

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ASPECTOS DE PRODUÇÃO E ETIO-
EPIDEMIOLÓGICOS REFERENTES ÀS VIAS DE
TRANSMISSÃO NAS MASTITES OVINAS**

Roberto Ximenes Bolsanello

Dissertação apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária para
obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Paulo Francisco
Domingues

Co-orientador: Prof. Dr. Hélio Langoni

BOTUCATU – SP

Novembro 2007

Nome do autor: Roberto Ximenes Bolsanello

Título: ASPECTOS DE PRODUÇÃO E ETIO-EPIDEMIOLÓGICOS
REFERENTES ÀS VIAS DE TRANSMISSÃO NAS MASTITES OVINAS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Francisco Domingues

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu - SP

Prof. Dr. Luís Carlos de Souza

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu - SP

Profa. Dra. Graziela Barioni

Membro

Área de Grandes Animais

Centro Universitário Vila Velha – UVV - ES

À MINHA FAMÍLIA:

Meus pais, Artelírio e Eliana

Meu irmão Renato

Minha segunda mãe Nena

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre me apoiaram e entenderam as minhas escolhas.

Ao meu irmão Renato, pela presença e alegria em todos os momentos.

Aos meus avós Benedito “Bino” Ximenes, Maria Adelina Ximenes, Ozília Bolsanello e Dermeval Rodrigues.

Aos meus queridos e amigos tios, Adauto Bolsanello e Leonel Ximenes.

Ao amigo, professor e orientador Paulo Francisco Domingues, que eu carinhosamente chamo de Paulinho, pelo exemplo de amizade e educação.

Ao Prof. Hélio Langoni, meu co-orientador, pelos ensinamentos e amizade.

À república MAC DONALD’S “Amo muito tudo isso!!!”, nas pessoas do Nelson Marra e Luciano Eloy, meus irmãos na minha casa em Botucatu, não podendo esquecer o BOB SARARÁ, cachorro e companheiro de república.

À minha grande amiga, Simone Mangia, amiga de todas as horas.

À companheira de projeto Melissa Hartman, amiga de todas as horas, uma amizade forte e sincera.

Ao amigo Amilton de Mello, que se disponibilizou realizar a estatística.
Muito obrigado!

Minha querida amiga Fernanda Saules, pela ajuda na tradução.

Aos amigos Yudney Motta e Aruaque Lotufo, pela amizade e companheirismo.

À Marcella Troncarelli, pela prova de amizade no momento em que precisei “roubar” a data da apresentação de sua qualificação para defender minha dissertação, e a sua irmã Gabriella, pela ajuda na tradução do espanhol. É nos momentos difíceis que vemos os verdadeiros amigos, muito obrigado!

Aos amigos pós-graduandos e residentes, em especial: Rodrigo Silva, Nair Cavalcante, Walkiria Prado, Veruska Maia, Kabrõn Perez, Wellington Borges, André Peres, Jonas Brant, Juliano Hoffmann, Juliana Giantomassi, Audrey Braga, Tatiana Salerno, Érika Cosendey, Karina Rasquel, Cassiano Victória, Gustavo Lara, Janaína Biotto, Fabio Shimabukuro, Deolinda Carneiro, Amanda Keller e Ana Paula Contente.

À amiga Acácia Elias, mastiteira veterana, por sua paciência em minhas dúvidas e minhas brincadeiras.

Ao Fernando Listoni, por ter me ensinado tudo que sei de microbiologia.

Ao Benedito Menozzi e Marcus Correa, técnicos de laboratório, pela ajuda, boas risadas, amizade e, acima de tudo, companheirismo.

Aos professores e amigos Márcio Garcia, Rafael Modolo, Luís Carlos de Souza, Roberto Calderón, Simone Lucheis e Simone Biagio .

À professora da UVV, Graziela Barioni, por ter aceitado participar de minha banca, e pela amizade.

Ao amigo Breno Dalla Maestri, professor, mestre e guru, meus sinceros agradecimentos.

Aos amigos Gustavo “Tatá” Tofoli, Ricardo Caliman, Leonardo “Bugaloo” Pratti e Marcus Barreto.

Aos colegas da graduação, verdadeiros amigos: Roberta Delessa, Roberto Amaral, Thiago Silva, Eduardo Silveira, Ludmila Coutinho da Silva, Arnaldo Coutinho, Marcelo Baé, Marcos Berger, Priscila Leão e Rafael Vieira. Saudade de todos.

Aos amigos botucatuenses Iche, Eduardo Silveira, Aline Rossetto, Pêra entre outros.

Aos graduandos, pós-graduandos, funcionários e estagiários da Ovinocultura da Fazenda Edgárdia, meus sinceros agradecimentos.

À bibliotecária Selma Maria de Jesus, pela ficha catalográfica.

Ao Psicão, melhor amigo do homem.

Às demais pessoas que aqui não foram citadas, porém contribuíram de alguma forma para este trabalho.

"Não digas que o solo é árido, que não chove
freqüentemente,
Que o sol queima , ou que a semente não serve.
Não é a tua função julgar a terra e o tempo.
Tua missão é semear."

Gibran

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3 OBJETIVOS.....	29
4 MATERIAL E METODOS.....	31
4.1 Animais.....	32
4.2 Diagnóstico da mastite.....	33
4.3 Colheita das amostras.....	34
4.4 Diagnóstico etiológico.....	35
4.5 Produção de leite.....	36
4.6 Análise estatística.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1 Produção de leite X CMT x Semana.....	40
5.2 Microbiológico.....	43
5.2.1 Leite.....	43
5.2.2 Esfíncter das tetas.....	48
5.2.3 Insufladores.....	50
5.2.4 Mãos dos ordenhadores.....	52
5.2.5 Orofaringe dos cordeiros.....	54
5.2.6 Água.....	57
6 CONCLUSÕES.....	61
7 BIBLIOGRAFIA.....	63
8 TRABALHO CIENTÍFICO.....	75
ANEXO.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Médias de produção de leite (gramas/dia) e resultados do *California Mastitis Test* em porcentagem do número de tetos negativos e positivos, durante o período de 8 semanas de lactação, de ovelhas da raça Bergamácia..40

Tabela 2: Agentes etiológicos isolados da mastite ovina(%)considerando diversos estudos realizados por diferentes autores.47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ovelhas da raça Bergamácia na Fazenda Edgárdia, Botucatu-SP, 2005	32
Figura 2: Realização do exame de CMT nas ovelhas da raça Bergamácia na fazenda Edgárdia, Botucatu-SP, 2005	33
Figura 3: Colheita de amostras de leite das ovelhas da raça Bergamácia, Fazenda Edgárdia, Botucatu-SP, 2005.	35
Figura 4: Cultivo do leite em placas de Petri contendo ágar sangue ovino 5% e ágar MacConkey, no NUPEMAS, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu-SP, 2005.	36
Figura 5: Produção de leite de ovelhas da raça Bergamácia da Fazenda Edgárdia, Botucatu-SP, 2005.	37
Figura 6: Sistema de ordenha da Fazenda Edgárdia, Botucatu-SP, 2005	37
Figura 7: Prevalência (%) de agentes isolados do leite de ovelhas da raça Bergamácia, considerando o período de oito semanas de estudo	44
Figura 8: Dinâmica da distribuição (%) dos agentes isolados do leite de ovelhas da raça Bergamácia, considerando o período de oito semanas de estudo.	45
Figura 9: Prevalência (%) dos agentes isolados a partir do swab dos esfínteres das tetas	48
Figura 10: Dinâmica da distribuição dos agentes isolados das amostras colhidas de esfíncter de tetas, durante as 8 semanas de lactação.	49
Figura 11: Prevalência (%) dos agentes isolados a partir das amostras colhidas de insufladores da ordenhadeira mecânica.	50
Figura 12: Dinâmica da distribuição dos agentes isolados das amostras colhidas dos insufladores, durante as 8 semanas de lactação.	51
Figura 13: Prevalência (%) dos agentes isolados a partir das amostras colhidas das mãos dos ordenhadores.	52
Figura 14: Dinâmica da distribuição dos agentes isolados das amostras colhidas das mãos dos ordenhadores, durante as 8 semanas de lactação.	53
Figura 15: Prevalência (%) dos agentes isolados a partir das amostras colhidas da região orofaringe de cordeiros.	55

Figura 16: Dinâmica da distribuição dos agentes isolados das amostras colhidas da região orofaringe dos cordeiros, durante as 8 semanas de lactação	56
---	----

Figura 17: Prevalência (%) dos agentes isolados a partir das amostras de água utilizada no sistema de ordenha.....	58
--	----

Figura 18: Dinâmica da distribuição dos agentes isolados das amostras de água da ordenha, durante as 8 semanas de lactação	59
--	----

BOLSANELLO, R.X. Aspectos de produção e etio-epidemiológicos referentes às vias de transmissão nas mastites ovinas. Botucatu, 2007, 90 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007. Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

A ovinocultura vem se expandindo no Brasil nos últimos anos, e com isso começa-se a observar também um maior interesse para a produção de leite dessa espécie. Mesmo em países cuja produção leiteira é uma tradição de muitos anos, há uma deficiência de novas tecnologias e de pesquisas ligadas à produção de leite ovino. O leite de ovelha é um produto caro, com nichos de mercados e com excelentes perspectivas de crescimento no Brasil. Este trabalho teve como finalidade estudar aspectos de etio-epidemiologia referentes às vias de transmissão de patógenos na mastite ovina, e os aspectos de produção leiteira em animais com ou sem mastite, durante toda lactação. O experimento foi realizado na área de Produção de Ovinos da Fazenda Edgárdia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu. Foram utilizadas 37 ovelhas em lactação, da raça Bergamácia, submetidas a ordenha mecânica diariamente, com manejo idêntico. Os animais foram acompanhados durante toda a lactação (8 semanas). Avaliou-se o índice de mastite através do Califórnia Mastitis Test (CMT) e o leite dos animais positivos foi realizada cultura microbiológica e também se realizou a cultura microbiológica na água utilizada para higienização das tetas e equipamentos de ordenha; nos insufladores (teteiras); nas mãos dos ordenhadores; no óstio das tetas e na

orofaringe dos respectivos cordeiros para correlacionar os achados microbiológicos encontrados nas diferentes situações, com os obtidos de amostras de leite dos animais, com mastites subclínicas e clínicas. Foi avaliada a produção de leite durante a lactação dos animais, correlacionando-se o índice da mastite e o estágio de lactação. O índice de CMT positivos (+, ++ e +++) durante as 8 semanas de lactação variou entre 1,35% e 8,1% das tetas. As culturas microbiológicas realizadas puderam indicar que o principal agente da mastite ovina neste rebanho foi o *Staphylococcus spp.* não concordando com os diversos trabalhos citados que afirmavam ser a *Manheimia haemolytica* o principal causador da mastite ovina. Não houve correlação significativa entre produção de leite X CMT x semana, $p = 0,85$ (produção de leite X CMT - $p = 0,38$ -; produção de leite X semana – $p = 0,70$). Para se ter certeza se os microrganismos encontrados nas culturas microbiológicas da água e swabs de mão, insufladores, orofaringe de cordeiros e esfíncter das tetas, são os mesmos agentes causais encontrados no diagnóstico da mastite deste trabalho, haveria necessidade de um estudo de biologia molecular.

Palavras-chave: Etio-epidemiologia; Leite; Mastite; Ovina; Produção

BOLSANELLO, R.X. Aspects of production and etio-epidemiology aspect which refers to the transmission pathways of sheep mastitis pathogenes. Botucatu, 2007, 90 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007. Universidade Estadual Paulista – “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

Sheep farms have been expanding on the last years in Brazil, from this on a bigger interests on milk production of this species starts to grow. Even in countries which milk production is a tradition for years, there are deficits of new technologies and researches on the subject. Sheep milk is a expensive product that shows excellent perspectives onto the brazilian market. The aim of this work is to study the etio-epidemiology aspect which refers to the transmission pathways of sheep mastitis pathogenes, during the lactation period. The research was realized in the sheepraising center of Edgardia farm, of the Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu. Thirty seven lactating sheeps were used, Bergamácia breed, under daily milking machines, all of them under similar management. The animals were followed during the lactation period (eight weeks). Evaluation of mastitis rates through the California Mastitis Test (CMT) and for positive milk samples microbiology culture were done on the milk samples and on the water used for hygiene of teat and milking equipments; insufflators; workers hands; teats ostium; and mouth of youngs to correlate to microbiologic findings during diferent situations, with the ones found from milk samples of animals, with clinical and subclinical mastitis. The milk

production was evaluated during lactation period, correlating the mastitis rates and the lactation stage. The rate of positive CMT (+, ++ and +++) through eight weeks of lactation varied between 1,35% and 8,1% on the teats. Microbiology cultures realized could indicate that the most common mastite agent in this flock of sheep was *Staphylococcus spp.* not agreeing with many other cited works that affirmed that *Mannheimia haemolytica* the most common sheep mastitis agent. There was not found a significative correlation between milk production x CMT x week, $p = 0.85$ (milk production x CMT - $p = 0.38$ -; milk production x semana - $p = 0.70$). To be sure that the microorganisms found in water cultures and hand swabs, insufflators, oropharynge of youngs and teats ostium, were the same agente found at mastitis diagnostic of this work, an molecular biology study would be needed.

Key words: epidemiology; milk; mastitis; sheep; production

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura sempre foi uma atividade importante no país, principalmente no Rio Grande do Sul, para a produção de lã. No Nordeste também sempre esteve presente como atividade de subsistência. Na última década, porém, houve uma elevação da participação relativa da carne, no contexto global da produção gaúcha, apesar de a lã manter-se em primeiro lugar. Ao longo dos anos, a ovinocultura foi se expandindo em áreas não tradicionais como São Paulo, Paraná, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais, notadamente com a finalidade de produção de carne (UNESP, 2004).

A produção de leite ovino é uma atividade relativamente nova em alguns países, tais como a Austrália e a Nova Zelândia, onde as informações sobre a criação de ovinos de leite são raras. Mesmo em países onde a produção deste leite é uma tradição de muitos anos, há deficiência de novas tecnologias e pesquisas científicas ligadas à sua produção, apesar de ser de conhecimento geral que apresenta características que permitem transformá-lo em produtos de elevado valor comercial, como queijos e iogurtes (Bencini & Pulina, 1997; Pugliese et al., 2000; Sá et al., 2005).

O leite ovino, entretanto, nunca foi devidamente explorado no Brasil. Numa comparação com o potencial de mercado com a carne ou a lã, ele está muito aquém, mas, por ser um produto nobre na fabricação de queijos finos, é um produto caro e de elevado valor de mercado. O Brasil tem nichos de mercado para esse tipo de produto, principalmente nos grandes centros urbanos, haja vista que importa queijo de ovelhas da Europa, particularmente da França, Espanha, Portugal, Grécia e Itália (UNESP, 2004).

Com o aumento da criação de ovinos no Brasil, tem-se observado que a mastite é um importante fator de perdas econômicas, podendo ser responsável por morte de cordeiros por inanição, descarte precoce e, ocasionalmente, morte de ovelhas. A mastite tem distribuição mundial, com maior incidência principalmente nas raças com aptidão leiteira, podendo, ainda, ter efeitos negativos sobre o ganho de peso, e a sobrevivência dos cordeiros também em raças de carne, o que aumenta o interesse por esta afecção. Outro aspecto a se enfatizar é a perspectiva de se conhecerem os aspectos etio-epidemiológicos quanto à manutenção e transmissão de agentes envolvidos nas mastites, no rebanho, durante toda a fase de lactação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO DE LEITE OVINO

Há necessidade de maiores estudos sobre a produção de leite de ovinos no Brasil, a produção média por animal e a qualidade do leite produzido. Valores observados na prática em alguns rebanhos da raça Santa Inês dão conta de que tais fêmeas são capazes de produzir aproximadamente 1.500g de leite por dia, como também alguns criadores de ovelhas da raça Bergamácia atestam que seus rebanhos apresentam ovelhas que superam os valores relatados acima. O que falta para a maior segurança seriam dados de levantamentos estatísticos, bem como trabalhos de pesquisas mais acurados, para fornecer indicadores mais confiáveis. No entanto, de forma superficial, é possível afirmar que no Brasil existe um potencial latente para a produção e processamento do leite ovino (Borges & Silva, 2004).

Hale & Coffey (2006) relatam que a produção de leite ovino é sazonal, com o período de lactação variando entre três e oito meses, dependendo da raça. A produção pode variar de 45 kg de leite em ovinos domésticos, ou em mais de 500 kg em raças especializadas na produção de leite. Cruzamentos entre raças comuns domésticas e especializadas têm sido realizadas, obtendo lactações entre 110 e 300 kg de leite.

2.2 MASTITE

A mastite é a infecção mais freqüente dos animais destinados à produção de leite e a que mais onera a pecuária leiteira. As perdas econômicas são causadas tanto na fazenda, pela diminuição da produção de leite, custo com mão-de-obra, honorários profissionais, medicamentos, morte ou descarte precoce de animais, quanto nos laticínios, pela queda na qualidade do produto

final e diminuição do rendimento industrial para fabricação dos seus derivados e pelas alterações na composição do leite mastítico (Langoni, 1999).

2.2.1 ETIO-EPIDEMIOLOGIA

Os principais agentes etiológicos de mastite foram convencionalmente agrupados quanto à sua origem e modo de transmissão em dois grupos: **microrganismos contagiosos**, transmitidos principalmente durante a ordenha, presentes principalmente no corpo do animal, e os chamados **microrganismos ambientais**, ubiqüitários, presentes no ar, cama, água e fezes. Estão classificados no primeiro grupo: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus sp.*, *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium bovis*. No segundo grupo: *Streptococcus uberis*, e os outros estreptococos à exceção dos acima citados, Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Serratia sp.* etc.), *Arcanobacterium pyogenes*, *Pseudomonas sp.*, e outros microrganismos ubiqüitários tais como fungos, principalmente leveduras e algas aclorofiladas, do gênero *Prototheca sp* (Costa, 1998).

Segundo Domingues & Leite (2005), as bactérias são os agentes isolados e identificados com maior freqüência em casos de mastite ovina, sendo os principais microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Mannheimia haemolytica*, *Streptococcus spp*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Staphylococcus coagulase negativos*, *Corynebacterium spp* e *Clostridium spp*. O *Staphylococcus aureus* e a *Mannheimia haemolytica*, isoladamente ou associados a outros microrganismos, representam 80% dos casos de mastite aguda (Jones, 1991). De modo geral, os *Staphylococcus coagulase negativos* e o *Corynebacterium*

spp são responsáveis pela maioria dos casos de mastite subclínica (Kirk et al., 1996; Lãs Heras et al., 1999).

De acordo com Vaz (1996), há duas situações distintas a serem consideradas. Na situação em que a ovelha está com o cordeiro ao pé, a presença de *Mannheimia haemolytica* na boca e faringe do cordeiro permite que a bactéria seja transmitida diretamente ao teto durante a amamentação; com o cordeiro afastado da ovelha, a importância relativa do *S. aureus* aumenta.

A ocorrência da mastite é favorecida pela presença de lesões no úbere, que são fatores predisponentes importantes. Acomete principalmente raças de aptidão leiteira (Domingues & Leite, 2005), sendo a incidência maior entre a terceira e quarta semana após o parto (Vaz, 1996), possivelmente relacionada com o pico de produção de leite (Domingues & Leite, 2005). Apesar de sua ocorrência ser maior no início e final da lactação, pode ocorrer em qualquer momento dela.

A mastite apresenta, basicamente, dois modelos epidemiológicos fundamentados no momento da infecção: as mastites de ordenha e a mastite de ambiente, divisão importante principalmente no que se refere à adoção de medidas de prevenção. A infecção da glândula mamária no caso da mastite de ordenha ocorre no momento da ordenha, enquanto a mastite de ambiente, no intervalo entre as ordenhas (Amaral, 1999).

Epidemiologicamente, vários fatores são relacionados à infecção do úbere causando mastite, podendo ser ambientais, como clima (temperatura, chuvas, binômio temperatura x umidade), aspectos socioeconômicos do ambiente e manejo inadequado de pastagens que favorecem a ocorrência de

lesões nas tetas dos animais; e fatores relacionados ao hospedeiro: idade, conformação do úbere, tamanho e diâmetro do teto, formato do teto, facilidade de ordenha, raças, alimentação e higiene e, por fim, fatores relacionados ao agente etiológico como: infectividade, patogenicidade, viabilidade e poder imunogênico (Amaral, 1999).

Peris et al. (2003) mostraram que, em ordenha mecânica, o levantamento da taxa da pulsação de 120 para 180 ciclos/minuto, com uma relação da pulsação de 50:50 e ordenhando um vácuo de 36 kPa, não teve nenhum efeito negativo na saúde do úbere ou edema da extremidade do teto. Além disso, na ausência de infecção intramamária, as duas taxas da pulsação não afetaram o CCS do leite.

2.2.2 PATOGENIA

O estabelecimento dos microrganismos na glândula mamária e o conseqüente desencadeamento do processo inflamatório apresentam a seguinte seqüência de eventos: penetração, instalação e multiplicação. Portanto, o estabelecimento de infecção por um determinado patógeno na glândula mamária depende de vários fatores ligados ao microrganismo, ao hospedeiro e ao meio ambiente (Costa, 1998).

Os fatores ligados aos microrganismos são os fatores de virulência (boa multiplicação no leite, habilidade de aderência ao epitélio, presença de cápsula e a presença de sideróforos). Relacionados ao hospedeiro estão os mecanismos de defesa (idade, características do úbere – tamanho, forma, tamanho das tetas e tonicidade dos ligamentos, integridade e perfeita oclusão do canal galactóforo, sanidade e nutrição do animal). Em se tratando de

ambiente, os fatores são condições ambientais, nutrição e funcionamento inadequado da ordenhadeira mecânica (Costa, 1998).

Segundo Brito (1999), após instalação na glândula mamária, o microrganismo se utiliza dos componentes do leite e se multiplica, atingindo números muito elevados, produzindo toxinas e outras substâncias que causam danos ao tecido mamário, atraindo leucócitos (células somáticas) do sangue para o leite, como mecanismo de defesa. Além dessas células, outras substâncias passam da corrente sangüínea para o leite, entre elas os íons sódio e cloro, que deixam o leite com sabor salgado, bem como enzimas que causam alterações na proteína e na gordura. Com essas lesões no tecido mamário, as células secretoras se tornam menos eficientes, isto é, com menor capacidade de produzir e secretar leite, causando assim um prejuízo na quantidade e qualidade do leite.

2.2.3 CLASSIFICAÇÃO E SINAIS CLÍNICOS

As infecções subclínicas caracterizam-se como sendo aquelas em que não ocorrem alterações visíveis no leite ou na glândula mamária, no entanto, há decréscimo na produção e alteração na sua composição, podendo-se isolar o microrganismo responsável pela infecção. Já a mastite clínica caracteriza-se pela aparência alterada do leite e sinais inflamatórios da glândula mamária. O quadro pode ser acompanhado por sinais sistêmicos como elevação da temperatura corporal, depressão, ou diminuição no consumo de alimentos. Assim, como na mastite subclínica, a produção de leite também declina e, com a presença das bactérias, ocorrem normalmente alterações significativas na composição do leite (Harmon, 1994).

A forma clínica pode ser aguda ou subaguda, com sintomatologia evidente do processo inflamatório, como edema, hiperemia, hipermetria e sensibilidade do úbere, além de alterações da secreção láctea, como leite aquoso, presença de grumos, sangue e secreção de aspecto purulento, ou crônica, quando se observa fibrose no tecido mamário (Costa, 1998). A forma subclínica tem sido considerada a mais problemática, pois se caracteriza pela ausência de sinais clínicos, o que dificulta a sua detecção e conseqüente intervenção terapêutica. Desta forma, pode permanecer no rebanho silenciosamente, sem alterações evidentes do úbere e da secreção láctea, embora apresente efeitos significativos na composição do leite (Blood & Radostits, 1991), e impacto negativo para a pecuária leiteira e no caso específico, para os ovinos.

Gross et al. (1978) e Kirk et al. (1980) chegaram a índices consideravelmente baixos de mastite subclínica, com valores de 10% e 13%, respectivamente, após análise de amostras de leite ovino.

2.2.4 DIAGNÓSTICO

Monardes (1995) cita que a mastite bovina pode ser diagnosticada quantitativamente pela detecção de hiperleucocitose no leite, pela contagem de células somáticas - CCS, por microscopia direta ou por contagem eletrônica ou, qualitativamente, pelo Califórnia Mastitis Test (CMT), Winsconsin Mastitis Test (WMT) e teste de Whiteside. Pode ser diagnosticada, também, por testes bacteriológicos; pela detecção de alteração na composição do leite ocasionada pelas mudanças na atividade secretória das células de leite; mudanças no leite

devido ao fluxo de íons do sangue para o leite (ex.: albumina do soro bovino) e mudanças na condutividade elétrica do leite, pelas alterações nas concentrações dos íons sódio e cloro. Porém, a mastite ovina ainda está sendo estudada quanto aos protocolos de métodos diagnósticos.

2.2.4.1 CALIFORNIA MASTITIS TEST

O Califonia Mastitis Test (CMT), desenvolvido e descrito por Schalm & Noorlander (1957), é considerado um dos métodos mais simples e eficaz no diagnóstico e estima a contagem de células somáticas pela viscosidade e alteração de cor do indicador utilizado no teste.

Algumas pesquisas relatam que o CMT, usado no campo para detectar infecções intramamárias em ovelhas, é menos seguro e demonstram que a capacidade do CMT em prever as infecções intramamárias em ovinos depende da prevalência e dos agentes presentes no rebanho (Hueston et al., 1986; Keisler et al., 1992). Quanto à utilização, o CMT é considerado um teste subjetivo para ovinos, razão pela qual a padronização do teste é feita para o leite bovino sendo mais acurado nesta espécie (Green, 1984 e Maisi et al., 1987).

Domingues et al. (2005) analisaram 128 amostras de leite de ovelhas Santa Inês, onde verificaram que há uma alta frequência de mastite e que os testes de CMT e Whistleside foram menos sensíveis quando comparados com a prova microbiológica.

2.2.4.2 DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO

O diagnóstico etiológico pode ser realizado pelo cultivo bacteriológico do leite em placas de Petri contendo meios de cultura como ágar-sangue e ágar-MacConkey, incubando-se a 37° e realizando a leitura das placas às 24, 48 e 72 horas. A amostra de leite para cultivo deve ser colhida assepticamente, em frascos esterilizados, após prévia higienização e desinfecção do óstio do teto com álcool a 70% (Krieg & Holt (1984); Carter & Cole Junior (1990); Quinn et al. (1994).

3 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo o estudo etio-epidemiológico da mastite ovina e produção leiteira, em ovelhas da raça Bergamácia durante toda a lactação, de animais de propriedade da Fazenda Edgárdia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ – UNESP, campus de Botucatu – SP, com a finalidade de:

- Avaliar os possíveis mecanismos de transmissão de patógenos nas mastites ovinas.
- Verificar a microbiota presente na água utilizada para higienização das tetas e equipamentos de ordenha; nos insufladores (teteiras); nas mãos dos ordenhadores; no óstio das tetas e na boca dos respectivos cordeiros.
- Correlacionar os achados microbiológicos encontrados nas diferentes situações, com os obtidos de amostras de leite dos animais.
- Avaliar a produção de leite durante a lactação dos animais, correlacionando o índice da mastite e do estágio de lactação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

O experimento foi realizado na área de Produção de Ovinos da Fazenda Edgárdia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu. Foram utilizadas 37 ovelhas em lactação, da raça Bergamácia, submetidas a ordenha mecânica diariamente, previamente à ordenha era feito o pré-dipping em solução de 1% de iodo. Recebiam arraçoamento durante a ordenha, e após isso passavam o dia com os cordeiros. Os animais foram acompanhados durante toda a lactação, que durou 8 semanas (agosto a outubro de 2005), sendo os cordeiros amamentados até a 5ª semana, quando, então, houve o desmame.



Figura 1. Ovelhas da raça Bergamácia na Fazenda Edgárdia, Botucatu-SP, 2005.

4.2 DIAGNÓSTICO DA MASTITE

As 482 amostras foram diagnosticadas quanto à mastite subclínica mediante o uso do California Mastitis Test (CMT), considerando-se as glândulas mamárias positivas com escores 1+, 2+ e 3+. O CMT é usado mundialmente para o diagnóstico da mastite subclínica, tendo a vantagem de poder ser empregado no próprio rebanho, no momento em que os animais são ordenhados. A interpretação do teste se baseia na observação visual do leite após ser misturado ao reagente. A reação se processa entre o reagente e o material genético das células somáticas presentes no leite, formando um gel, cuja concentração é proporcional ao número de células somáticas. (Schalm & Noorlander, 1957; Brito et al. 1997).



Figura 2. Realização do exame de CMT nas ovelhas da raça Bergamácia na fazenda Edgárdia, Botucatu-SP, 2005.

4.3 COLHEITA DAS AMOSTRAS

Para o procedimento de colheita das amostras de leite, os tetos foram lavados previamente com água e secados com toalha de papel descartável. A seguir, foi realizada a anti-sepsia do óstio da teta, com álcool a 70%, e as amostras de leite, colhidas em tubos de vidro estéreis, desprezando-se os três primeiros jatos de leite.

Foram também colhidas amostras da água utilizada para higienização das tetas e equipamento de ordenha (colhidas em tubos de vidro estéreis) e utilizados *swabs*, friccionando-se no óstio das tetas (dos animais com CMT positivo); nos insufladores (antes e depois da ordenha); e nas mãos do(s) ordenhador(e)s e orofaringe dos cordeiros (cujas mães forem positivas ao CMT). Imediatamente após a coleta do material, em cada situação, os *swabs* foram mantidos em tubos de vidro contendo meio de Agar Stuart, como meio de transporte.

As amostras, sob refrigeração, contendo gelo reciclável e processadas de acordo com os objetivos do presente estudo, foram encaminhadas, em caixa isotérmica, ao laboratório do Núcleo de Pesquisas em Mastites - NUPEMAS, do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu.



Figura 3. Colheita de amostras de leite das ovelhas da raça Bergamácia, Fazenda Edgárdia, Botucatu-SP, 2005.

4.4 DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO

No laboratório, foram realizados cultivos microbiológicos com 0,01 mL de leite e água utilizada para higienização das tetas e equipamento de ordenha, e inoculação do material colhido em *swab*, em placas de Petri, contendo meios de ágar-sangue ovino a 5% e MacConkey, incubando-se a 37°C. Realizaram-se as leituras das placas às 24, 48 e 72 horas, observando-se a morfologia das colônias e, a seguir, preparadas lâminas com esfregaços corados pelo método de Gram, para verificar-se, ao microscópio ótico, a morfologia bacteriana e sua característica morfotintorial. Os microrganismos foram repicados para meio de caldo cérebro-coração (BHI) para realização das

provas taxonômicas, segundo Krieg & Holt (1984); Carter & Cole Junior (1990); Quinn et al. (1994).



Figura 4. Cultivo do leite em placas de Petri contendo ágar sangue ovino 5% e ágar MacConkey, no NUPEMAS, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu-SP, 2005.

4.5 PRODUÇÃO DE LEITE

Semanalmente, a produção de leite de todas as ovelhas, saudáveis e com mastite, foi pesada, a fim de se estabelecer a influência do estágio de lactação e da mastite na quantidade de leite produzido.



Figura 5. Produção de leite de ovelhas da raça Bergamãcia da Fazenda Edgárdia, Botucatu-SP, 2005.



Figura 6. Sistema de ordenha da Fazenda Edgárdia, Botucatu-SP, 2005

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação estatística dos dados de produção foi realizada utilizando-se o procedimento GLIMMIX do programa SAS (SAS, 2002) através da análise de variância (ANOVA). Os dados foram avaliados como *design* completamente randomizado, considerando-se medidas repetitivas como *design* de tratamento.

Utilizou-se o modelo experimental $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_k + (\alpha\beta)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$ considerando Y_{ijk} como valor obtido na semana k sob influência ou não de mastite i , μ media total, α_i valor adicional determinado pela presença ou não de mastite i , β_k valor adicional determinado pela influência da semana k , $(\alpha\beta)_{ik}$ valor adicional da interação mastite i x semana k e ε_{ijk} o erro total do experimento. Considerou-se presença de mastite em úberes com ao menos um teto escore +1.

De acordo com o *design* de tratamento, o padrão de covariância que melhor se encaixou no modelo experimental foi o de primeira ordem antedependente (ANTE 1) por apresentar menores valores de critérios de informação Akaike e Bayesian (AIC e BIC respectivamente). Utilizou-se também o denominador de aproximação de grau de liberdade Kenward-Roger e, quando a ANOVA se apresentou significativa ($P \leq 0.05$), as médias foram separadas, usando-se as funções LSMEANS, DIFF e LINES. Para a interação, as médias foram separadas, usando-se as funções LSMEANS, SLICE e SLICEDIFF.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO DE LEITE X CMT X SEMANA

A média de produção das ovelhas presentes no experimento foi de 421,97g, perfazendo, no total da lactação de 60 dias, a produção de 25,318kg por animal.

Tabela 1. Médias de produção de leite (gramas/dia) e resultados do *California Mastitis Test* em porcentagem do número de tetas negativas e positivos, durante o período de 8 semanas de lactação, de ovelhas da raça Bergamácia.

Semanas	Produção g/dia	Neg (%)	Pos. (%)	+ (%)	++ (%)	+++ (%)
1 ^a	343.75	95,95	4,05	1,35	2,7	0
2 ^a	476.18	97,3	2,7	0	1,35	1,35
3 ^a	419.51	91,9	8,1	1,35	2,7	4,05
4 ^a	466.27	97,3	2,7	2,7	0	0
5 ^a	401.35	98,65	1,35	0	0	1,35
6 ^a	471.41	97,3	2,7	1,35	1,35	0
7 ^a	401.35	97,3	2,7	0	2,7	0
8 ^a	395.95	95,95	4,05	0	1,35	2,7

Não houve influência da semana de lactação ($p = 0,70$), do CMT ($p = 0,38$) e de ambos ($p = 0,85$) na produção de leite (trabalhou-se com $p < 0,05$, para significância). Porém, mesmo não obtendo resultados significantes do ponto estatístico, pôde-se verificar (ver tabela 1), que houve sim algumas influências, como, por exemplo, na 5^a semana, quando ocorreu o desmame dos cordeiros, registrou-se uma menor produção de leite, provavelmente pelo estresse e retenção do leite das ovelhas, e na 3^a semana, quando houve um

decréscimo na produção também, podendo ser explicado por ter um percentual maior de tetas com CMT positivo.

Cardellino & Benson (2002), utilizando animais tricross (Rambouillet, Suffolk, e Dorset), observaram uma produção de 2,56 kg por dia, durante 63 dias de lactação, demonstrando serem esses animais mais bem adaptados à produção leiteira e também por estarem, há muitos anos, investindo na produção de leite ovino.

Reynolds & Brown (1991), em um experimento com 24 ovelhas cruzadas (Rambouillet x Finn-Dorset), chegaram a uma média de produção de 477g por dia, durante 60 dias, maior que as ovelhas usadas neste estudo.

Jarvis (1997) afirma que ovelhas de boa produção podem chegar a uma média de produção diária em torno de um quilo de leite, mas, para que um plantel possa se manter economicamente viável, deve-se produzir uma média de 680 gramas de leite/dia/ovelha. Para se obter maior produtividade, deve-se fazer uma boa seleção dos animais mais produtivos, dóceis e com aptidão para produção de leite, mostrando que há necessidade de maior produção nas ovelhas deste estudo.

Lafi (2005), em trabalho conduzido em 1.210 ovelhas da raça Awassi na Jordânia, tentou correlacionar o CMT com as infecções intramamárias, porém não conseguiu chegar a resultados significantes estatisticamente, sugerindo mais trabalhos com esse assunto.

Gonzáles-Rodríguez & Cármenes (1995), em um trabalho conduzido com 683 ovelhas de 3 raças, mediram a confiabilidade do CMT em frente à CCS e à cultura microbiológica e obtiveram uma maior acurácia (89,6%), em relação à CCS e à cultura microbiológica.

Fthenakis (1995), utilizando 1.008 ovelhas saudáveis em lactação, coletou amostras e utilizou CMT, CCS, WMT e cultura bacteriológica, e chegou à conclusão de que o CMT 1+ pode ser utilizado como diagnóstico da mastite subclínica, uma vez que obteve acurácia de 93%.

Segundo Runge (1991), apud Amaral (1999), durante os períodos de mudanças fisiológicas marcantes: da ordenha para o período seco; do período seco para o início da lactação e no pico da lactação, há um aumento do risco da doença, concordando com o trabalho, exceto no pico de lactação, onde se obteve o menor número de tetas positivas ao exame do CMT.

Shanks et al. (1981), apud Amaral (1999), afirmam que os fatores que contribuem para maior susceptibilidade da glândula mamária são: edema fisiológico, baixo grau de queratinização, grande perda de queratina, tempo não suficiente para queratinização do canal do teto e pressão intramamária relativamente alta; já no período seco, a glândula mamária fica susceptível pela contínua exposição do teto aos agentes ambientais, ausência de desinfecção pré e pós-ordenha, eliminação do efeito mecânico da saída do leite e não-formação do selo de queratina.

Sandholm & Korhonen (1995), apud Amaral (1999), citam que no pico de lactação a grande quantidade de leite produzido dilui os fatores de proteção da glândula mamária, em especial: lactoferrinas, leucócitos polimorfonucleares, anticorpos e lactoperoxidase, o que não se observa neste trabalho em que, no pico da lactação, houve uma menor taxa de CMT positivos.

Em raros e específicos casos, em alguns rebanhos, é verificada uma incidência maior de CMT positivo no período de secagem (final da

lactação) ou durante a amamentação, nesses casos, há uma relação direta com más práticas de higiene ou contaminação ambiental (Bergonier et al., 1997; Las Heras et al., 2000; Leitner et al., 2001).

5.2 MICROBIOLÓGICO

Apesar de os *Bacillus spp.* terem sido isolados em praticamente todos os diagnósticos microbiológicos realizados, eles não serão foco de discussão, uma vez que podem ser considerados contaminantes no processo de cultura e ter baixa importância para a mastite.

Bacillus spp. é uma bactéria ubiqüitária, presente em todos os locais, porém raramente causa infecção nos úberes e sua importância para mastite é praticamente nenhuma (NMC, 2000).

5.2.1 LEITE

Os microrganismos mais comumente encontrados foram: *Staphylococcus spp.*, correspondendo a 61,11%, seguidamente de *Streptococcus spp.* (16,66%), *Bacillus spp.* (13,89%), *Corynebacterium spp.* (5,56%) e *Serratia spp.* (2,78%), como pode ser observado na Figura 7.

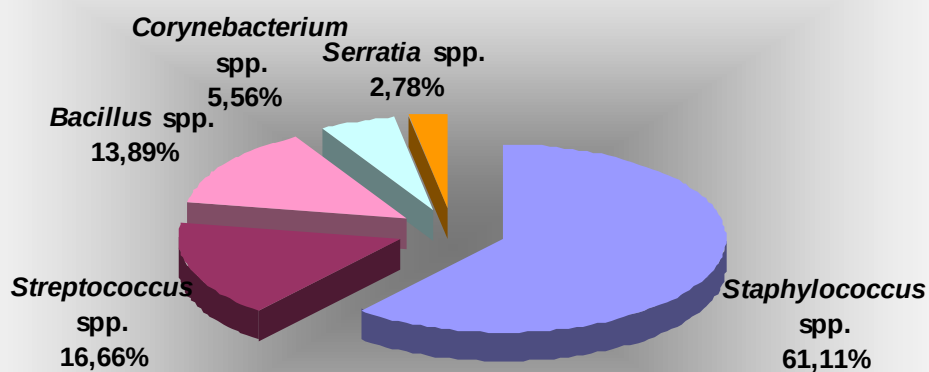


Figura 7. Prevalência (%) de agentes isolados do leite de ovelhas da raça Bergamácia, considerando-se o período de oito semanas de estudo.

Pôde-se verificar, ainda, de acordo com a dinâmica dos patógenos, um maior acometimento da glândula mamária na terceira e quarta semana, com predomínio, dentre os agentes envolvidos, de 62,5% e 58,3% de *Staphylococcus* spp., respectivamente. Na quinta e sétima coletas houve acometimento exclusivo por *Staphylococcus* spp. (100%) como pode ser observado na Figura 8.

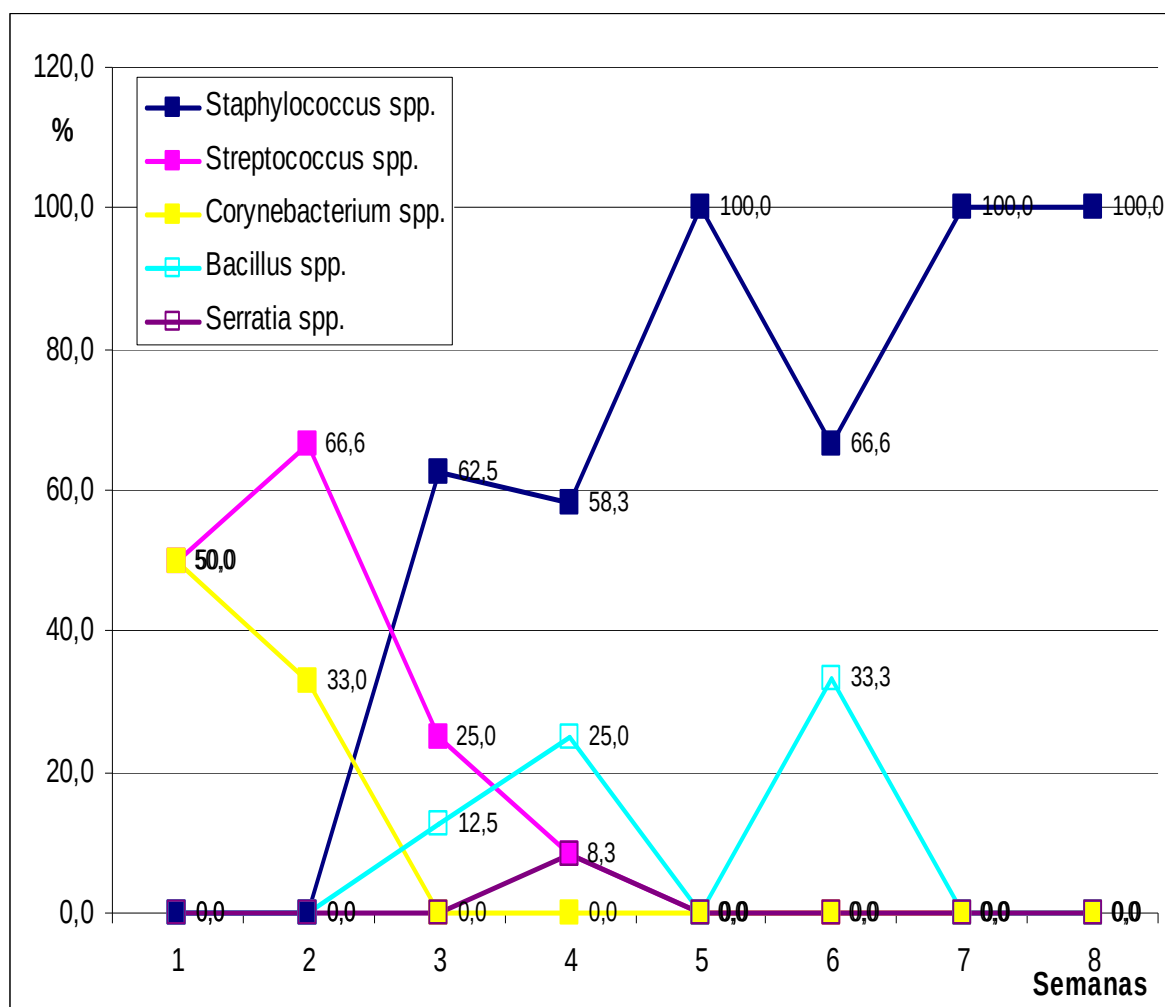


Figura 8. Dinâmica da distribuição (%) dos agentes isolados do leite de ovelhas da raça Bergamácia, considerando-se o período de oito semanas de estudo.

Staphylococcus spp. também foi o que teve maior prevalência no trabalho realizado por Ariznabarreta et al. (2002) com 78,9%, seguido de *Corynebacterium bovis* (11,2%), *Streptococcus* spp. (3,1%), Enterobactérias (2,9%) e *Micrococcus* spp. (1,4%).

El-Massanat et al. (1991), Scott & Jones (1998) e Winter (2001) afirmam que agentes etiológicos mais freqüentemente associados à infecção da glândula mamária de ovelhas *S. aureus* e *Manheimia haemolytica* são responsáveis, isoladamente ou em associação, por 80% dos casos de mastite, porém, neste trabalho, não se obteve isolamento de *Manheimia haemolytica*, indo ao encontro do trabalho de Lucheis et al (2005) que, pela análise microbiológica de amostras de leite de ovelhas da raça Bergamácia, determinaram a freqüência de mastite ovina na presença de cordeiros e em ovelhas sem cordeiros. Na presença de cordeiros lactentes, 20,25% das amostras examinadas mostraram-se positivas com o isolamento de *Staphylococcus coagulase* positivo (14,06%), *Staphylococcus coagulase* negativo (71,87%), *Streptococcus spp* (3,13%) e *Bacillus spp* (10,94%). Das amostras provenientes de ovelhas que não estavam amamentando, 12,9% revelaram crescimento de microrganismos, como *Staphylococcus coagulase* positivo (5,40%), *Staphylococcus coagulase* negativo (78,4%), *Streptococcus spp* (8,10%), *Corynebacterium spp* (2,70%) e *Micrococcus spp* (2,70%).

Segundo Bergonier & Berthelot (2003), a incidência da mastite em ovelhas de leite varia de acordo com o estágio e lactação, sendo observadas taxas maiores no início da lactação, tendo como o principal agente o *Staphylococcus spp.*, com que concorda este trabalho.

Na tabela 2 são apresentados alguns trabalhos sobre a etiologia da mastite ovina, observando-se em todos a predominância do *Staphylococcus spp.* como agente principal. Isso comprova os números apresentados neste experimento, demonstrando que se deve ter um bom controle sobre os agentes contagiosos, principalmente.

Tabela 2. Agentes etiológicos isolados da mastite ovina (%), considerando-se diversos estudos realizados por diferentes autores.

Autor. Ano	País	Ovelhas	Ordenha *	Amostras (n)	Staphylococco	Streptococco	E. coli	M. haemolytica	Corynebacterium	Outros
Marco Melero, 1994	Espanha	45	Ma e Me	48	48,6	17,1		11,4		22,9
Lafi et al., 1998	Jordânia	1736		145	40,7	8,5	18,6	3,4		28,8
De La Cruz et al., 1994	Espanha	466		932	83,2	1,5			0,5	14,8
Fthenakis, 1994	Grécia	760	Ma		57,6	9	9			24
Mavrogenis et al., 1995	Chipre	100		1066	88		8		1	3
Gonzáles-Rodríguez et al. 1995	Espanha	734	Ma e Me	1382	73,9	16,2	0,4			9,5
Stefanakis et al., 1995	Grécia	99		198	77	10			3	10
Cossedu et al., 1996	Itália	205	Ma e Me	410	71	4				4
Las Heras at al., 1999	Espanha	564	Ma e Me	1128	71,8	13,5			10,1	4,6

* Ma: Ordenha Manual

Me: Ordenha Mecânica

5.2.2 ESFÍNCTER DAS TETAS

Nas análises microbiológicas do swab do esfíncter das tetas observou-se isolamento de 93 bactérias em 55 amostras, sendo uma prevalência maior de *Bacillus* spp. (n=45 / 48,4%), seguidos de *Staphylococcus* sp. (n=19 / 20,43%), *Corynebacterium bovis* (n=11 / 11,82%) e *Streptococcus* spp. (n= 9 / 9,67%).

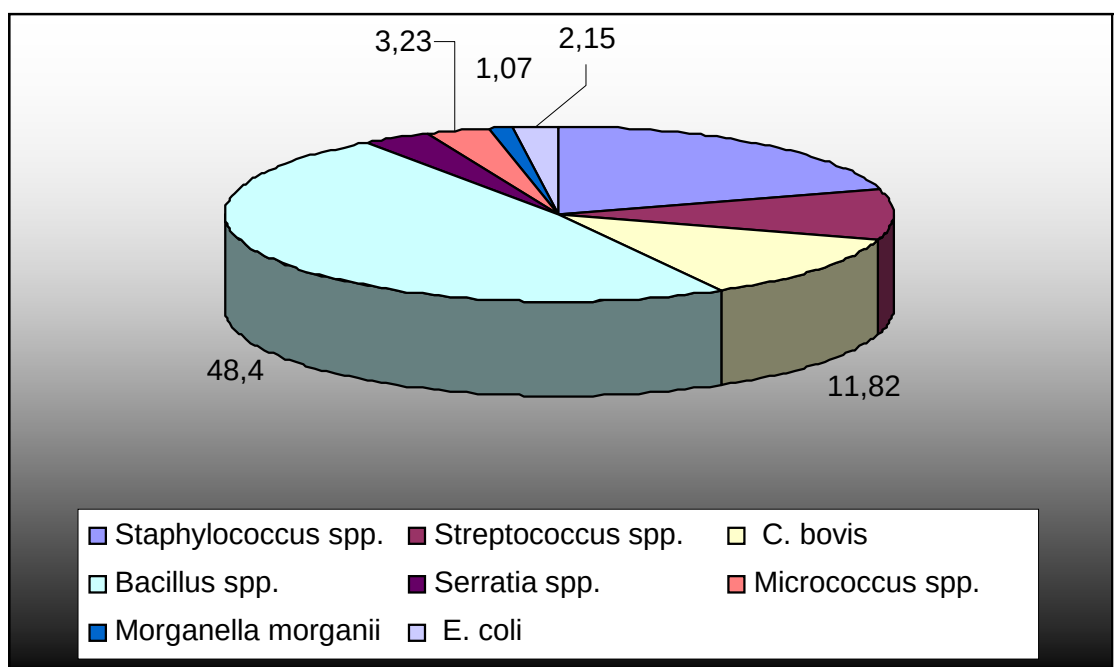


Figura 9. Prevalência (%) dos agentes isolados a partir do swab dos esfíncteres das tetas

Na dinâmica dos agentes isolados na cultura das amostras de esfíncter de tetas durante as 8 semanas de lactação, puderam ser observados alguns pontos importantes como a predominância do *Streptococcus* spp. e do *Corynebacterium bovis* na 2ª semana (ambos com totalidade dos agentes encontrados), e o *Staphylococcus* spp. que em todas

semanas (exceto a segunda), esteve presente no isolamento dos agentes, e a predominância de *Bacillus* spp. com alta prevalência nas 8 semanas (exceto na 2ª), como se pode observar na figura 10:

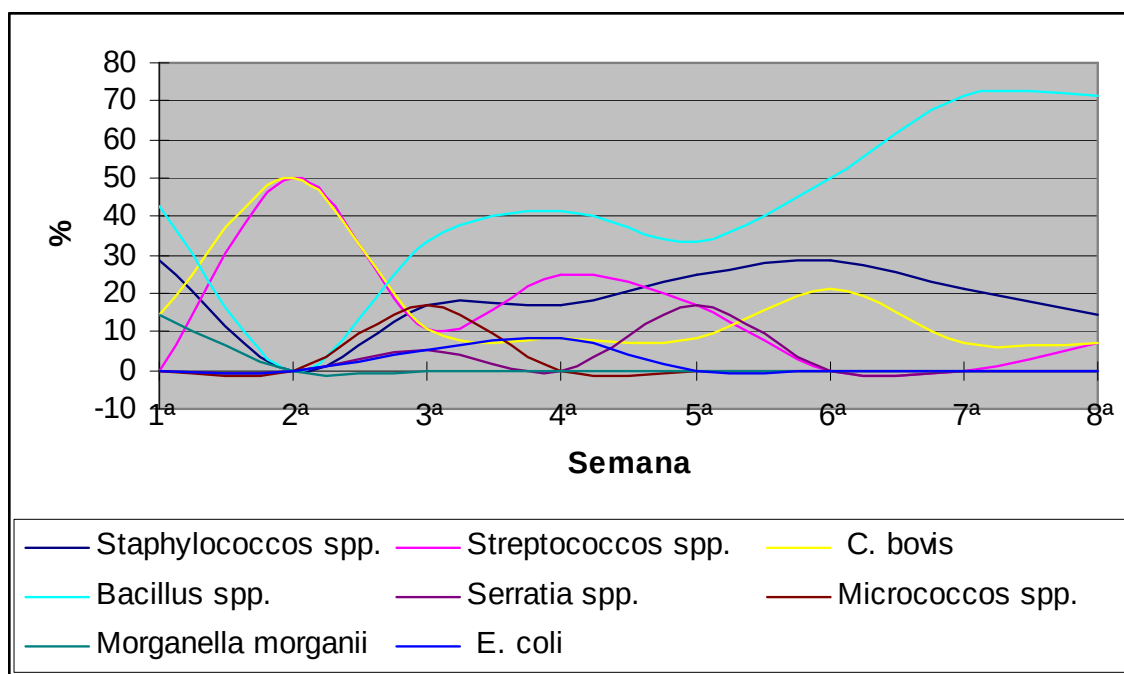


Figura 10. Dinâmica da distribuição dos agentes isolados das amostras colhidas de esfíncter de tetas, durante as 8 semanas de lactação.

A principal fonte dos *Staphylococcus* spp. são as infecções clínicas e subclínicas de úberes ou tetas infectadas devido a lesões. Porém os *Staphylococcus* spp., incluindo o *Staphylococcus aureus*, também estão presentes em tetas íntegras, variando a prevalência de acordo com rebanho (Scott & Murphy, 1997)

5.2.3 INSUFLADORES

O isolamento das amostras provenientes dos insufladores da ordenhadeira mecânica demonstrou uma maior prevalência de *Bacillus* spp. (n=21 / 30,9 %) e de *Staphylococcus* spp. (n=17 / 25%), do total das amostras isoladas (n=68).

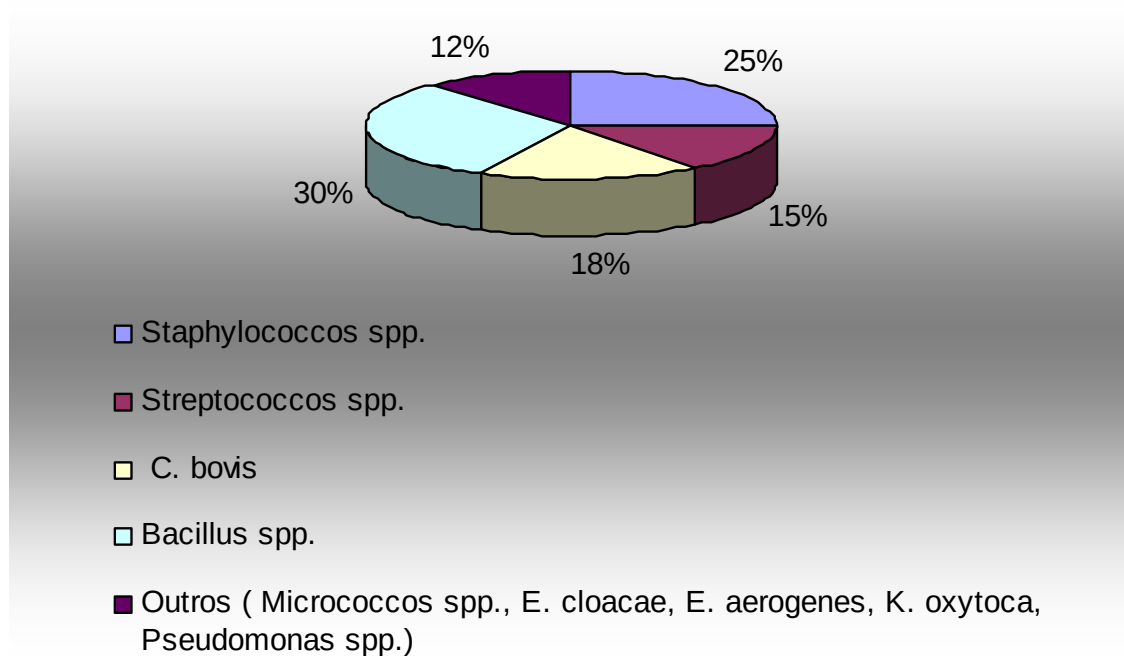


Figura 11. Prevalência (%) dos agentes isolados a partir das amostras colhidas de insufladores da ordenhadeira mecânica.

Um ponto a se observar na figura 6 sobre a dinâmica dos agentes isolados dos insufladores durante as 8 semanas de lactação é a alta prevalência de *Bacillus* spp. e *Staphylococcus* spp. durante toda a lactação, e na 1ª semana uma alta prevalência de enterobactérias, como a *Enterobacter*

cloacae, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes* e *Pseudomonas spp.*, possivelmente pelo sistema de ordenha estar parado.

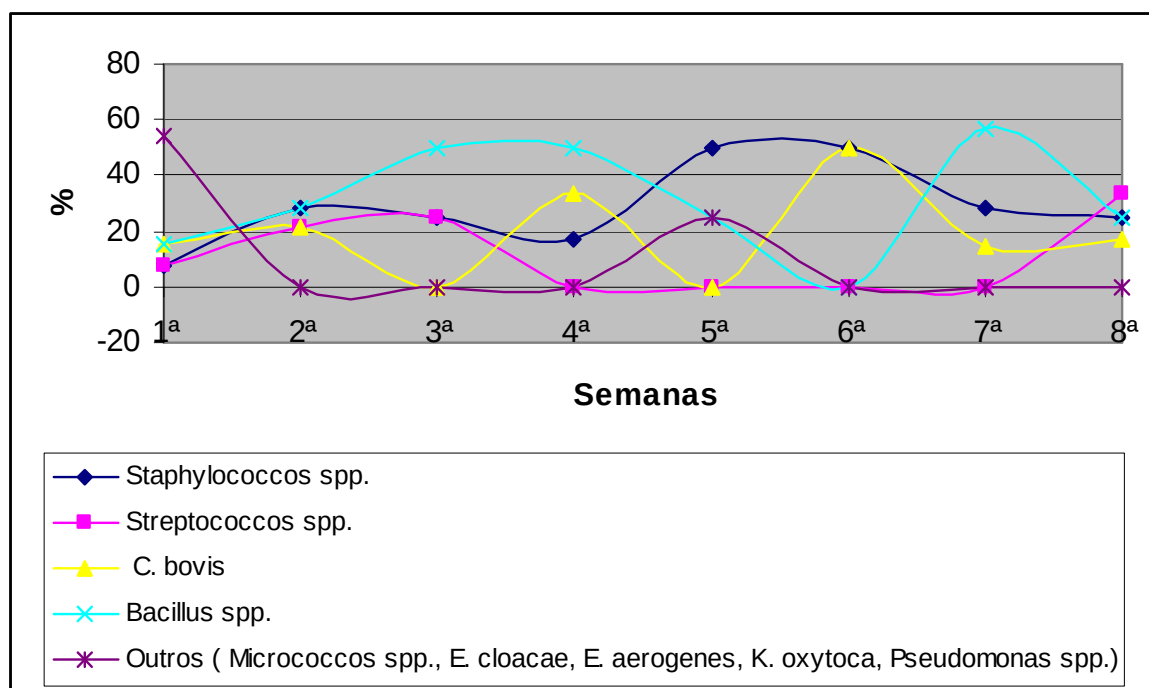


Figura 12. Dinâmica da distribuição dos agentes isolados das amostras colhidas dos insufladores, durante as 8 semanas de lactação

Os resultados concordam com Ziluga et al. (1998) e Burriel (1998) os quais afirmam que os acessórios são fontes de contaminação transitória. E o não- uso correto de ordenha mecânica em linha é um grande potencial para contaminação dos tetos por *Staphylococcus spp.* como aconteceu nesse experimento, onde houve presença de *Staphylococcus spp.* durante todas semanas.

As pesquisas desenvolvidas por Plommet (1974), Jones (1985) e Bergonier et al. (1997) comprovam os resultados observados, uma vez que

afirmam que há uma persistência das bactérias em equipamentos de ordenha com pouca higiene e manutenção e também o *design* da ordenha que possa impedir o manejo correto. A umidade do insuflador pode favorecer a multiplicação de *Staphylococcus spp.* em sua parede e também o crescimento de fungos. Afirmam ainda que, mesmo com a higienização correta da ordenhadeira, pode persistir a presença de *Pseudomonas spp.*

5.2.4 MÃOS DOS ORDENHADORES

Bacillus spp. e *Staphylococcus spp.* apresentaram uma maior prevalência nos isolamentos bacterianos das mãos dos ordenhadores, de um total de 39 isolamentos, eles tiveram respectivamente 15 (38,46%) e 12 (30,77%), como demonstra a figura 13:

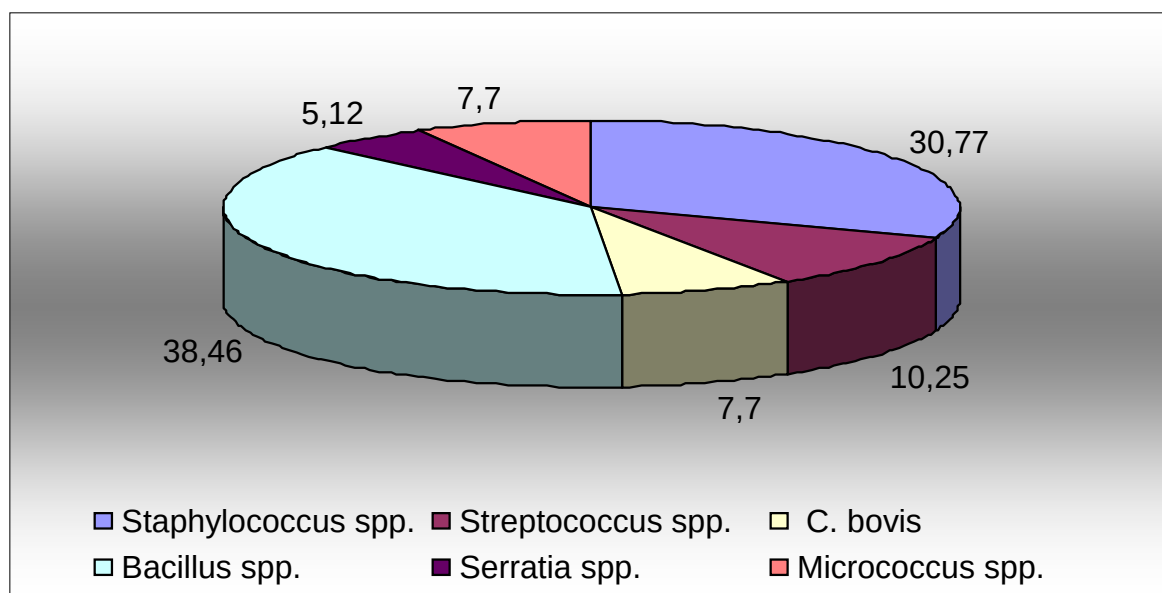


Figura 13. Prevalência (%) dos agentes isolados a partir das amostras colhidas das mãos dos ordenhadores.

Pode-se observar na figura 8 que até a 3ª semana houve uma alta prevalência de *Micrococcus* spp., *Corynebacterium bovis* e *Streptococcus* spp., a partir daí predominaram *Staphylococcus* spp. e *Bacillus* spp., o que concorda com os isolamentos bacterianos do leite neste trabalho, pois nas 3 primeiras semanas, também houve um maior isolamento de *Corynebacterium bovis* e *Streptococcus* spp. e nas outras semanas um predomínio do *Staphylococcus* spp. confirmando ser a mão do ordenhador uma importante via de contaminação do leite.

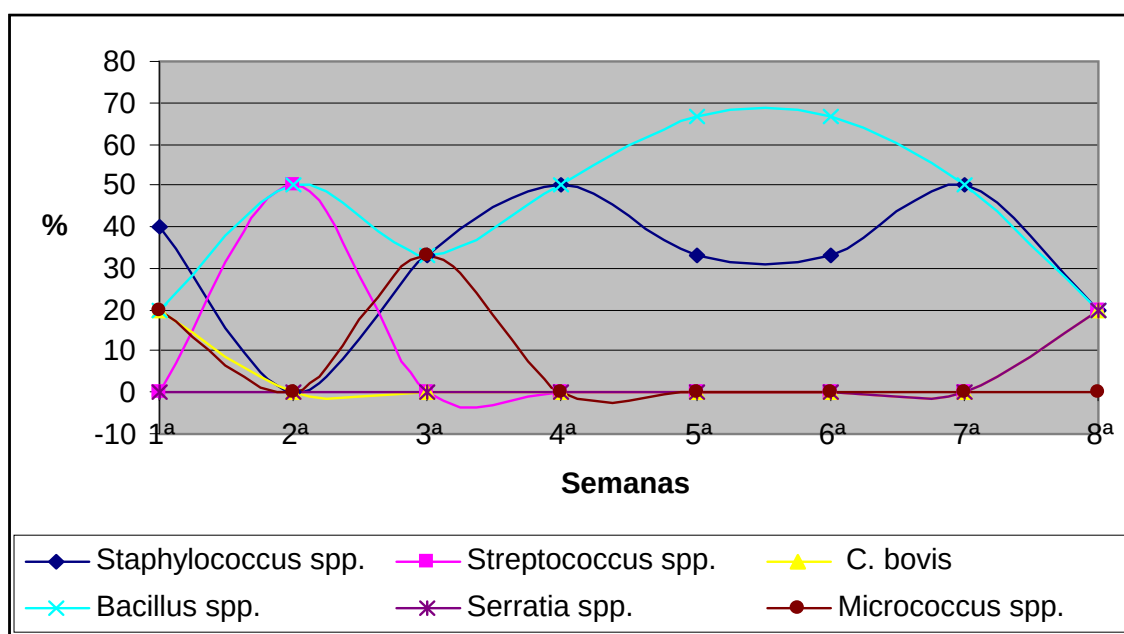


Figura 14. Dinâmica da distribuição dos agentes isolados das amostras colhidas das mãos dos ordenhadores, durante as 8 semanas de lactação.

Dentre os microrganismos Gram positivos, os *Staphylococcus* spp. destacam-se como importante grupo, cuja presença se faz observar, sobretudo na pele e mucosas do homem, estendendo-se, de forma generalizada, a animais de sangue quente (Kloos, 1980; Kloss & Schleifer,

1986). Ainda que possam colonizar-se em diferentes regiões do organismo, existe um consenso de que os maiores reservatórios para *S. aureus* sejam as fossas nasais. A presença na mão e em outras superfícies resulta de vínculo epidemiológico decorrente de disseminação a partir dos principais sítios (RADDI et al., 1988), comprovando os achados deste trabalho.

Nos isolamentos, quanto à sua importância para a mastite, houve crescimento de *Staphylococcus spp.*, condizente ao que afirma Santos (2003), segundo o qual, muito embora o principal reservatório de *S. aureus* seja a glândula mamária, este microrganismo pode ser encontrado em diversos locais no próprio animal ou nas mãos de ordenhadores.

O *Streptococcus agalactiae* é um agente contagioso, sendo transmitido principalmente pelas teteiras e pelas mãos dos ordenhadores e de maneira menos importante por qualquer superfície contaminada com leite de animais infectados; a ordenha é o momento oportuno para que essa bactéria seja transmitida de um animal doente para um animal sadio (Mendonça & Molina, 2007).

5.2.5 OROFARINGE DOS CORDEIROS

Quanto às amostras de *swab* de orofaringe dos cordeiros, obteve-se o crescimento de diferentes bactérias, havendo um equilíbrio entre elas, como se pode verificar na figura 15.

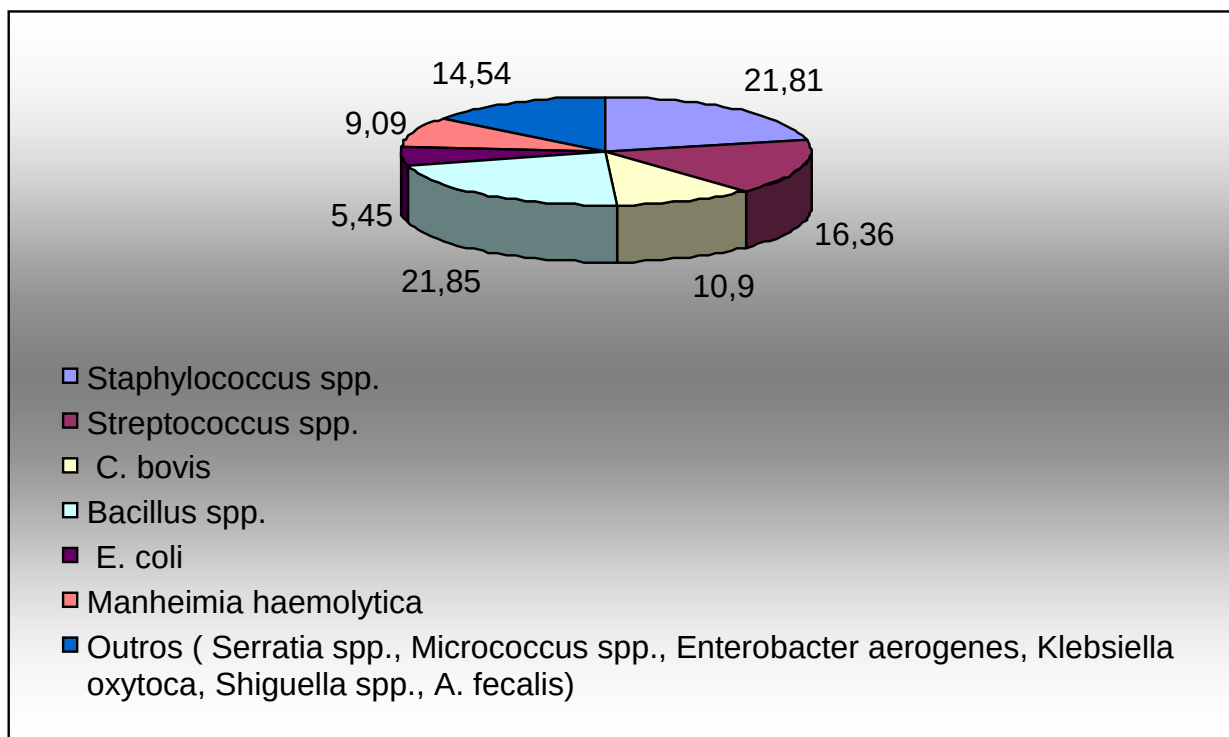


Figura 15. Prevalência (%) dos agentes isolados a partir das amostras colhidas da região orofaríngea de cordeiros.

A figura 16 permite avaliar que na 3ª. semana se obteve um maior crescimento de bactérias e que o *Bacillus* spp, *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., mantiveram sua frequência de isolamentos durante a lactação.

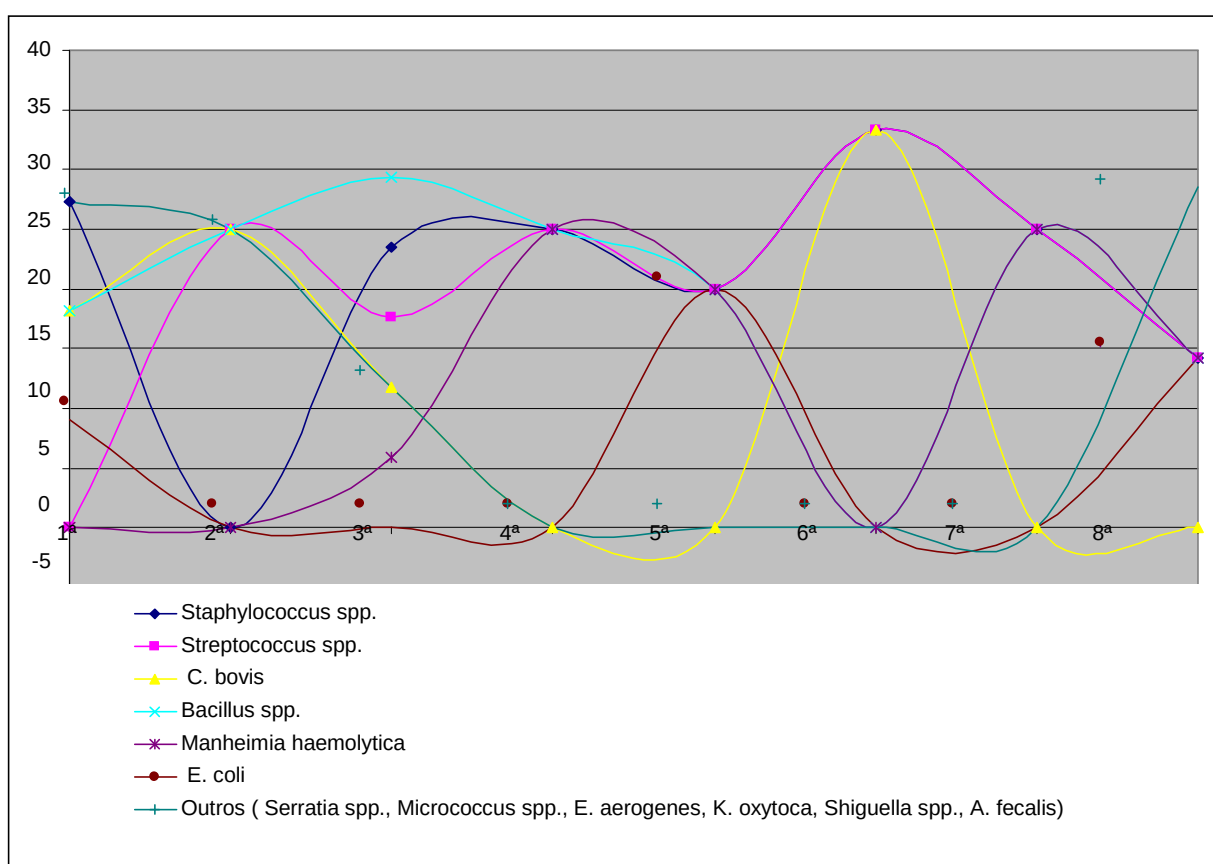


Figura 16. Dinâmica da distribuição dos agentes isolados das amostras colhidas da região orofaríngea dos cordeiros, durante as 8 semanas de lactação

Segundo Ziluga et al. (1998), o principal agente encontrado na orofaringe de cordeiros seria a *Manheimia haemolytica*, concordando em parte com o trabalho, uma vez que outras quatro bactérias foram mais isoladas que ela.

Vaz (1996) também afirma a importância da *Manheimia haemolytica* quando a ovelha está com o cordeiro ao pé, porque a presença de *Manheimia haemolytica* na boca e faringe do cordeiro permite que a bactéria seja transmitida diretamente às tetas durante a amamentação, o que não foi observado neste estudo.

Os achados também puderam sugerir que a orofaringe de cordeiro também seria uma via de transmissão de outras bactérias, além da *Manheimia haemolytica*, uma vez que foram isoladas bactérias que também foram identificadas na cultura do leite.

5.2.6 ÁGUA

Observa-se na figura 17 que houve pouco crescimento de microrganismos provenientes do cultivo da água, crescendo *Staphylococcus* spp, *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp. e *Streptococcus* spp.

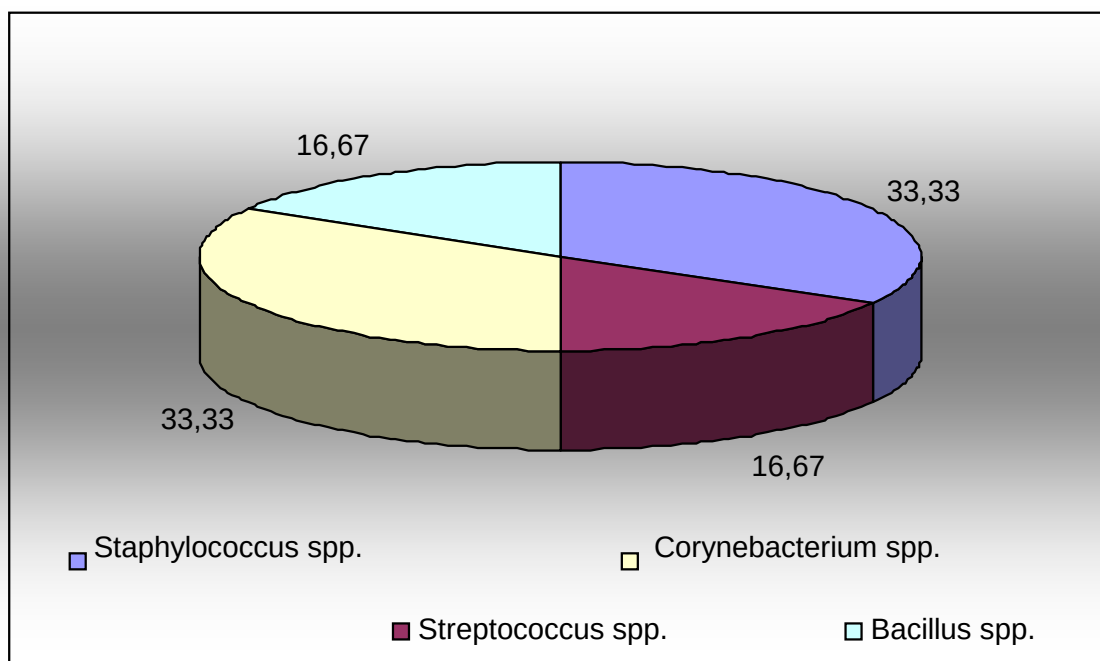


Figura 17. Prevalência (%) dos agentes isolados a partir das amostras de água utilizada no sistema de ordenha.

Quando se observa o gráfico da dinâmica dos microrganismos isolados destas amostras de água, verifica-se que apresentam maior número de crescimento até a 3^a semana da lactação dos animais.

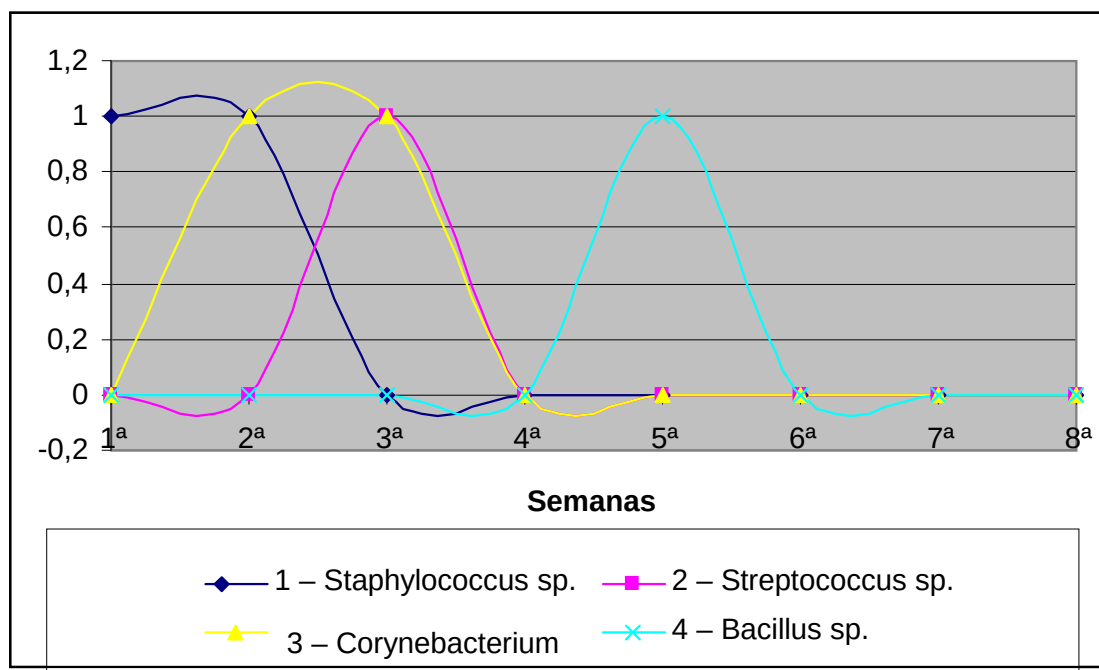


Figura 18. Dinâmica da distribuição dos agentes isolados das amostras de água da ordenha, durante as 8 semanas de lactação

Provavelmente o aparecimento de agentes como *Bacillus spp* e *Corynebacterium spp.* foi provavelmente por contaminação em alguma parte do procedimento, seja de coleta seja de cultura.

A alta prevalência de *Staphylococcus spp.* concorda com o trabalho realizado por Amaral et al (2004) em que, analisadas amostras de água das fontes de abastecimento, saída do reservatório e do estábulo em 30 propriedades leiteiras, verificou-se que 90,0% das amostras das fontes, 86,7% dos reservatórios e 96,7% dos estábulos encontravam-se fora dos padrões microbiológicos de potabilidade. Os resultados mostraram o isolamento de *Staphylococcus spp.* em 80,0%; 63,3% e 66,7% das amostras de água das fontes, reservatórios e estábulo, respectivamente. Foram isolados *Staphylococcus aureus* nas amostras de água dos 3 pontos amostrados sendo

que 100% das amostras isoladas da água utilizada no estábulo foram capazes de produzir enterotoxinas. Os resultados obtidos mostraram que a água utilizada em propriedades leiteiras pode representar risco à qualidade do leite e à saúde da glândula mamária.

Olivindo (2007) afirma que água ainda sem tratamento, utilizada para a lavagem das mãos de ordenhadores, caracteriza-se como um ponto crítico de controle (PCC), pois aparece como iniciador de contaminação por *Streptococcus spp.*, concordando com o que ocorreu com o isolamento deste agente nesse trabalho.

Já Ziluga et al. (1998) afirmam que as enterobactérias são os principais agentes encontrados na água, juntamente com a *Pseudomonas aeruginosa*, o que não se comprovou neste estudo.

Com os resultados obtidos podemos afirmar que a água é sim uma via de transmissão para a mastite ovina.

6 CONCLUSÕES

Mesmo não sendo estatisticamente significativos, pôde-se observar que houve sim interferência dos índices de mastite na produção de leite ovino, o que não se pôde afirmar com o passar das semanas de lactação.

Os índices de similaridade observados no aspecto microbiológico podem ser justificados pelo fato de que o *Staphylococcus spp.* tem sido apontado como bactéria contagiosa, ou seja, que pode ser transmitida durante as ordenhas e que as fossas nasais, garganta, equipamento de ordenha (principalmente teteiras), pele das tetas e humana são considerados importantes reservatórios destes organismos.

Neste rebanho, não houve mastite causada por *Manheimia haemolytica*, até então citada como um dos principais agentes desta patologia.

Para se ter certeza se os microrganismos encontrados nas culturas microbiológicas da água e *swabs* de mão, insufladores, orofaringe de cordeiros e esfíncter de tetas são os mesmos agentes causais encontrados no diagnóstico da mastite deste trabalho, haveria necessidade de um estudo de biologia molecular sobre eles, porém, como trabalho inicial e pioneiro deste assunto, pode-se sugerir que existe relação entre os microrganismos encontrados no leite e nas outras culturas realizadas, e que a água, a mão dos ordenhadores, insufladores, orofaringe de cordeiros e esfíncter das tetas são sim vias de transmissão de agentes causadores da mastite ovina.

7 BIBLIOGRAFIA

ADESIYUN, A.A. et al. Relatedness of *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk and human handlers in dairy farms in Trinidad. **Journal of Veterinary Medicine**, v.44, n.9, p.551-556, 1997.

AMARAL, L.A. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina. In: III ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 3., 1999, Botucatu. *Anais do III Encontro de Pesquisadores de Mastites*. Botucatu: FMVZ/UNESP – Campus Botucatu, 1999, v.1, p. 19-26.

AMARAL, L.A. et al. Qualidade da água em propriedades leiteiras como fator de risco à qualidade do leite e à saúde da glândula mamária. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.71, n.4, p.417-421, 2004.

ARIZNABARRETA, A. et al. Microbiological Quality and Somatic Cell Count of Ewe Milk with Special Reference to *Staphylococci*. *Journal of Dairy Science*, v. 85, n. 6, p. 1370-1375.

BENCINI, R.; PULINA, G. The quality of sheep milk: a review. *Wool Technology and Sheep Breeding*, v.45, p.182-220, 1997.

BERGONIER, D. et al. Les mammites des ovins et des caprins laitiers: étiologie, épidémiologie, contrôle. In: Chabert,Y. (Ed.). *Proceedings of Rencontres Recherches Ruminants*, v. 4, p. 251–260, 1997.

BERGONIER, D.; BERTHELOT, X. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livestock Production Science*, v. 79, p. 1-16, 2003.

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

BORGES, I.; SILVA, A.G.M. Produção de leite ovino. *Associação Paulista de Criadores de Ovinos*. São Manuel, 26 jan. 2004.

BRITO, J.R.F. et al. Sensibilidade e especificidade do “Califórnia Mastitis Test” como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.17, n.2, p.49 - 53, abr/jun, 1997.

BRITO, M.A.V.P. Influência das células somáticas na qualidade do leite. In: 1º MINAS LEITE – QUALIDADE DO LEITE E PRODUTIVIDADE DE REBANHOS LEITEIROS, 1., 1999, Juiz de Fora. *Anais do 1º Minas Leite – Qualidade do Leite e Produtividade de Rebanhos Leiteiros*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999.

BURRIEL, A.R. Isolation of coagulase-negative staphylococci from the milk and environment of sheep. *Journal of Dairy Research*, v. 65, p. 139–142, 1998.

CARDELLINO, R.A.; BENSON, M.E. Lactation curves of commercial ewes rearing lambs. *Journal of Animal Science*., v. 80, p. 23–27. 2002.

CARTER, G.R., COLE JUNIOR,, J.R. *Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology*. 5. ed. New York: Academic Press, 1990. 620p.

COSSEDDU, A.M. et al. Some microbiological causes of the increase in somatic cells in sheep milk. In: Rubino, R. (Ed.), *Proceedings of the International Symposium on Somatic Cells and Milk of Small Ruminants*, Bella, Italy. Wageningen Pers, Netherlands, p. 85–88, 1996.

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. *Revista da Educação Continuada do CRMV-SP*, São Paulo, v.1, f.1, p.3 – 9, 1998.

DE LA CRUZ, M. et al. Etiology and prevalence of subclinical mastitis in the Manchega sheep at mid-lactation. *Small Ruminant Research*, v. 14, p. 175–180, 1994.

DOMINGUES, P.F., LEITE, C.A. Mastite em ovinos. *O Berro*, n.74, Fev., p.50 - 60, 2005.

DOMINGUES, P.F. et al. Análise microbiológica de amostras de leite de ovelhas da raça Santa Inês e comparação com as provas do Califórnia Mastitis Test (CMT) e Whiteside. In: II Congresso Latino-americano e VII Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos. **Anais...** Búzios : Higiene Alimentar, v. 19, ed 130, abr. 2005.

EL-MASANNAT, E.T.S et al. The experimental production of mastitis in sheep by intramammary inoculation of *Pasteurella haemolytica*. *Journal of Comparative Pathology*, V. 105, P.455-465, 1991.

FTHENAKIS, G.C. Prevalence and aetiology of subclinical mastitis in ewes of southern Greece. *Small Ruminant Research*, v. 13, p. 293–300, 1994.

FTHENAKIS, G.C. California Mastitis Test and Whiteside test in diagnosis of subclinical mastitis in dairy ewes. *Small Ruminant Research*, v. 16, p. 271-276, 1995.

GONZALEZ-RODRIGUEZ, M.C. et al. Relations between somatic cell count and intramammary infection of the half udder in dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, v. 78, p. 2753–2759, 1995.

GONZALEZ-RODRIGUEZ, M.C.; CARMENES, P. Evaluation of the California mastitis test as a discriminant method to detect subclinical mastitis in ewes. *Small Ruminant Research*, v. 21, n. 3, p. 245-250, 1996.

GREEN, T.J. Use of somatic cell counts for detection of subclinical mastitis in ewes. *The Veterinary Record.*, v.114, p.43, 1984.

GROSS, S.G. et al. Incidence and importance of subclinical mastitis in sheep. *Journal Animal Science*, v. 46, p. 293 – 300, 1978.

HAENLEIN, G.W.F. The nutritional value of sheep milk. *Department of Animal & Food Sciences - University of Delaware*. 2000.

HALE, M.; COFFEY, L. Dairy Sheep. *National Center for Appropriate Technology*. Butte, 2006.

HARMON, R. J. Controle da mastite bovina. In: 1º INTERLEITE, 1, 1994, São Paulo. *Anais do 1º Interleite*. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 1994, v.1, p.15 – 16.

HUESTON, W.D., et al. Detection of intramammary infection with the California Mastitis Test. *Journal American Veterinary Medical Association*, v. 188, p. 522 – 524, 1986.

JARVIS, M. So, you want to milk sheep. *All Animals*. Winsconsin, 1997. Disponível em: < <http://www.all-animals.com/wannabe.html> >. Acesso em: 18 ago. 2006.

JONES, J.E.T. An investigation of mastitis in sheep: preliminary phase. *Procedings of Sheep Veterinary Society*. 10, 48–51, 1985.

JONES, J. E. T. Mastitis in sheep. In: J. B. Owen, R. F. E. Axford (Ed.), *Breeding for disease resistance in farm animals*. Bangor: CAB International. p. 412-423, 1991.

KEISLER, D.H., et al. Subclinical mastitis in ewes and on it's effect on lamb performance. *Journal Animal Science*, v. 70, p. 1677 – 1681, 1992.

KIRK, J. H. et al. Mastitis and udder abnormalities as related to neonatal lamb mortality in shed-lambled range ewes. *Journal Animal Science*, v. 50, p. 610, 1980.

KIRK, J. H. et al. Mastitis in a flock of milking sheep. *Small Ruminant Research*, v.22, p.187-191, 1996.

KLOOS, W. E.; SCHLEIFER, K. H. Genus IV. *Staphylococcus* Rosenbach 1884, 18AL (Nom. cons. Opin. 17 Jud. Comm. 1985, 153). In.: *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*, v. 2, (ed). Baltimore, Williams & Williams, 1986.

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

KRIEG, N.R., HOLT, J.G. *Bergeys manual of systematic bacteriology*. 9. ed. Baltimore: William & Wilkins, 1984.

LAFI, S.Q. Use of somatic cell counts and California Mastitis Test results from udder halves milk samples to detect subclinical intramammary infection in Awassi sheep. *Small Ruminant Research*, v. 62, p. 83-86, 2006.

LAFI, S.Q. et al. Epidemiological studies of clinical and subclinical ovine mastitis in Awassi sheep in northern Jordan. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 33, p. 171–181, 1998.

LANGONI, H. Complexidade etiológica da mastite bovina. . In: III ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 3., 1999, Botucatu. *Anais do III Encontro de Pesquisadores de Mastites*. Botucatu: FMVZ/UNESP – Campus Botucatu, 1999, v.1, p. 3-18.

LAS HERAS, A. et al. Prevalence and aetiology of subclinical mastitis in dairy ewes of the Madrid region. *Small Ruminant Research*, v.32, p.21-9, 1999.

LAS HERAS, A. et al. Intramammary *Aspergillus fumigatus* infection in dairy ewes associated with antibiotic dry therapy. *Veterinary Records*, v. 147, p. 578–580, 2000.

LEITNER, G. et al. Udder disease etiology, milk somatic cell counts and NAGase activity in Israeli Assaf sheep throughout lactation. *Small Ruminant Research*, v. 39, p. 107–112, 2001.

LUCHEIS, S.B. et al. Análise Microbiológica de Amostras de Leite de Ovelhas da Raça Bergamácia, com e sem cordeiro em lactação. In: II Congresso Latino-americano e VIII Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos, 2005, Búzios-RJ. *Anais dos Congressos II Latino-Americano e VIII Brasileiro de Higienistas de Alimentos*, 2005.

MAISI, P. et al. Detection of subclinical mastitis in ewes. *British Veterinary Journal*, v. 143, p. 402-409, 1987.

MARCO MELERO, J.C. *Mastitis en la oveja Latxa: epidemiologia, diagnostico y control*. Tese PhD, Zaragoza, 398 p., 1994.

MAVROGENIS, A.P. et al. Use of somatic cell counts for the detection of subclinical mastitis in sheep. *Small Ruminant Research*, v. 17, p. 79–84, 1995.

MENDONÇA, L.C.; MOLINA, L.R. Streptococcus agalactiae: um vilão dos seus lucros!. *Rehagro*. Belo Horizonte, 2007. Disponível em: <
<http://www.rehagro.com.br/siterehagro/publicacao.do?cdnoticia=1544>>.
Acesso em: 25 out. 2007.

MONARDES, H. Contagem de células somáticas e melhoramento genético da resistência à mastite – parte I. *Gado Holandês*, n.437, p.38 - 42, 1995.

NMC. National Mastitis Council. *Mastitis Pathogen Notes: Bacillus species & Other Gram-Positive Bacilli*. Verona, 2000. Disponível em: <
<http://www.nmconline.org/articles/bacillus.htm>>. Acesso em: 07 set. 2007.

OLIVES, A. M.; PONS, P.M. Mamitis y calidad de la leche de oveja. *Ovis*, n.58, p.11 - 25, 1998.

OLIVINDO, C.S. *Detecção de microrganismos utilizando a técnica de PCR em seqüências palindrômicas extragênicas repetidas (REP-PCR) no monitoramento da qualidade do leite de cabra em sala de ordenha*. Dissertação de mestrado. Fortaleza, 64 p., 2007.

PERIS, C. et al. Influence of Pulsation Rate on Udder Health and Teat Thickness Changes in Dairy Ewes. *Journal of Dairy Science*, v. 86, n. 2, p. 530–537, 2003.

PLOMMET, M. Mammites et traite mécanique. *Annales de Zootechnie*, p. 87–95, 1974.

PUGLIESE, C. et al. . Evolution of chemical composition, somatic cell count and renneting properties of the milk of Massese ewes. *Small Ruminant Research*, v.35, p.71-80, 2000.

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

RADDI, M. S. G. et al. *Staphylococcus aureus*: portadores entre manipuladores de alimentos. *Revista Saúde Pública*. v. 22, n. 1, p.36-40, 1988

REYNOLDS, L.L.; BROWN, D.L. Assessing dairy potential of Western White-Faced ewes. *Journal of Animal Science*, v. 69, p. 1354-1362, 1991.

SÁ, C. O. et al. Influência do fotoperíodo no consumo alimentar, produção e composição do leite de ovelhas Bergamácia. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.40, n.6, p.601-608, jun. 2005.

SANTOS, M. V. Biossegurança aplicada ao controle de mastite. *Balde Branco*, v. 463, p. 62-65, 2003.

SCHALM, O.W., NOORLANDER, D.D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. *Journal American Veterinary Medical Association.*, v.130, p.199 - 204, 1957.

SCOTT, P.R.; MURPHY, S. Outbreak of staphylococcal der matitis in housed lactating Suffolk ewes. *Veterinary Records*, v. 140, p. 631–632, 1997.

SCOTT M.J.; JONES J.E.T. The carriage of *Pasteurella haemolytica* in sheep and its transfer between ewes and lambs in relation to mastitis. *Journal of Comparative Pathology*, v. 118, p. 359-363, 1998

STEFANAKIS, A. et al. Frequency of subclinical mastitis and observation on somatic cell counts in ewe's milk in northern Greece. *Journal of Animal Science*, v. 61, p. 69-76, 1995.

UNESP. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia do Campus de Botucatu. *Ovinos e*

Caprinos na UNESP. Botucatu, 2004. Disponível em: <<http://www.fmvz.unesp.br/ovinos/capov.htm>>. Acesso em: 15 jul. 2007.

VAZ, A.K. Mastite em ovinos. *A Hora Veterinária*. Porto Alegre, n.93, p.75-8, 1996.

WINTER, A. Mastitis in ewes. *In Practice*, v. 23, p.160-163, 2001.

ZILUGA, I. et al. Prevalencia, patogenicidad y epidemiologia de los microorganismos implicados en procesos mamiticos del ganado ovino. *Ovis*, v. 59, p. 27–49, 1998.

8 TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho enviado à **Revista Veterinária e Zootecnia**. Botucatu – SP, Brasil.

ISSN 0102-5716

Etiologia da Mastite em Ovelhas da Raça Bergamácia Submetidas à Ordenha Mecânica.

Etiology of Sheep Mastitis of Bergamacia Breed Submitted in Milking Machine.

**Etiología de la Mastitis en Ovejas de la Raza Bergamácia Sometidas a la Ordena
Mecánica.**

**Roberto Ximenes Bolsanello¹, Melissa Hartman¹, Paulo Francisco Domingues¹, Amilton
Souza de Mello Júnior², Hélio Langoni¹**

¹ Núcleo de Pesquisas em Mastites – NUPEMAS – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu – SP.

² University of Nebraska, Department of Animal Science, Lincoln – NE, USA, 68583-0908.

* Universidade Estadual Paulista – UNESP. Distrito de Rubião Jr. s/n. – Botucatu – SP. Tel.: 14-3811-6270. Fax.: 14-3811-6075. E-mail: robximenes@hotmail.com

RESUMO

O leite de ovelhas nunca foi devidamente explorado no Brasil. Numa comparação com o potencial de mercado com a carne ou a lã, o leite está muito aquém. Mas o leite desta espécie é um produto nobre sob o ponto de vista da fabricação de queijos. A mastite é a infecção mais freqüente dos animais destinados a produção de leite e que mais onera a pecuária leiteira. As perdas econômicas são causadas tanto na fazenda, pela diminuição da produção de leite, custo com mão-de-obra, honorários profissionais, medicamentos, morte ou descarte precoce de animais, como nos laticínios, pela queda na qualidade do produto final e diminuição do rendimento industrial para fabricação dos seus derivados e pelas alterações na composição do leite mastítico. As bactérias são os agentes isolados e identificados com maior freqüência em casos de mastite ovina. Este trabalho, teve como objetivo estabelecer, de acordo com levantamento microbiano, os principais patógenos causadores da mastite ovina. O experimento foi realizado na área de Produção de Ovinos da Fazenda Edgárdia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu. Foram utilizadas 37 ovelhas em lactação, da raça Bergamácia, submetidas a ordenha mecânica diariamente, com manejo idêntico. Os animais foram acompanhados durante toda a lactação. Avaliou-se o índice de mastite pelo Califórnia Mastitis Test (CMT) e do leite dos animais positivos foi realizada cultura microbiológica. O patógeno com a maior freqüência foi o *Staphylococcus* spp correspondendo a 59,46% do total dos patógenos encontrados, seguidamente de *Streptococcus* spp. (16,22%) e *Bacillus* spp. (16,22%), *Corynebacterium bovis* (5,40%) e *Serratia* spp. (2,7%). Houve uma predominância de *Staphylococcus* spp, demonstrando esse ser o agente mais frequente na mastite ovina, sugerindo uma necessidade de enfocar o controle principalmente na ordenha, por ser este um agente contagioso.

Palavras-Chave: mastite; ovelha; leite; etiologia; *Staphylococcus*.

ABSTRACT

Sheep milk has never been well explored in Brazil. Comparing it to the market potential for meat and wool, milk market is way behind them. However, sheep milk is a noble product for cheese production. Mastitis is a frequent infection of animals used to milk production and it is the biggest waste in milk market. The economic losses are caused in the farm, by the decrease in milk production, job expenses, professional honorariums, drugs, deaths or early animal discards, as in creamery, by the decrease in quality of the end product and decrease in

industry output for fabrication of milk derivatives and for alterations in mastitis milk composition. Bacteria are more often isolated and identified agents in sheep mastitis cases. The aim of this work was to study the pathogens responsible for sheep mastitis. The experiment was realized in the flock sheep from the Edgardia farm, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu. Thirty seven lactating sheeps were used, Bergamacia breed, submitted to daily mechanical milking, all under similar conditions. The animals were accompanied during the lactation period. The mastitis taxes were evaluated by the California Mastitis Test (CMT) and all positive milk samples were evaluated by the microbiologic culture. The most frequent pathogens found were *Staphylococcus* spp which corresponds of 59.46% of the total pathogens found, followed by *Streptococcus* spp (16.22%) e *Bacillus* spp. (16.22%), *Corynebacterium bovis* (5.40%) e *Serratia* spp. (2.7%). There was a predominance of *Staphylococcus* spp, showing that this is the most important agent that may causes mastitis in ewes, and suggests the necessity of focusing the control specially during milking, because this is a contagiously agent.

Key-words: mastitis, sheep, milk, etiology, *Staphylococcus*.

RESUMEN

La leche de ovejas nunca fue debidamente explorada en Brasil. En una comparación con el potencial de mercado con la carne o la lana, la leche está mucho abajo. Todavía la leche de esta especie animal es un producto noble por el punto de vista de la fabricación de quesos. La mastitis es la infección más frecuente de los animales destinados a la producción de leche y que torna más costosa la pecuaria lechera. Las pérdidas económicas son causadas tanto en la hacienda, por la disminución de la producción de leche, costos con mano de obra, honorarios profesionales, medicamentos, muerte o descarte temprano de animales, como en los laticinios, por la queda en la calidad del producto final y disminución del rendimiento industrial para la fabricación de sus derivados y por las alteraciones en la composición del leche aislado. Las bacterias son los agentes aislados e identificados con mayor frecuencia en casos de mastitis de ovina. Este estudio tuvo como objetivo establecer de acuerdo con el levantamiento microbiano los principales patógenos causadores de la mastitis ovina. El experimento fue realizado en el área de Producción de Ovinos de la Hacienda Edgárdia, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu, São Paulo,

Brasil. Fueron utilizadas 37 ovejas en lactación, de la raza Bergamácia, sometidas a ordeña mecánica diariamente, con manejo idéntico. Los animales fueron acompañados durante toda la lactación. Se evaluó el índice de mastitis por medio del California Mastitis Test (CMT) y de la leche de los animales positivos fue realizado cultivo microbiológico. El patógeno con mayor frecuencia fue el *Staphylococcus* spp correspondiendo al 59,46% del total de los patógenos encontrados, seguidamente de *Streptococcus* spp. (16,22%) y *Bacillus* spp. (16,22%), *Corynebacterium bovis* (5,40%) y *Serratia* spp. (2,7%). Hubo una predominancia de *Staphylococcus* spp., demostrando ser este el agente principal causador de la mastitis ovina, sugiriendo una necesidad de enfocar el control principalmente en la ordeña, por ser este un agente contagioso.

Palabras clave: mastitis; oveja; leche; etiología; *Staphylococcus*.

1 - Introdução

A produção de leite ovino é uma atividade relativamente nova em alguns países, tais como a Austrália e a Nova Zelândia, onde as informações sobre a criação de ovinos de leite são raras. Mesmo em países, onde a produção de leite é uma tradição de muitos anos, há uma deficiência de novas tecnologias e pesquisas científicas ligadas à produção de leite ovino. Entretanto, é de conhecimento geral que o leite apresenta características que permitem transformá-lo em produtos de elevado valor comercial, como queijos e iogurtes (BENCINI & PULINA, 1997; PUGLIESE et al., 2000; SÁ et al., 2005)

O leite de ovelhas nunca foi devidamente explorado no Brasil. Numa comparação com o potencial de mercado com a carne ou a lã, o leite está muito aquém. Mas o leite desta espécie animal é um produto nobre sob o ponto de vista da fabricação de queijos. Conseqüentemente, é caro e, destinado à fabricação de queijos finos, também de elevado valor de mercado. O Brasil tem nichos de mercado para esse tipo de produto, principalmente nos grandes centros urbanos, haja vista que importa queijo de ovelhas da Europa, particularmente da França, Espanha, Portugal, Grécia e Itália. (UNESP, 2004)

Há necessidade de maiores estudos sobre a produção de leite de ovinos no Brasil, sobre a produção média por animal e qualidade do leite produzido. Valores observados na prática em alguns rebanhos da raça Santa Inês, trabalhados em Minas Gerais e no Distrito Federal, dão conta de que tais fêmeas são capazes de produzir algo próximo dos 1 500 g de leite por dia, como também alguns criadores de Bergamácia atestam que seus rebanhos apresentam ovelhas que superam os valores relatados acima. O que falta para a maior segurança seriam dados de levantamentos estatísticos, bem como trabalhos de pesquisas mais acurados, para fornecer indicadores mais confiáveis. No entanto, de forma superficial é

possível afirmar que no Brasil exista um potencial latente para a produção e processamento do leite ovino (BORGES & SILVA, 2004).

A mastite é a infecção mais freqüente dos animais destinados a produção de leite e que mais onera a pecuária leiteira. As perdas econômicas são causadas tanto na fazenda, pela diminuição da produção de leite, custo com mão-de-obra, honorários profissionais, medicamentos, morte ou descarte precoce de animais, como nos laticínios, pela queda na qualidade do produto final e diminuição do rendimento industrial para fabricação dos seus derivados e pelas alterações na composição do leite mastítico (LANGONI, 1999).

Segundo Domingues & Leite (2005), as bactérias são os agentes isolados e identificados com maior freqüência em casos de mastite ovina, sendo os principais microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Mannheimia haemolytica*, *Streptococcus spp*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Staphylococcus coagulase negativos*, *Corynebacterium spp* e *Clostridium spp*. O *Staphylococcus aureus* e a *Mannheimia haemolytica*, isoladamente ou associados a outros microrganismos, representam 80% dos casos de mastite aguda (JONES, 1991). No Brasil e em outros países, os *Staphylococcus coagulase negativos* e o *Corynebacterium spp* são responsáveis pela maioria dos casos de mastite subclínica (KIRK et al., 1996; LÃS HERAS et al., 1999).

Este trabalho teve como objetivo estabelecer, por meio de levantamento microbiano, os principais patógenos causadores da mastite ovina.

2 – Material e métodos

2.1 – Animais

O experimento foi realizado na área de Produção de Ovinos da Fazenda Edgárdia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu. Foram utilizadas 37 ovelhas em lactação, da raça Bergamácia, submetidas a

ordenha mecânica diariamente. Previamente a ordenha era feito o pré-dipping em solução de 1% de iodo, recebendo arrazoamento durante a ordenha, e após isso passavam o dia com os cordeiros em pastejo. Os animais foram acompanhados durante toda a lactação, que durou 8 semanas, sendo os cordeiros amamentados até a 5ª semana, quando então houve o desmame.

2.2 – Diagnóstico da mastite

A mastite subclínica foi diagnosticada mediante o uso do California Mastitis Test (CMT) segundo Schalm & Noorlander (1957). A interpretação do teste se baseia na observação visual do leite após ser misturado ao reagente. A reação se processa entre o reagente e o material genético das células somáticas presentes no leite, formando um gel, cuja concentração é proporcional ao número de células somáticas. O resultado do CMT é dado como negativo (neg.), suspeito (-), fracamente positivo (1+), positivo (2+) e fortemente positivo (3+) (SCHALM & NOORLANDER, 1957; BRITO et al. 1997).

2.3 – Colheita das amostras

Para o procedimento de colheita das amostras de leite das tetas positivas ao CMT, estas foram lavadas previamente com água e secadas com toalha de papel descartável. A seguir, foi realizada a anti-sepsia do óstio da teta, com álcool a 70%, e as amostras de leite, colhidas em tubos de vidro estéreis, desprezando-se os três primeiros jatos de leite.

As amostras foram encaminhadas ao laboratório do Núcleo de Pesquisas em Mastites - NUPEMAS, do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu, sob refrigeração, em caixa isotérmica contendo gelo reciclável, e processadas de acordo com os objetivos do presente estudo

2.4 – Diagnóstico etiológico

No laboratório, foram realizados cultivos microbiológicos com 0,1 ml de leite em placas de Petri contendo meios de agar-sangue ovino a 5% e MacConkey, incubando-se a 37°C. Realizaram-se as leituras às 24, 48 e 72 horas, observando-se a morfologia das colônias e, a seguir, foram preparadas lâminas com esfregaços corados pelo método de Gram, para verificar-se ao microscópio ótico, a morfologia bacteriana e sua característica morfotintorial. Os microrganismos foram repicados para meio de caldo cérebro-coração (BHI) para realização das provas taxonômicas, segundo Krieg & Holt (1984); Carter & Cole Junior (1990); Quinn et al. (1994).

3 – Resultados

Os microrganismos mais comumente encontrados foram: *Staphylococcus* spp., correspondendo a 61,11%, seguidamente de *Streptococcus* spp. (16,66%), *Bacillus* spp. (13,89%), *Corynebacterium* spp. (5,56%) e *Serratia* spp. (2,78%), como pode ser observado na Figura 1.

4 – Discussão

Staphylococcus spp. também foi o agente de maior prevalência no trabalho realizado por Ariznabarreta et al. (2002) com 78,9%, seguido de *Corynebacterium bovis* (11,2%), *Streptococcus* spp. (3,1%), Enterobacterias (2,9%) e *Micrococcus* spp. (1,4%).

El-Massanat et al. (1991), Scott & Jones (1998) e Winter (2001), afirmam que agentes etiológicos mais freqüentemente associados à infecção da glândula mamária de

ovelhas são *S. aureus* e *Manheimia haemolytica*, isoladamente ou em associação, responsáveis por 80% dos casos de mastite, porém, no presente estudo não foi possível o isolamento de *Manheimia haemolytica*, o que está de acordo com Lucheis et al (2005) que pela análise microbiológica de amostras de leite de ovelhas da raça Bergamácia, determinaram a frequência de mastite ovina na presença de cordeiros em amamentação e em ovelhas com cordeiros desmamados. Na presença de cordeiros lactentes, 20,25% das amostras examinadas mostraram-se positivas com o isolamento de *Staphylococcus coagulase* positivo (14,06%), *Staphylococcus coagulase* negativo (71,87%), *Streptococcus spp* (3,13%) e *Bacillus spp* (10,94%). As amostras provenientes das ovelhas que não estavam amamentando, 12,9% revelaram crescimento de microrganismos, como *Staphylococcus coagulase* positivo (5,40%), *Staphylococcus coagulase* negativo (78,4%), *Streptococcus spp* (8,10%), *Corynebacterium spp* (2,70%) e *Micrococcus spp* (2,70%).

Na tabela 1 são apresentados alguns trabalhos sobre a etiologia da mastite ovina, observando-se em todos a predominância do *Staphylococcus spp.* como agente principal, comprovando o resultado desta pesquisa.

5 – Conclusões

Houve uma predominância de *Staphylococcus spp.*, demonstrando esse ser o agente mais frequente na mastite ovina, sugerindo uma necessidade de focar o controle principalmente na ordenha, por ser este um agente contagioso, ou seja, ordenha dependente.

6 – Referências

ARIZNABARRETA, A. et al. Microbiological Quality and Somatic Cell Count of Ewe Milk with Special Reference to Staphylococci. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 6, p. 1370-1375.

BENCINI, R.; PULINA, G. The quality of sheep milk: a review. **Wool Technology and Sheep Breeding**, v.45, p.182-220, 1997.

BORGES, I.; SILVA, A.G.M. Produção de leite ovino. **Associação Paulista de Criadores de Ovinos**. São Manuel, 26 jan. 2004. Disponível em: <[http://www.expertsite.com.br/\(raadk1jgudgnwo45q1yztw55\)/artigo.aspx?cod=163](http://www.expertsite.com.br/(raadk1jgudgnwo45q1yztw55)/artigo.aspx?cod=163)> Acesso em: 18 jul. 2005.

BRITO, J.R.F. et al. Sensibilidade e especificidade do “Califórnia Mastitis Test” como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.2, p.49 - 53, abr/jun, 1997.

CARTER, G.R., COLE JUNIOR., J.R. **Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology**. 5. ed. New York: Academic Press, 1990. 620p.

COSSEDDU, A.M. et al. Some microbiological causes of the increase in somatic cells in sheep milk. In: Rubino, R. (Ed.), *Proceedings of the International Symposium on Somatic Cells and Milk of Small Ruminants*, Bella, Italy. Wageningen Pers, Netherlands, p. 85–88, 1996.

DE LA CRUZ, M. et al. Etiology and prevalence of subclinical mastitis in the Manchega sheep at mid-lactation. **Small Ruminant Research**, v. 14, p. 175–180, 1994.

DOMINGUES, P.F., LEITE, C.A. Mastite em ovinos. **O Berro**, n.74, Fev., p.50 - 60, 2005.

EL-MASANNAT E.T.S ET AL. The experimental production of mastitis in sheep by intramammary inoculation of *Pasteurella haemolytica*. **Journal of Comparative Pathology**, V. 105, P.455-465, 1991.

FTHENAKIS, G.C. Prevalence and aetiology of subclinical mastitis in ewes of southern Greece. **Small Ruminant Research**, v. 13, p. 293–300, 1994.

GONZALEZ-RODRIGUEZ, M.C. et al. Relations between somatic cell count and intramammary infection of the half udder in dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, v. 78, p. 2753–2759, 1995.

JONES, J. E. T. Mastitis in sheep. In: J. B. Owen, R. F. E. Axford (Ed.), **Breeding for disease resistance in farm animals** (pp. 412-23). Bangor: CAB International. 1991.

KIRK, J. H. et al. Mastitis in a flock of milking sheep. **Small Ruminant Research**, v.22, p.187-191, 1996.

KRIEG, N.R., HOLT, J.G. **Bergeys manual of systematic bacteriology**. 9. ed. Baltimore: William & Wilkins, 1984.

LAFI, S.Q. et al. Epidemiological studies of clinical and subclinical ovine mastitis in Awassi sheep in northern Jordan. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 33, p. 171–181, 1998.

LANGONI, H. Complexidade etiológica da mastite bovina. . In: III ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 3., 1999, Botucatu. **Anais do III Encontro de Pesquisadores de Mastites**. Botucatu: FMVZ/UNESP – Campus Botucatu, 1999, v.1, p. 3-18.

LAS HERAS, A. et al. Prevalence and aetiology of subclinical mastitis in dairy ewes of the Madrid region. **Small Ruminant Research**, v.32, p.21-9, 1999.

LUCHEIS, S.B. et al. Análise Microbiológica de Amostras de Leite de Ovelhas da Raça Bergamácia, com e sem cordeiro em lactação. In: II Congresso Latino-americano e VIII Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos, 2005, Búzios-RJ. **Anais dos Congressos II Latino-Americano e VIII Brasileiro de Higienistas de Alimentos**, 2005.

MARCO MELERO, J.C. **Mastitis en la oveja Latxa: epidemiologia, diagnostico y control**. Tese PhD, Zaragoza, 398 p., 1994.

MAVROGENIS, A.P. et al. Use of somatic cell counts for the detection of subclinical mastitis in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 17, p. 79–84, 1995.

PUGLIESE, C. et al. . Evolution of chemical composition, somatic cell count and renneting properties of the milk of Massese ewes. **Small Ruminant Research**, v.35, p.71-80, 2000.

SÁ, C. O. et al. Influência do fotoperíodo no consumo alimentar, produção e composição do leite de ovelhas Bergamácia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.6, p.601-608, jun. 2005.

SCHALM, O.W., NOORLANDER, D.D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal American Veterinary Medical Association.**, v.130, p.199 - 204, 1957.

STEFANAKIS, A. et al. Frequency of subclinical mastitis and observation on somatic cell counts in ewe's milk in northern Greece. *Journal of Animal Science*, v. 61, p. 69-76, 1995.

SCOTT M.J.; JONES J.E.T. The carriage of *Pasteurella haemolytica* in sheep and its transfer between ewes and lambs in relation to mastitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 118, p. 359-363, 1998

UNESP. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia do Campus de Botucatu. **Ovinos e Caprinos na UNESP**. Botucatu, 2004. Disponível em: <<http://www.fmvz.unesp.br/ovinos/capov.htm>>. Acesso em: 15 jul. 2005.

WINTER, A. Mastitis in ewes. **In Practice**, v. 23, p.160-163, 2001.

Etiologia da Mastite em Ovelhas da Raça Bergamácia Submetidas a Ordenha Mecânica.

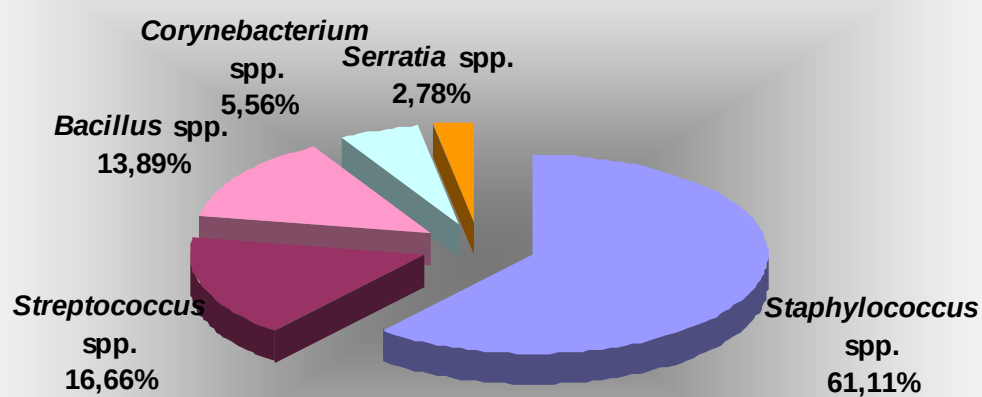


Figura 1. Prevalência (%) de agentes isolados do leite de ovelhas da raça Bergamácia, considerando o período de oito semanas de lactação.

Figure 1. Agents prevalence (%) isolated from milk of Bergamácia sheep, considering eight weeks of lactation.

Etiologia da Mastite em Ovelhas da Raça Bergamácia Submetidas a Ordenha Mecânica.

Tabela 1. Agentes etiológicos isolados da mastite ovina (%), considerando diversos estudos realizados por diferentes autores.

Table 1. Etiology of agents isolated of sheep mastitis (%), considering some studies realized by different authors.

Autor. Ano	País	Ovelhas	Ordenha *	Amostras (n)	Staphylococcus	Streptococcus	E. coli	M. haemolytica	Corynebacterium.	Outros
Marco Melero, 1994	Espanha	45	Ma e Me	48	48,6	17,1	11,4			22,9
Lafi et al., 1998	Jordânia	1736		145	40,7	8,5	18,6	3,4		28,8
De La Cruz et al., 1994	Espanha	466		932	83,2	1,5		0,5		14,8
Fthenakis, 1994	Grécia	760	Ma		57,6	9	9			24
Mavrogenis et al., 1995	Chipre	100		1066	88		8	1		3
González-Rodríguez, 1995	Espanha	734	Ma e Me	1382	73,9	16,2	0,4			9,5
Stefanakis et al., 1995	Grécia	99		198	77	10		3		10
Cossedù et al., 1996	Itália	205	Ma e Me	410	71	4				4
Lah Heras et al., 1999	Espanha	564	Ma e Me	1128	71,8	13,5		10,1		4,6

*Ma: Ordenha Manual / Me: Ordenha Mecânica

ANEXO

Normas de publicação da revista Veterinária e Zootecnia

• Artigos Científicos

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

1. Página de rosto, com:

- Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, no qual somente a primeira letra de cada palavra deve ser maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira chamada de rodapé;
- Nomes completos dos autores, em que somente a primeira letra de cada nome deve ser maiúscula, centralizado e em negrito. Digitá-los, separados por vírgulas, com **chamadas** de rodapé numeradas e em sobrescrito, **que** **indicarão** o cargo e o endereço profissional dos autores (inclusive endereço eletrônico), seguidos da instituição onde o trabalho foi desenvolvido ou às quais estão vinculados;
- Nome, endereço, telefone, fax e correio eletrônico, para correspondência;
- Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data de aprovação.

2. Página com resumo, abstract e resumen

- Tanto o resumo, como o abstract e o resumen devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e

espaço 1,5, começando por RESUMO. O abstract, e o resumen, devem ser tradução fiel do resumo. Se for apresentado em inglês, deve conter também, resumos em português e espanhol; se for em espanhol, resumos em português e inglês.

- Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave, key words, e palabras-clave que identifiquem o conteúdo do texto.

3. A estrutura do artigo deverá conter:

Introdução: Deve ser clara, objetiva e relacionada ao problema investigado e à literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os objetivos do trabalho.

Material e Métodos: Deve oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos utilizados, inclusive os estatísticos.

Resultados: Apresentação dos resultados obtidos, que devem ser descritos sem interpretações e comparações. Poderá ser sob a **forma de tabelas**, em folha à parte, no máximo de cinco, ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas de apresentação tabular da ABNT/NBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a **forma de figuras**, nos casos de gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em algarismos arábicos, até no máximo de seis, e citadas no texto como Figura. Devem ser identificadas em folha à parte, onde deve constar o título do artigo. **Fotografias** podem ser em preto e branco ou coloridas, identificadas com

o(s) nome(s) do(s) autor(es) no verso. No caso de **desenhos originais**, a impressão deve ser em papel adequado, de qualidade. Se o trabalho for apresentado na língua portuguesa ou espanhola, os enunciados das tabelas e figuras bem como das variáveis apresentadas deverão estar também escritos em inglês.

Discussão: Deve ser entendida como a interpretação dos resultados, confrontando com a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.

Conclusões: É a síntese final, fundamentada nos resultados e na discussão.

Referências: Devem ser apresentadas de acordo com as normas da ABNT, e o arranjo deve ser em ordem alfabética por sobrenome do autor (modelos anexos).

Deverão ser editorados em Microsoft Word for Windows, para edição de textos, Excel (qualquer versão) para gráficos, formato JPEG ou GIF (imagem) para fotografias, desenhos e mapas, **em três vias (uma original e duas cópias)** impressas, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), em espaço duplo, mantendo margens de 2,5 cm, nas laterais, no topo e pé de cada página, fonte Times New Roman, tamanho 12 e numeração consecutiva das páginas em algarismos arábicos, a partir da folha de identificação. Ilustrações e legendas devem ser apresentadas em folhas separadas. Encaminhar cópia em disquete 3 ½" de alta densidade ou CD, identificado com título do artigo e nome dos autores. Nas duas cópias **deve(m) ser omitido(s) o(s) nome(s) do(s) autor(es), o local onde se realizou o trabalho, bem como o rodapé.**

Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis no formato PDF no endereço eletrônico da revista. Para as demais seções da revista são válidas as normas anteriores. Não devem exceder a 15 páginas. Abreviaturas não usuais devem ser empregadas após escritas por extenso na primeira utilização.³