.D. & Weinland B.T. 1983. Effect of parity, stage of lactation, and intramammary infection on concentration of somatic cells and cytoplasmic particles in goat milk. J. Dairy Sci. 66:2426-2433.
- Fagundes H. & Oliveira C.A.F. 2004. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. Cienc. Rural. 34:1315-1320.
- Freitas M.F.L., Leal Balbino T.C., Mota R.A. & Stamford T.L.M. 2004. Exotoxinas estafilocócicas. Cienc. Vet. Trop. 7:63-74.
- Fuquay J.W., Fox P. & Mcsweeney P.L.H. 2011. Encyclopedia of Dairy Sciences, 2nd Edition, Four-Volume set, 2nd Edition, p.4170.
- Fonseca L.F.L. & Santos M.V. 2001. Qualidade do leite e controle de mastite. 2 edição. São Paulo: Lemos Editorial, p. 214.
- Fernandes M.A. 2002. Avaliação das características físico-químicas, celulares e microbiológicas do leite de cabras, das raças Saanen, e Alpina, criadas no estado de São Paulo. Tese de Doutorado em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 152p.

- Garcia R.V. & Travassos A.E.R. 2012. Aspectos gerais sobre o leite de cabra: uma revisão. Rev. Inst. Lac. "Cândido Tostes". 67:81-88.
- Gomes V. 2003. Influência do estágio de lactação na secreção láctea de cabras (*Capra hircus*) Saanen. 2003. 86p. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 86p.
- Gonzalo C., Tardaguila J.A., De La Fuente L.F. & San Primitivo, F. 2004. Effects of selective and complete dry therapy on prevalence of intramammary infection and on milk yield in the subsequent lactation in dairy ewes. J. Dairy Res. 71:33-38.
- Hogan J.S., White D.G. & Pankey J.W. 1987. Effects of teat dipping on intramammary infections by staphylococci other than *Staphylococcus aureus*. J. Dairy Sci. 70:873-879.
- Kyozaire J.K., Veary C.M., Petzer I.M. & Donkin E.F. 2005. Microbiological quality of goat's milk obtained under different production systems. J. S. Afr. Vet. Assoc. 76:69-73.
- Langoni H., Da Silva A.V., Cabral K.G. & Domingues P.F. 1998. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. Ver. Bras. Med. Vet. 20, p.204-209.
- Langoni H., Domingues P.F. & Lucheis S.B. 2006. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. Rev. Bras. Cienc. Vet. 13:51-54.
- Langoni H. 2007. Mastite bovina. Conceitos e Fundamentos. In: Encontro de pesquisadores em mastites, Botucatu. Anais... Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, p. 8-17.
- Langoni H., Citadella J.C.C., Machado G.P., Faccioli P.Y., Lucheis S.B. & Da Silva, A.V. 2012. Aspectos microbiológicos e citológicos do leite na mastite caprina subclínica. Vet. Zootec. 19:815-822.
- Mota R.A. 2008. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e controle das mastites em caprinos e ovinos. Tec. Cienc. Agropec. 2:57-61.
- Mota R.A., De Castro F.J.C., Da Silva L.B.G. & Oliveira, A.A.F. 2000. Etiologia e sensibilidade a antimicrobianos in vitro das bactérias isoladas do leite de cabras com mastite procedentes da Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. Hora Vet. 19: 26-29.
- Moroni P., Pisoni G., Ruffo G. & Boettcher P.J. 2005. Risk factors for intramammary infections and relationship with somatic-cell counts in Italian dairy goats. Prev. Vet. Med. 69:163-173.
- Neves P.B., Medeiros E.S., Sá, V.V., Camboim E.K.A., Garino Júnior F., Mota R.A. & Azevedo, S.S. 2010. Perfil microbiológico, celular e fatores de risco associados à mastite subclínica em cabras no semiárido da Paraíba. Pesq. Vet. Bras. 30:379- 384.
- Oliveira C.J.B., Hisrich E.R., Moura J.F.P., Givisiez P.E.N., Costa R.G. & Gerbreyes, W.A. 2011 On farm risk factors associated with goat milk in Northeast Brazil. Small Rumin. Res. 98:64-69.
- Peixoto R.M., Amanso E.S., Cavalcante M.B., Azevedo S.S., Pinheiro Junior J.W., Mota R.A. & Costa, M.M. 2012. Fatores de risco para mastite infecciosa em cabras leiteiras criadas no estado da Bahia. Arq. Inst. Biol. 79:101-105.
- Peixoto R.M., França C.A., Souza Júnior A.F., Veschi J.L.A. & Costa, M.M. 2010. Etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos da mastite em pequenos ruminantes e concordância de técnicas empregadas no diagnóstico. Pesq. Vet. Bras. 30:735-740.
- Philpot W.N. & Nickerson S.C. 2002. Vencendo a luta contra a mastite. São Paulo: Milkbuzz, 192p.
- Prestes D.S., Filappi, A. & Cecim M. 2002. Susceptibilidade à mastite: Fatores que influenciam – uma revisão. Rev. Fac. Zootec. Vet. Agro. Uruguaiana. 9:48-59.
- Quinn P.J., Carter M.E., Markey B., et al. 1994. Mastitis. Clinical Veterinary Microbiology. London: Mosby-Year Book Europe Limited, Cap. 36, p.327-344.
- Ribeiro M.E.R., Petrini L.A., Aita M.F., Balbinotti M., Stumpf Juniro W., Gomes J.F., Schramm R., Martins P.R. & Barbosa R.S. 2003. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteira na região sul do Rio Grande do Sul. Rev. Bras. Agroec. 9:287-290.
- Silva E.R., Siqueira A.P., Martins J.C.D., Ferreira W.P.B. & Silva, N. 2004. Identification and in vitro antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis in the Northeast of Brazil. Small Rumin. Res. 55:45-49.
- Smith M.C. & Sherman D.M. 2009. Goat medicine. Willey & Blackwell, Ames, Iowa, USA, 2nd, p.870.
- SAS Institute. 2009. SAS/STAT User's Guide. Version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Thurmond M.C. 1993. Epidemiologic methods in mastitis treatment and control. Vet. Clin. Food Anim. 9:435-444.
- Vilanova M., Gonçalves M., Osório M.T.M., Esteves R. & Schmidt V. 2008. Aspectos sanitários do úbere e composição química do leite de cabras Saanen. Acta Sci. Vet. 36:235-240.
- Vassiliadou, D.K. 1991. Mastitis-related pathogens in goat milk. Small Rumin. Res. 4:203-212.

TABELA 1. Análise univariada dos fatores de risco para mastite subclínica nas populações de cabras nas 10 propriedades estudadas.

Variável	N	Positivos (%)	OR	IC(95%)OR	P
Tamanho do rebanho					<0,001
> de 38 animais	91	63 (69,2)		Ref.*	0,3242
Até 38 animais	166	64 (38,6)	0,28	0,16-0,48	
Raça					0,9261
Saanen	199	90 (45,2)		Ref.	0,9261
Anglo-Nubiana	58	22 (38,0)	1,35	0,7-2,46	
Local de ordenha					<0,0001
Plataforma	222	97 (43,7)		Ref.	0,0052
Curral	35	15 (43,0)	1,03	0,5-2,12	
Fase de lactação					0,0499
Inicial	81	76 (94,0)	0,33	0,18-0,58	0,0052
Intermediária	154	25 (16,23)	-	-	
Final	22	11 (50,0)	1,06	0,42-2,63	
Tipo de instalação					0,0052
Confinado	199	96 (48,24)		Ref.	0,0499
Pasto	58	16 (27,60)	2,44	1,29-4,63	
Tipo de ordenha					0,0499
Manual	82	43 (52,44)		Ref.	0,0499
Mecânica	175	69 (39,43)	0,59	0,35-1,00	

*Ref.= Classe de referência.

TABELA 1. (Continuação) Análise univariada dos fatores de risco para mastite subclínica nas populações de cabras nas 10 propriedades estudadas.

Variável	N	Positivos (%)	OR	IC(95%)OR	P
Lavagem dos tetos					0,5528
Não	98	45 (46,00)		Ref.*	0,5528
Sim	159	67 (42,14)	0,85	0,51-1,42	
Secagem dos tetos com papel toalha descartável ou pano esterelizado					0,5528
Não	98	45 (46,00)		Ref.	0,5528
Sim	159	67 (42,14)	0,85	0,51-1,42	
Pré-dipping					0,5528
Não	98	45 (46,00)		Ref.	0,5528
Sim	159	67 (42,14)	0,85	0,51-1,42	
Pós-dipping					0,5528
Não	98	45 (46,00)		Ref.	0,5528
Sim	159	67 (42,14)	0,85	0,51-1,42	
Tipo de secagem					0,0105
Intermitente	110	58 (52,72)		Ref.	0,0105
Abrupto	147	54 (36,73)	1,92	1,16-3,17	
Ambiente período seco					0,0056
Pasto	51	31 (61,00)		Ref.	0,0056
Confinado	206	81 (39,32)	0,41	0,22-0,78	
Antibioticoterapia no período seco					0,0218
Não	88	47 (53,41)		Ref.	0,0218
Sim	169	65 (38,46)	0,54	0,32-0,92	

*Ref.= Classe de referência.

TABELA 2. Razão das chances (*Odds Ratio*) para mastite subclínica ajustadas por propriedade.

Variável	OR	IC(95%)OR	P
Tamanho da rebanho			0,0268
> de 38 animais		Ref. *	
Até 38 animais	0,3	0,10-0,83	
Raça			0,6768
Saanen		Ref.	
Anglo-Nubiana	0,75	0,16-3,6	
Local de ordenha			0,1519
Plataforma		Ref.	
Curral	4,02	0,51-31,82	
Fase de lactação			0,2500
Inicial	1,13	0,15-8,4	
Intermediária	-	-	
Final	0,40	0,01-1,4	
Tipo de instalação			0,0794
Pasto		Ref.	
Confinado	3,33	0,84-13,23	
Tipo de ordenha			0,1405
Mecânica		Ref.	
Manual	2,8	0,66-11,82	

*Ref.= Classe de referência.

TABELA 2. (Continuação) Razão das chances (*Odds Ratio*) para mastite subclínica ajustadas por propriedade.

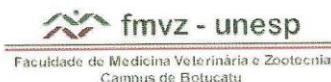
Variável	OR	IC(95%)OR	P
Lavagem dos tetos			0,4461
Sim		*Ref.	
Não	1,55	0,44-5,44	
Secagem dos tetos com papel toalha descartável ou pano esterelizado			0,4461
Sim		Ref.	
Não	1,55	0,44-5,44	
Pré-dipping			0,4461
Não		Ref.	
Sim	1,55	0,44-5,44	
Pós-dipping			0,4461
Não		Ref.	
Sim	1,55	0,44-5,44	
Tipo de secagem			0,4085
Intermitente		Ref.	
Abrupto	0,63	1,18-2,15	
Ambiente período seco			0,3771
Pasto		Ref.	
Confinado	0,53	0,11-2,5	
Antibioticoterapia no período seco			0,5779
Sim		Ref.	
Não	1,4	0,38-4,97	

*Ref.= Classe de referência.

ANEXOS

10. ANEXOS

10.1 Atestado de aprovação na Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da FMVZ-UNESP-Botucatu



A T E S T A D O

Atesto para os devidos fins, que o Projeto **“Caracterização microbiológica, molecular e contagem de células somáticas por citometria de fluxo (Somacount 300®) e por contagem microscópica (Prescott e Breed, 1910) do leite caprino mastítico”**, Protocolo nº 185/2010-CEUA, de Gustavo Puglia Machado, aluno do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, nível Doutorado da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 12 de novembro de 2010.

Prof. Ass. Dr. Carlos Roberto Teixeira

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

10.2 Questionário Epidemiológico

CADASTRO DA PROPRIEDADE

Data da Colheita das Amostras:

Nome do proprietário ou responsável pelos animais:

Nome da propriedade:

Endereço:

Estado:

Cidade:

Telefone Fixo:

Celular:

INFORMAÇÕES BÁSICAS

a) O leite de cabra é a principal atividade desenvolvida na propriedade?

☐ SIM ☐ NÃO Qual?

b) Número de animais em lactação:

c) Litros de leite produzidos diariamente na propriedade (estimativa):

d) Idade média dos animais do rebanho:

e) fase de lactação do rebanho:

REALIZAÇÃO DE CMT

☐ Diário

☐ Semanal

☐ Quinzenal

☐ Mensal

☐ Semestral

☐ Não Realiza

REALIZAÇÃO DE CCS

☐ Semanal

☐ Quinzenal

☐ Mensal

☐ Semestral

☐ Não Realiza

PRÉ-DIPPING

a) A propriedade em questão realiza o pré-dipping?

☐ SIM ☐ NÃO

b) Se sim, descrever o método (desinfetante utilizado, equipamentos, secagem com papel toalha ou pano esterilizado):

c) O método está sendo realizado corretamente? A secagem do teto se mostra eficiente?

☐ SIM ☐ NÃO

PÓS-DIPPING

a) A propriedade em questão realiza o pós-dipping?

☐ SIM ☐ NÃO

b) Se sim, descrever o método (princípio utilizado, equipamentos):

c) O método está sendo realizado corretamente?

☐ SIM ☐ NÃO

HIGIENE PRÉ-ORDENHA

a) A propriedade realiza algum tipo de banho ou higienização dos animais na pré-ordenha?

Lavagem do teto ☐ SIM ☐ NÃO

Secagem c/ papel descartável ☐ SIM ☐ NÃO Qual?

ALIMENTAÇÃO

a) Existe na propriedade a prática de fornecimento de alimento aos animais após a ordenha?

☐ SIM ☐ NÃO

LOCAL DE ORDENHA

☐ Plataforma ☐ Curral

INSTALAÇÕES

a) A sala de ordenha se encontra em condições mínimas de higiene antes do início da ordenha?

☐ SIM ☐ NÃO

b) O ambiente da sala de ordenha é higienizado durante a ordenha?

☐ SIM ☐ NÃO

b) O ambiente da sala de ordenha é higienizado durante a ordenha?

☐ SIM ☐ NÃO

c) como: retiradas das fezes:

☐ SIM ☐ NÃO

d) Lavagem:

☐ SIM ☐ NÃO

EQUIPAMENTOS

a) Qual o tipo de ordenha realizado na propriedade? (mecânica, manual, etc.)

b) As ordenhadeiras se encontram em bom estado de manutenção?

☐ SIM ☐ NÃO

c) Existe a limpeza das teteiras na pós-ordenha?

☐ SIM ☐ NÃO

como: ☐ antes e após ordenha outro: ☐ _____

d) Existe acompanhamento técnico para manutenção do equipamento (ordenhadeiras)?

☐ SIM ☐ NÃO

e) Qual a frequência deste acompanhamento? _____

f) O tanque de refrigeração está em condições adequadas de manutenção

☐ SIM ☐ NÃO

g) Qual a frequência de higienização completa do tanque? _____

PERÍODO SECO

a) Como é feito o Processo?

☐ Abrupto ☐ Intermitente outro: _____

b) Ambiente?

☐ Pasto ☐ Confinamento outro: _____

c) Usa antibiótico para secagem?

☐ Sim ☐ Não

qual: _____

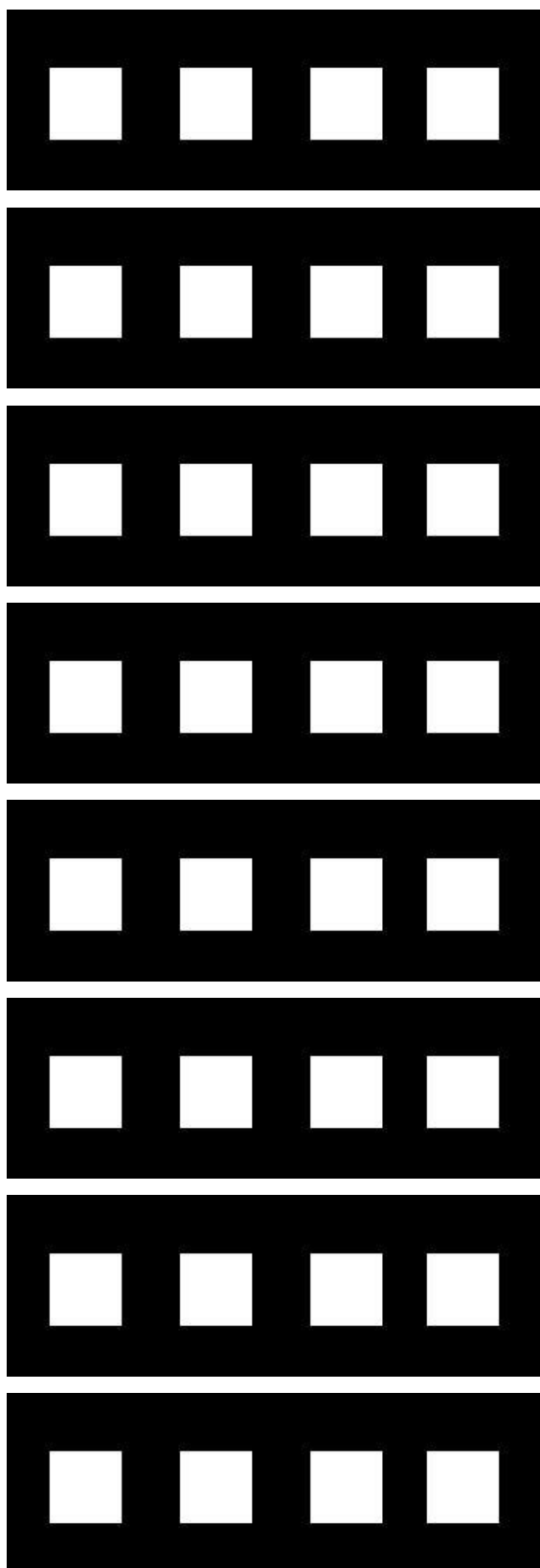
TRATAMENTO DE MASTITE

a) É feito o tratamento para mastite clínica?

☐ sim ☐ não qual: _____

☐ intramamário ☐ sistêmico ☐ associação

10.3 Molde para preparo das lâminas de microscopia para realização da técnica de Prescott e Breed (1910)



10.4 Esquematização da técnica de Prescott e Breed (1910) e coloração das lâminas de microscopia segundo Zeng (1996)

Protocolo adaptado de Prescott e Breed (1910) e Zeng (1996)

Distribui 10 μ L de leite em uma área de um cm²



Secar por 24 horas em temperatura ambiente



Fixação:

10 minutos em solução de Carnoy's

1 minuto em álcool etílico a 50%

1 minuto em álcool etílico 30%

*As lâminas devem ser fixadas no álcool etílico somente no momento da coloração. Caso as lâminas não possam ser coradas, fixar apenas na solução de Carnoy's. Quando for realizar a coloração, continuar o protocolo a partir do álcool etílico 50%.



Coloração:

6 minutos em solução de pironina-Y a 0,5% e verde de metil a 0,3% em água destilada (partes iguais de cada reagente).



Imersão:

1 minuto em álcool n-butílico

1 minuto em água destilada

Solução de Carnoy's

Ácido acético glacial: 100 mL

Clorofórmio: 300 mL

Etanol P.A.: 600mL

Verde de Metil e Pironina-Y

Pironina-Y a 0,5% em água destilada - (Preparar 500mL).

Verde de metil a 0,3% em água destilada - (Preparar 500mL).

*Acondicionar em frascos foscos separados e protegidos do sol.

*Deixar na cuba somente o que for usar, depois descartar.

*Homogeneizar as soluções antes de usar.

10.5 Normas para Publicação

10.5.1 Small Ruminant Research

GUIDE FOR AUTHORS

.

INTRODUCTION

Types of article:

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Short Communication
4. Position Papers
5. Technical Notes
6. Letters to the Editor
7. Book Reviews

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. Reviews will often be invited, but submitted reviews will also be considered for publication. All reviews will be subject to the same peer review process as applies for original papers.

Short Communication is a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications may be submitted to the journal as such, or may result from a request to condense a regular paper, during the peer review process. They should not occupy more than 8 journal pages including figures, tables and references.

Position Papers are informative and thought-provoking articles on key issues, often dealing with matters of public concern. These will usually be invited, but a submitted paper may also be considered for publication. They should not occupy more than 10 Journal pages.

Technical Note is a report on a new method, technique or procedure falling within the scope of Small Ruminant Research. It may involve a new algorithm,

computer program (e.g. for statistical analysis or for simulation), or testing method for example. The Technical Note should be used for information that cannot adequately incorporated into and Original Research Article, but that is of sufficient value to be brought to the attention of the readers of Small Ruminant Research. The note should describe the nature of the new method, technique or procedure and clarify how it differs from those currently in use if cannot be incorporated. They should not occupy more than 4 Journal pages.

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal, within 4 months preceding the most current issue, are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editor-in-Chief. The Editor-in-Chief also reserves the right to edit or shorten submitted letters that are accepted for publication. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers. Please follow the information below to submit your letter.

Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old. Book reviews will be solicited. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to the Editor-in-Chief.

Papers on polymorphism studies will only be accepted if they contain significant new information for the readers and have direct relevance to those small ruminant species described in the aims and scope of this journal. Submissions on studies involving single-nucleotide polymorphism (SNP) only, without linking them strongly and experimentally to production traits, are not encouraged.

Contact details for submission

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can determine the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Page charges

This journal has no page charges.

BEFORE YOU BEGIN***Ethics in publishing***

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of Small Ruminant Research.

.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see elsevier.com/postingpolicy), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts: Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed. After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop <http://webshop.elsevier.com/languageediting/> or visit our customer support site <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All

correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/rumin/>

PREPARATION

Article structure

Manuscripts should have numbered lines, with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Manuscripts in general should be organized in the following order:

- Abstract
- Keywords (indexing terms), normally 3-6 items
- Introduction
- Material studied, area descriptions, methods, techniques
- Results
- Discussion
- Conclusion
- Acknowledgment and any additional information concerning research grants, etc.
- References

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal

address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

Authors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of

common domestic animals. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y . In principle, variables are to be presented in italics. Powers of are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text). Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are $*P<0.05$, $**P<0.01$ and $***P<0.001$. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} , not as Ca^{++} . Isotope numbers should precede the symbols, e.g. ^{18}O . The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list. Table footnotes Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.

Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A

caption should comprise a brief title (not

on the figure itself) and a description of the illustration. Keep

text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference style

Text:

All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data

in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>

.AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal Physics Letters B): <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059> When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully

before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop. Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

10.5.2 Pesquisa Veterinária Brasileira

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@terra.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word. Havendo necessidade (por causa de figuras “pesadas”), podem ser enviados em CD pelo correio, com uma via impressa, ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Caixa Postal 74.591, Seropédica, RJ 23890-000. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (page charge) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o ABSTRACT deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o RESUMO deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre

que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” (www.pvb.com.br). A digitalização deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas

de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exememplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em *itálico* (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas , com independência do texto) e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.