

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS PARA O
DIAGNÓSTICO DA MASTITE SUBCLÍNICA OVINA EM
DIFERENTES RAÇAS EM DOIS PERÍODOS DE LACTAÇÃO**

Guilherme Aparecido Fim Júnior

Médico Veterinário

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS PARA O
DIAGNÓSTICO DA MASTITE SUBCLÍNICA OVINA EM
DIFERENTES RAÇAS EM DOIS PERÍODOS DE LACTAÇÃO**

Guilherme Aparecido Fim Júnior

Orientador: Prof. Dr. Luiz Francisco Zafalon

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre
em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária
Preventiva)

2015

Fim Júnior, Guilherme Aparecido

F489c Contagem de células somáticas para o diagnóstico da mastite subclínica ovina em diferentes raças em dois períodos de lactação / Guilherme Aparecido Fim Júnior. – – Jaboticabal, 2015

x, 66 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientador: Luiz Francisco Zafalon

Banca examinadora: Raimundo Nonato Rabelo, Estevam Guilherme Lux Hoppe

Bibliografia

1. Agentes etiológicos. 2. Leite. 3. Sanidade. 4. Ovelhas. I. Título.
II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:618.73:636.3

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GUILHERME APARECIDO FIM JÚNIOR - Nascido no dia 20 de setembro de 1989, na cidade de Estrela d' Oeste, filho de Guilherme Aparecido Fim e Doraci Zanusso, iniciou o curso de Medicina Veterinária na UNIRP em São José do Rio Preto em fevereiro de 2008 e no final desse mesmo ano transferiu-se para a Universidade Camilo Castelo Branco - UNICASTELO - Campus de Fernandópolis onde obteve o título de Médico Veterinário em dezembro de 2012. Em agosto de 2013 ingressou no curso de mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária Preventiva na Universidade Estadual Paulista - UNESP Campus de Jaboticabal sob orientação do Prof. Dr Luiz Francisco Zafalon, pesquisador da Embrapa Pecuária Sudeste.

EPÍGRAFE

Todos os dias quando acordo
Não tenho mais
O tempo que passou
Mas tenho muito tempo
Temos todo o tempo do mundo...

Todos os dias
Antes de dormir
Lembro e esqueço
Como foi o dia
Sempre em frente
Não temos tempo a perder...

Nosso suor sagrado
É bem mais belo
Que esse sangue amargo
E tão sério
E Selvagem! Selvagem!
Selvagem! ...

(Legião Urbana)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha mãe Doraci Zanusso, que muito se esforçou para que pudesse me formar, sempre apoiando minhas decisões, incentivando e orientando-me para tomar os caminhos certos.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida pela perseverança, estímulo, oportunidades, pela força de continuar sempre e, por que não, as dificuldades enfrentadas por meio das quais foi possível o aprendizado.

À minha mãe, Doraci Zanusso, pela dedicação, amor, paciência, investimento e exemplo de pessoa que é.

À Angelina, minha namorada, pelo amor incondicional, dedicação, companheirismo e paciência nas horas de estresse, tornando meus dias mais felizes, mesmo a distância, e ensinando-me a ser uma pessoa melhor.

Ao Professor Dr. Luiz Francisco Zafalon minha gratidão pela oportunidade de desenvolver esse trabalho sob sua orientação, atenção e confiança sempre dispensados durante nossos trabalhos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da Bolsa de Mestrado (2013/23054-9).

Aos líderes e componentes do Projeto Temático FAPESP (2011/51564-6) e a todos aqueles que a partir dos seus dados e conhecimentos contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos amigos Wellison Jarles S. Diniz, Carolina Orlando Vaso, Fernanda Zani Manieri, Nahryda Samara dos Santos Lopes, Adrielle Bassanezi Seixas, Lucas Eduardo Pilon, Raul Costa Mascarenhas Santana, Rafael Rozendo, Eliana Vale e todos aqueles que de alguma forma contribuíram e por todo o apoio e incentivo.

Ao Programa de Pós-Graduação Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Jaboticabal, seu corpo docente e de técnicos pela excelência de ensino e pelos conhecimentos proporcionados.

Ao Professor Dr. Raimundo Nonato Rabelo pela confiança, pelos conselhos, incentivos, pelas conversas francas, sempre disposto a ajudar. Muito obrigado pai.

Aos funcionários da EMBRAPA pelos ensinamentos e oportunidades gerados durante o período de desenvolvimento da pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Raças de ovinos de produção de corte.....	15
2.1.1. Santa Inês	15
2.1.2. Texel.....	16
2.1.3. Ile de France.....	16
2.1.4. Dorper	17
2.2. Anatomia da glândula mamária.....	18
2.3. Defesa da glândula mamária	19
2.4. Mastite Ovina	21
2.5. Etiologia Infeciosa da Mastite Ovina	22
2.6. Testes para o diagnóstico da mastite subclínica em ovelhas	26
2.6.1. California Mastitis Test (CMT)	26
2.6.2. Contagem de Células Somáticas	27
3. OBJETIVO	30
3.1. Objetivo Geral	30
3.2. Objetivos Específicos.....	30

4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1. Características dos animais e rebanho	31
4.2. Identificação prévia da mastite clínica e subclínica e colheitas de amostras de leite	32
4.3. Análises microbiológicas do leite para confirmação da mastite subclínica	34
4.4. Análises estatísticas	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÕES.....	55
7. REFERÊNCIAS	56

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado: “Estratégias de cruzamento e de manejo para otimizar o desempenho materno e reprodutivo de ovelhas de corte, para a produção de carne e de couro ovinos de qualidade, na região sudeste”, utilizando 547 animais da espécie ovina (*Ovis aries*), sob responsabilidade do pesquisador científico Dr. Maurício Mello de Alencar, está de acordo com os princípios éticos e de experimentação animal da Embrapa Pecuária Sudeste e foi aprovado pela referida instituição.

(We hereby declare that the research: “Crossbreeding and management strategies to optimize maternal and reproductive performance of female sheep, for the production of high quality sheep meat and leather, in the Southeast region of Brazil”, utilizing 547 animals of the ovine (*Ovis aries*) species, under the responsibility of the scientific researcher Dr. Maurício Mello de Alencar, is in agreement with ethical principles of animal experimentation of Embrapa Southeast Cattle and was approved to be carried out at that institution).

São Carlos, 17 de Junho de 2011



DR. RUI MACHADO
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Embrapa Pecuária Sudeste

recebido
17/06/11


Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Rod. Washington Luiz, km 234 Caixa Postal 339 13560-970 São Carlos, SP
Telefone (16) 3411 5600 Fax (16) 3361 5754

CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS PARA O DIAGNÓSTICO DA MASTITE SUBCLÍNICA OVINA EM DIFERENTES RAÇAS EM DOIS PERÍODOS DE LACTAÇÃO

RESUMO - Objetivou-se estabelecer a etiologia infecciosa da mastite subclínica ovina em duas diferentes fases de lactação e a frequência desta enfermidade nas diferentes raças. Além disso, buscou-se definir as características diagnósticas da contagem de células somáticas (CCS) para o diagnóstico da mastite subclínica ovina, adotando diferentes classes de contagens de CCS, assim como estabelecer um valor de triagem para a CCS como método diagnóstico. O trabalho experimental foi realizado em um rebanho formado por 407 ovelhas das raças Santa Inês, Texel, Ile de France e Dorper, localizado na Embrapa Pecuária Sudeste em São Carlos, São Paulo. O *California Mastitis Testis* (CMT) foi realizado para o diagnóstico preliminar da mastite. Após a antissepsia dos tetos, amostras de leite foram colhidas no início de lactação e ao desmame, em duas parições consecutivas para confirmação da etiologia infecciosa da doença por meio de análises microbiológicas e para a determinação da CCS. Para cada uma das raças os valores de CCS foram divididos em quatro classes. O total de 1457 metades mamárias foi investigado, das quais 203 (13,9%) apresentaram mastite subclínica. *Estafilococos* coagulase-negativos (ECN) foram os agentes etiológicos com maior ocorrência isoladamente e em associação, 58,1% e 60,6%, respectivamente, seguidos por *Streptococcus* spp. (19,7%). Dentre os ECN, a espécie encontrada com maior frequência foi *Staphylococcus xylosus* (87,7%). A raça Santa Inês apresentou significativamente maior número de casos de mastite subclínica ($p < 0,05$). Boas e ótimas concordâncias para associação entre CMT e CCS foram obtidos para todas as raças, exceto Ile de France. Diferentes pontos de corte para CCS foram determinados para as raças estudadas em ambas as fases de lactação. Maiores valores de sensibilidade e especificidade para a CCS foram obtidos para as raças Ile de France e Dorper na lactação, enquanto ao desmame destacaram-se as raças Texel e Dorper. Não houve concordâncias ideais ao comparar as reações de CMT e CCS para a triagem da mastite subclínica. Os resultados do teste variaram de acordo com a raça ovina. A CCS pode ser utilizada para triagem da mastite subclínica em ovelhas de corte de acordo com a prevalência da doença em cada raça, auxiliando técnicos e produtores a melhorar o controle da enfermidade nos rebanhos.

Palavras-chave: Agentes etiológicos, leite, ovelhas, sanidade

SOMATIC CELL COUNT FOR DIAGNOSIS OF SUBCLINICAL MASTITIS IN DIFFERENT BREEDS OF SHEEP IN TWO LACTATION PERIODS

ABSTRACT - This study aimed to establish the infectious etiology of subclinical mastitis in two different stages of lactation and the frequency of this disease in different breeds sheep. Furthermore, we sought to define the diagnostic characteristics of somatic cell count (SCC) for the diagnosis of subclinical mastitis in these sheep breeds, adopting different classes of SCC, and establish a screening value for SCC as diagnostic method. The experimental work was carried out in a herd composed of 407 sheep of Santa Inês, Texel, Ile de France and Dorper breeds, located in the Embrapa Southeast Livestock, São Carlos, São Paulo. The California Mastitis Test (CMT) was performed for a preliminary diagnosis of mastitis. After antisepsis of the teats, milk samples were collected in early lactation and weaning in two consecutive calvings for confirmation of infectious etiology of the disease by microbiological analysis and the determination of SCC. For each breed, CCS values were divided into four classes. We investigated 1,457 mammary glands, from which 203 (13.9%) had subclinical mastitis. Coagulase-negative staphylococci (CNS) were the etiological agents with higher occurrence isolated or in an association, 58.1% and 60.6%, respectively, followed by *Streptococcus* spp. (19.7%). Among the CNS, the most frequent species was *Staphylococcus xylosus* (87.7%). The Santa Inês breed had a significantly higher number of cases of subclinical mastitis ($p < 0.05$). Good and excellent concordances to the association between CMT and SCC were obtained for all breeds except Ile de France. Different cutoff points to SCC were determined for the studied breeds in both stages of lactation. Higher sensitivity and specificity of SCC cutoff points were obtained for the Ile de France and Dorper breeds during lactation, where as weaning stood out the Texel and Dorper breeds. There were no complete concordances to compare CMT and SCC reactions to the screening of subclinical mastitis. The test results varied according to the breed of sheep. The SCC can be used for screening of subclinical mastitis in sheep according to the prevalence of the disease in each breed, assisting technicians and producers to improve the control of the disease in herds.

Keywords: etiological agents, milk, sheep, sanity

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Possíveis resultados de um teste diagnóstico para a identificação de uma doença.....	38
Tabela 2. Micro-organismos isolados de amostras de leite de metades mamárias de diferentes raças ovinas durante a lactação.	39
Tabela 3. Micro-organismos isolados de amostras de leite de metades mamárias de diferentes raças ovinas ao desmame.	40
Tabela 4. Espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos isolados em amostras de leite pertencentes a diferentes raças ovinas.	42
Tabela 5. Características diagnósticas de pontos de corte de CCS para detecção de mastite subclínica em diferentes raças ovinas na lactação.	44
Tabela 6. Características diagnósticas de pontos de corte de CCS para detecção de mastite subclínica em diferentes raças ovinas ao desmame.....	45
Tabela 7. Índices de concordâncias (Kappa – k) entre diferentes graus de reação ao CMT e limites de CCS ($\times 10^3$ células/ mL de leite) no diagnóstico da mastite subclínica em ovelhas de diferentes raças na lactação e no desmame.....	47

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ovelhas das raças Santa Inês (A), Texel (B), Ile de France (C) e Dorper (D) pertencentes ao rebanho experimental.	32
Figura 2. Resultado negativo ao CMT (A) e reação positiva ao CMT, escore 2+ (B).	33
Figura 3. Colônias amarelas sugestivas de <i>Staphylococcus</i> spp. em ágar sangue ovino a 5% e Cocos Gram-positivos em formato de cacho de uvas visualizados na colocação de Gram (aumento de 1000 vezes).	34
Figura 4. Prova da catalase ilustrando resultados negativo e positivo ao teste e Prova da coagulase lenta com uma amostra positiva, controles negativo e positivo (sequenciados de cima para baixo).....	34
Figura 5. Fluxograma para a identificação da espécie de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos, proposta por Kloos e Schleifer (1975).	36
Figura 6. Pontos de corte para CCS e curva TG-ROC de acordo com os resultados de contagens celulares e exames microbiológicos em leite de metades mamárias de ovelhas Santa Inês durante a lactação (A) e desmame (B).	49
Figura 7. Pontos de corte para CCS e curva TG-ROC de acordo com os resultados de contagens celulares, considerado valores superiores à 1.000.000 como positivo para mastite subclínica e exames microbiológicos em leite de metades mamárias de ovelhas Texel durante a lactação (A) e desmame (B).....	50
Figura 8. Pontos de corte para CCS e curva TG-ROC de acordo com os resultados de contagens celulares, considerado superiores à 1.000.000 como positivo para mastite subclínica e exames microbiológicos em leite de	

metades mamárias de ovelhas Ile -de- France durante a lactação (A) e desmame (B).....52

Figura 9. Pontos de corte para CCS e curva TG-ROC de acordo com os resultados de contagens celulares, considerado superiores à 1.000.000 como positivo para mastite subclínica e exames microbiológicos em leite de metades mamárias de ovelhas Dorper durante a lactação (A) e desmame (B).....53

1. INTRODUÇÃO

No início da ovinocultura no Brasil o objetivo era a produção de lã e essa meta ocorreu até o início da década de 90, quando os animais foram selecionados como dupla aptidão desenvolvendo ovinos deslanados da raça Santa Inês, na região Nordeste, que se expandiram para outras regiões como Sudeste e Centro-Oeste (FONSECA et al., 2011).

Em decorrência da valorização da carne ovina, a criação deixou de ser vista como uma atividade de subsistência e passou a ser reconhecida como uma atividade empresarial e especializada, ocupando posição de destaque no cenário nacional. Em 2012, o Brasil possuía um rebanho estimado em 16.789.492 de cabeças, sendo a região Sudeste a que apresentou o maior índice de expansão com 744.426 animais, dos quais 57,4% estão no estado de São Paulo. Apesar de tal expansão ter ocorrido em virtude da escassez de carne no mercado local, a quantidade produzida atende apenas 10% do consumo estadual (ANUALPEC, 2014).

A carne ovina consumida no Brasil é oriunda de outros países. Em 2014, as importações brasileiras atingiram a marca recorde de 9,93 mil toneladas, um aumento de 12% comparado ao ano de 2013. Do total importado, cerca de 91,4% é oriunda do Uruguai, enquanto o restante provém da Argentina, Chile e Nova Zelândia (SANTOS, 2015).

Com a mudança do sistema de criação do extensivo para o intensivo, houve um maior investimento em melhoramento genético e cruzamentos entre raças ovinas aumentando o interesse dos pesquisadores em conhecer mais sobre a composição e produção do leite de ovelha, sendo a principal fonte nutricional nas primeiras semanas de vida dos cordeiros (FONSECA et al., 2011).

O crescimento da ovinocultura é acompanhado pelo surgimento de enfermidades que comprometem a produtividade do rebanho. Dentre elas, a mastite é de suma importância por acarretar grandes prejuízos econômicos com os descartes de ovelhas decorrente da redução de sua vida útil, pela perda ou comprometimento da glândula mamária e consequentemente a redução na produção e composição do leite, o qual interfere no crescimento do cordeiro e do

aumento do percentual de mortes, além de despesas com assistência veterinária e medicamentos.

A contagem de células somáticas (CCS) é um diagnóstico indireto e muito utilizado para avaliar a saúde da glândula mamária e presença de mastite em ovelhas, mas falta uma determinação do limiar de CCS aceitável para a espécie ovina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Raças de ovinos de produção de corte

2.1.1. Santa Inês

A raça Santa Inês foi criada na região Nordeste do Brasil, em 1950, e sua origem discutida por estudiosos que acreditam ser o resultado do cruzamento das raças Morada Nova e Bergamácia. Porém, há relatos que afirmam relação entre animais crioulos trazidos pelos espanhóis e portugueses, animais deslanados vindos da África, que contribuíram para a formação da maioria das raças deslanadas do Brasil, a raça italiana Bergamácia e a Morada Nova (PESSOA et al., 2003). Paiva et al. (2005) verificaram por meio da técnica *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD-PCR) que as raças Bergamácia e Rabo Largo possuem maior proximidade genética com a raça Santa Inês que as raças Morada Nova e Somalis, respectivamente.

É um animal rústico de porte grande, desprovido de lã, possui pelos curtos e sedosos, excelente qualidade de carne e baixo teor de gordura podendo na fase adulta, os machos atingirem até 120 Kg de peso vivo e as fêmeas até 80 Kg. Criam muito bem seus cordeiros, tanto pela alta produção leiteira quanto pela habilidade materna. Também, tem como principal característica a produção de cordeiros ao longo do ano, por ser poliéstrica anual, ocorrendo normalmente partos duplos. Da

mesma forma, na região Sudeste, também foi observado que ovelhas deslanadas oriundas do Nordeste não apresentaram sazonalidade reprodutiva (LAZIA, 2012).

As fêmeas possuem período de lactação mais longo em comparação a outras raças de corte e a conformação dos úberes em alguns animais possui implantação insatisfatória. Assim, o desmame precoce aumenta a ocorrência de leite residual nas glândulas mamárias e consequentemente o surgimento de mastite será maior (LAZIA, 2012).

2.1.2. Texel

Introduzida no Brasil em 1972, a raça Texel possui origem da Ilha Texel, Holanda, onde no final do século XIX e início do século XX passaram a cruzar as ovelhas de porte pequeno, tardias e pouco desenvolvidas, com reprodutores de raças inglesas como Lincoln, Border Leicester, Leicester, Southdown, Hampshire e Wensleydale e depois de um tempo voltaram a utilizar reprodutores puros da antiga raça existente na ilha (TEIXEIRA, 2008).

Considerados animal de dupla aptidão, rústicos, com conformação corporal, precocidade, prolificidade, obtendo assim grande potencial para produzir carne magra e de boa qualidade, sendo útil como raça paterna em cruzamento industrial para ganho de peso, uma vez que é mais selecionada para produção de carne e consequentemente apresenta maior velocidade de crescimento e engorda (GARCIA; PEREZ; TEXEIRA, 2003).

Possuem porte entre médio e grande, com massa muscular bem evidente, arredondada e volumosa, podendo os machos pesarem até 130 Kg e as fêmeas até 80 Kg. Têm como característica a cabeça coberta apenas com pelos brancos, curtos e sem brilho e o corpo coberto por uma boa quantidade de lã (SEBRAE, 2013).

2.1.3. Ile de France

A raça Ile de France foi introduzida no Brasil em 1973 e se destacou popularmente dentre as raças ovinas de corte, principalmente no estado de São

Paulo. Teve origem em 1816, na bacia parisiense chamada Ile de France, na França, onde buscou unir a qualidade da lã e da carne através do cruzamento de ovelhas da raça Merino Rambouillet com reprodutores New Leicester, formando a raça Alfort e só em 1923 passou a se chamar Ile de France (TEIXEIRA, 2008).

Animais de dupla aptidão, precoces, produzem carcaça de qualidade e pesada, constituição robusta e conformação harmoniosa, caracterizando-se pelo excelente ganho de peso em animais jovens. Os machos chegam a pesar 160 Kg e as fêmeas 80 Kg, sendo muito férteis, prolíferas, com parições em diferentes épocas do ano. Apresentam os membros desprovidos de lã abaixo do jarrete e joelho, na face possuem pelos brancos, com um topete de lã no ápice da cabeça e focinho róseo (TEIXEIRA, 2008; SEBRAE, 2013).

Esta raça produz menor taxa de mortalidade nos cordeiros em comparação com ovelhas das raças Suffolk e Corriedale, com crias mais pesadas ao nascer e ao desmame, com valores médios de 4,65 e 21,95 kg, respectivamente, e elevado ganho de peso pós-desmame, favorecendo seu uso em sistemas de cruzamento industrial com raças não especializadas (RODA; SANTOS; CUNHA, 1993; RIBEIRO et al., 2002).

2.1.4. Dorper

A raça Dorper ingressou no Brasil em 1998, mas foi na década de 40, na África do Sul, que se teve a iniciativa dos cruzamentos entre matrizes Cabeça Negra da Pérsia e Dorset Horn, dando origem ao Dorper e logo em seguida se deu origem ao White Dorper, tendo em sua conformação além destas duas raças, mais o cruzamento de Dorset Horn e Van Rooy (BRITO, 2012).

Desenvolvida com o objetivo de criar uma raça de maior produção de carne, manejo simples, desprovida de muita cor e adaptados ao clima semiárido, com fêmeas de boa habilidade materna, desempenho reprodutivo satisfatório e que não apresentem problemas ao parto, produzindo cordeiros prontos para o abate aos 4 ou 5 meses de idade, com uma carcaça aceitável. Possuem boa conversão alimentar e resistência contra chuva, frio, vento, altas temperaturas e radiação (MILNE, 2000).

Os ovinos White Dorper machos chegam a pesar 110 Kg e as fêmeas 70Kg, apresentam crescimento acelerado, carcaça de boa conformação e musculatura, precocidade sexual, comportamento poliétrico contínuo, sobrevivência de crias de 90%, rendimentos de carcaça de 48,8 a 52,6% e deposição precoce de gordura (SOUZA; LEITE, 2000; CLOETE et al., 2007; ACCO-SC, 2013).

2.2. Anatomia da glândula mamária ovina

As glândulas mamárias são glândulas sudoríparas apócrinas modificadas, sendo cada uma delas composta por lóbulos mamários glandulares independentes, formados por glândulas tuboalveolares (DYCE, 2010). Embora comum aos mamíferos, a glândula mamária apresenta variações espécie-específica, como aspecto e as quantidades referentes aos componentes secretados. Por outro lado, as particularidades inerentes à glândula mamária da ovelha ainda não estão totalmente elucidadas (BLAGITZ, 2007; GUARANÁ et al., 2011).

Composto por duas glândulas, cada qual com um teto, com pesos que variam de 0,9 Kg a 2,24 Kg, o sistema mamário em ovelhas é sustentado por ligamentos suspensores mediais e laterais (ANDERSON; HULL; PUGH, 2005; SWANSON et al., 2008). A inervação e a irrigação sanguínea são também independentes para cada glândula. A artéria pudenda externa é responsável pelo fornecimento de sangue arterial, enquanto as veias pudendas externas removem o sangue venoso, enquanto os nervos íleoepigástrico e íleoinguinal são responsáveis pela inervação do sistema (HEIDRICK; RENK, 1969).

A glândula mamária é composta por parênquima glandular e tecido conjuntivo entrelaçados. O parênquima mamário é a unidade básica que compõe os alvéolos, os quais apresentam as estruturas necessárias à síntese e escoamento do leite para os ductos excretores (DYCE, 2010). As cisternas da glândula e do teto são responsáveis pelo armazenamento do leite produzido. Apesar de a cisterna da glândula ser contínua a glândula do teto, há entre elas o anel venoso de *Furstenberg*, o qual circula a base do teto (HEIDRICK; RENK, 1969).

O canal do teto separa as porções interna e externa de cada teto, sendo a região de fusão da cisterna com o canal do teto denominada de roseta de *Furstenberg*. O canal do teto é revestido por cinco camadas, a mais interna, composta por tecido epitelial e mucosa; envolvendo as camadas internas há uma camada de tecido conjuntivo, altamente vascularizada e a camada externa é a camada muscular, constituída de fibras musculares circulares e longitudinais, externamente, o teto é revestido por epitélio escamoso estratificado (CORREIA, 2013).

2.3. Defesa da glândula mamária

Fisiologicamente natural, após a mamada do cordeiro ou ordenha ocorre o relaxamento do canal do teto facilitando a ocorrência de mastite infecciosa devido à invasão de agentes patogênicos pelo canal do teto e da sua multiplicação na cisterna da glândula mamária. O mecanismo de defesa da glândula mamária apresenta-se em três tipos: anatômico, celular e humoral (RADOSTITS et al., 2007).

As defesas anatômicas são a primeira barreira que impede a invasão da glândula, representada pelo esfíncter do canal do teto e pelo seu revestimento em queratina. O esfíncter garante o fechamento do canal do teto entre ordenhas, impedindo à entrada de agentes estranhos. A queratina formada pela descamação das células do epitélio estratificado da parede do canal do teto apresenta substâncias lipídicas com atividade bactericida e bacteriostática e proteínas catiônicas em sua camada, prevenindo a movimentação e multiplicação das bactérias através do ducto papilar (AMARAL; ESCRIVÃO, 2005; OVIEDO-BOYSO et. al., 2006).

A defesa celular da glândula mamária é composta por leucócitos e células epiteliais. Os leucócitos são representados por neutrófilos que são as células em maior número no leite de glândulas mamárias com mastite. Ainda estão presentes macrófagos, células natural-killer e células dendríticas (OVIEDO-BOYSO et. al., 2006).

Quando uma bactéria consegue invadir a glândula mamária, macrófagos e células epiteliais atuam fazendo o reconhecimento dos agentes patogênicos pela estrutura da parede celular bacteriana. Assim, as células imunitárias ativam os receptores, desencadeando a reação inflamatória e liberando mediadores da inflamação, ocorrendo o terceiro mecanismo de defesa da glândula mamária: defesa humoral (OVIEDO-BOYSO et. al., 2006; RADOSTITS et. al., 2007).

Inicialmente, os macrófagos e células epiteliais liberam fatores quimiotáticos e citocinas (IL-1 β , IL-8, C5a, TNF- α e GM-CSF), necessários para recrutar neutrófilos polimorfonucleares (PMN) da circulação sanguínea para o leite. Posteriormente, os próprios neutrófilos libertam mediadores que atraem mais neutrófilos ao local da inflamação (ANDREWS et al., 2008; CARNEIRO; DOMINGUES; VAZ, 2009).

Os neutrófilos iniciam a fagocitose, que pode ocorrer por opsonização, quando o receptor Fc, presente nos neutrófilos, liga-se à mesma região das imunoglobulinas (IgG2 e IgM) associadas aos micro-organismos, facilitando assim a fagocitose. Os componentes do complemento, C3 e C3b, são também opsoninas que facilitam a fagocitose pelos neutrófilos, sendo mais eficiente nas bactérias Gram-negativas. Quando não ocorre por opsonização, a expressão do gene CD14 faz a ligação dos neutrófilos à camada de lipopolissacarídeos da parede das bactérias, facilitando a fagocitose. Finalmente, os neutrófilos sofrem apoptose para eliminação total dos micro-organismos (ANDREWS et al., 2008; CARNEIRO; DOMINGUES; VAZ, 2009).

Se a fagocitose não resultar na morte dos agentes infecciosos, há a intervenção dos linfócitos T e B e monócitos, através de mediadores da inflamação, mantendo-se os neutrófilos como sendo a principal célula imunitária (OVIEDO-BOYSO et. al., 2006).

Os macrófagos também realizam a fagocitose, semelhante aos neutrófilos, apresentam-se em menor concentração durante a inflamação causada pela mastite e levam o antígeno aos linfócitos T (COUTINHO, 2014).

A presença de toxina produzida pelos micro-organismos patogênicos e de mediadores da resposta inflamatória na glândula mamária acarretam a diminuição da síntese de leite por danificar os lóbulos produtores do leite e aumento da contagem de células somáticas, pelo aumento de PMN no leite (BARREIRA, 2008).

Outras substâncias antimicrobianas inespecíficas que atuam isoladamente ou em associação com as imunoglobulinas presentes no leite e grânulos dos neutrófilos são: as glicoproteínas chamadas lactoferrina, que se ligam a íons de ferro e bicarbonato e atuam como bactericida ao tornar o ferro indisponível na glândula mamária, a proteína bactericida conhecido como lisozima, que hidrolisa os peptideoglicanos da parede celular das bactérias e ocorre a lise celular, sendo as Gram-positivas mais sensíveis, enzimas como a lactoperoxidase com propriedades bactericidas e bacteriostáticas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente, dependentes da presença de tiocianato e peróxido de hidrogênio e N-acetil- β -D-glucosaminidase, o qual possui concentração elevada na presença de inflamação e pode ser detectada também em mamas saudáveis (RAINARD; RIOLLET, 2006; CARNEIRO; DOMINGUES; VAZ, 2009).

2.4. Mastite Ovina

A mastite é classicamente definida como inflamação da glândula mamária, caracterizada por alterações físico-químicas e microbiológicas no leite que ocasionam prejuízos quantitativos e qualitativos, com aumento de células somáticas.

O desencadeamento da mastite está vinculado à complexa tríade epidemiológica: animal, agente etiológico e meio ambiente. Os fatores determinantes que influenciam na susceptibilidade à mastite incluem: resistência natural da glândula mamária, estágio da lactação, genética, idade do animal, espécie, infectividade e patogenicidade do agente (PRESTES; FILAPPI; CECIM, 2002).

Pode decorrer por traumatismo, fisiológicos ou alérgicos, mas tem origem predominantemente nas infecções bacterianas e pode manifestar-se sob forma clínica e subclínica (DELLA LIBERA et al., 2001).

A mastite clínica caracteriza-se por alterações visíveis na glândula mamária como aumento de volume do quarto infectado, endurecimento, dor, aumento de temperatura, rubor e pela ocorrência de alterações visíveis no leite como a presença de grumos de fibrina, pus, sangue e qualquer alteração das características físicas do leite (MANGIERI JUNIOR, 2010).

A mastite subclínica é considerada a forma mais preocupante, por permanecer silenciosa no rebanho sem alterações evidentes do úbere e leite com aspectos macroscópicos normais, porém com efeitos significativos tanto na produção quanto na qualidade e na composição do leite. Apresenta aumento de células somáticas e se caracteriza pela ausência de sinais clínicos, o que dificulta a sua detecção e consequente intervenção terapêutica. A mastite subclínica apresenta resultado positivo ao CMT, pode ser detectada pela contagem direta ou indireta de células somáticas no leite, sendo confirmada pelo exame microbiológico (RADOSTITS et al., 2002; RIBEIRO et al., 2003).

A ação negativa sobre o leite é capaz de prejudicar a produção da carne ovina por meio de perda parcial ou total da capacidade funcional das glândulas mamárias, dependendo do agente microbiano envolvido, levando ao descarte destes animais ou até mesmo a morte pela enfermidade, redução na produção e alteração nos componentes do leite, mortes por inanição dos cordeiros, redução no crescimento dos cordeiros na ausência de alimentação suplementar, com diminuição dos lucros e aumento dos custos do trabalho (MENDONÇA; AFONSO; COSTA, 2005; COUTINHO et al., 2006; PEREIRA et al. 2014).

2.5. Etiologia Infecciosa da Mastite Ovina

Os agentes etiológicos relacionados a mastite aproveitam o relaxamento do esfíncter do óstio papilar após a mamada do cordeiro ou após a ordenha facilitando a entrada de patógenos no canal do teto e sua instalação na glândula mamária (GUARANA, 2011). As infecções intramamárias na maioria das vezes são de origem bacteriana, mas podem ser causadas por micoplasmas ou lentivírus (BERGONIER; BERTHELOT, 2003).

Com base nas fontes de infecção e suas características ou via de transmissão, agentes etiológicos foram subdivididos em contagiosos e ambientais. Os agentes contagiosos são transmitidos na ordenha ou no momento em que a cria mama, representados principalmente por *Staphylococcus aureus*, Estafilococos coagulase-negativos (ECN), *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*,

Streptococcus dysgalactiae e *Corynebacterium bovis*. Estas bactérias são consideradas as principais causadoras de mastite subclínica em ovelhas (DRESCHER et al., 2010).

Os agentes ambientais, podem ser isolados no solo, camas, água contaminada, entre outros e ocasionam mastites geralmente durante o período seco representados principalmente por enterobactérias como *Escherichia coli*, *Klesbsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes* (COUTINHO et al., 2006).

Nas mastites clínicas, os principais micro-organismos em casos isolados ou em surtos são *Staphylococcus aureus*, ECN, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mannheimia haemolytica*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Clostridium perfringens* e *Aspergillus fumigatus* (COUTINHO et al., 2006; DRESCHER et al., 2010).

Staphylococcus aureus merece atenção especial, pois é responsável por dois tipos de mastites: a subclínica e a gangrenosa. Produzem algumas toxinas que contribuem para a patogênese da mastite e também estão associadas a doenças alimentares. São facilmente destruídos por tratamentos térmicos como a pasteurização, mas suas enterotoxinas termoestáveis permanecem ativas nos alimentos tornando-se um risco para a saúde do consumidor (PEIXOTO et al., 2010; COUTINHO, 2014).

Os estafilococos alcançam o tecido mamário por lesões ou feridas na superfície do teto. Após a entrada há o desenvolvimento de lesões agudas ou crônicas, estando estas relacionadas: ao fator de aderência à superfície interna do canal do teto; à presença de anticorpos para a alfa toxina; ao número de neutrófilos na secreção mamária; à produção de beta toxina e coagulase; à frequência de ordenha e à capacidade da bactéria em utilizar nutrientes dentro da glândula mamária (GOMES, 2007).

Staphylococcus aureus, ao penetrar na glândula mamária, é fagocitado por neutrófilos e se aloja no interior destes, ao destruí-los, inicia novas infecções. Este mesmo agente ainda possui a capacidade de encistamento, formando focos encapsulados e de difícil acesso à antibioticoterapia que não possua boa dispersão, o que favorece o desenvolvimento de processos subclínicos e crônicos (GUARANA, 2011; KOBAYASHI et al., 2010). Produzem diversos fatores de virulência, tais como

as leucotoxinas, capazes de matar os leucócitos polimorfonucleares e os monócitos. No entanto, o desencadeamento da doença causada pelo micro-organismo depende do estado do sistema imunológico do portador (CONTRERAS et al., 2007; RIVAS et al., 2007).

Estafilococos coagulase-negativos são considerados patógenos menores que *S. aureus*, mas possuem maior prevalência na etiologia da mastite subclínica ovina. Podem produzir mastite clínica, significativo aumento de CCS, mastite subclínica persistente e enterotoxinas termoestáveis (COUTINHO et al., 2006; PEIXOTO et al., 2010). As espécies de maior prevalência são: *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. xylosus*, *S. hyicus* e *S. haemolyticus* (GOMES, 2007; LUCHEIS; HERNANDES; TRONCARELLI, 2010; EL-JAKEE et al., 2013).

Não são classificados como agentes ambientais nem contagiosos, mas designados como microbiota oportunista da pele do teto, uma vez que estes agentes são normalmente encontrados na pele do úbere do animal, podendo ter acesso ao interior da glândula mamária e resultar em infecções. Eles ocasionam aumento da CCS em cerca de duas a três vezes acima dos valores normais das glândulas mamárias sadias. Além disso, estes podem encontrar-se em associação a outros patógenos causadores de mastite (SANTOS, 2009).

A sensibilidade *in vitro* à novobiocina tem sido proposta como critério de classificação de ECN em ovelhas, pois está associada à patogenicidade em função de seus fatores de virulência nestas espécies sugerindo a divisão em Estafilococos coagulase-negativos resistentes à novobiocina (ECNRN), que comportam-se como agentes patogênicos de menor prevalência, originando pequenas alterações na CCS e ligeira redução na produção de leite e os Estafilococos coagulase-negativos sensíveis à novobiocina (ECNSN) considerados agentes patogênicos de maior importância, induz importantes alterações na CCS e reduções consideráveis na produção de leite (GONZALO et al., 2002)

Arsenault et al. (2008) sugerem a existência de uma ligação entre a mastite clínica e a mastite subclínica de ovelhas, observando predominância de *S. aureus* e ECN nas duas apresentações da mastite, podendo haver a possibilidade da existência de fatores de risco em comum ou uma forma de atuar como predisponente da outra.

Streptococcus spp. possuem grande importância etiológica, considerados como o segundo grupo de micro-organismos que mais acometem glândulas mamárias, depois dos *Staphylococcus* spp. Estas bactérias são patógenos com algumas cepas capazes de causar mastite crônica no rebanho, sendo geralmente detectadas quatro espécies: *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. bovis* e *S. uberis* (SANTOS et al., 2007; WHITE, 2007).

Quando há presença de cápsula, esta compõem-se de polissacarídeos e são antifagocíticas, contendo várias proteínas de superfície que são responsáveis pela aderência do *Streptococcus* spp. à matriz extracelular e são fatores de virulência, o qual desencadeia processos inflamatórios que podem variar de infecções subclínicas até formação de abscesso, supuração e fibrosamento da glândula mamária (WHITE, 2007).

Corynebacterium spp. são bacilos gram positivos, considerados patógenos de menor importância e estão associados com a produção de infecções subclínicas com baixa elevação das contagens celulares e incapacidade de produzir infecções persistentes de duração prolongada, podendo levar a diagnósticos falso positivos.

Com paredes celulares contendo, ácido arabinogalactano, micólicos e ácido mesodiaminopimélico, apresentam uma elevada quantidade de lipídios, o que torna as células hidrofóbicas e contribui para sobrevivência à leucotoxidade e dentro de fagócitos (BIBERSTEIN; HIRSH, 2003). Essas bactérias podem alojar-se apenas no canal do teto e/ou permanecer no úbere por curto período de tempo.

O isolamento de micro-organismos da família Enterobacteriaceae associada à mastite clínica é um achado comum e a *Klebsiella* spp. e *Escherichia coli* são as bactérias mais importantes, encontradas principalmente no ambiente contaminado com fezes (PEIXOTO et al., 2010).

Casos repetitivos de mastites podem ser devidos à infecção persistente ou reinfecções, alternando manifestações subclínicas e clínicas. No entanto, tendo em vista a heterogeneidade de *Escherichia coli* classificada como patógeno oportunista de origem ambiental, os casos de infecções repetidas ocorrem normalmente por diferentes estirpes. As enterobactérias sobrevivem em ambientes sombreados e úmidos e embora possuam sensibilidade a uma ampla variedade de

antimicrobianos, adquirem resistência muito rapidamente por plasmídeos (HIRSH, 2003).

Outros agentes causadores de mastite em ovelhas podem ser isolados, como os gêneros *Micrococcus*, *Nocardia*, *Bacillus*, *Enterobacter* e *Pseudomonas aeruginosa*, além de fungos, algas (COUTINHO et al., 2006; ARSENAULT et al., 2008).

2.6. Testes para o diagnóstico da mastite subclínica em ovelhas

2.6.1. California Mastitis Test (CMT)

O *California Mastitis Test* é um teste prático, econômico e de fácil realização, originalmente desenvolvido para a espécie bovina é considerado um método indireto para detecção da mastite subclínica. Utiliza um reagente constituído por detergente tenso ativo aniônico neutro e indicador de pH, o púrpura de bromocresol. O detergente rompe a membrana das células presentes na amostra de leite e libera o material nucleico (DNA) (ANDERSON; HULL; PUGH, 2005).

Após a homogeneização da mistura (reagente + leite), estima-se a contagem de células somáticas de acordo com a viscosidade da reação em: negativo (sem alteração), 1+ (reação fraca), 2+ (reação média), e 3 + (reação intensa). A alteração do pH é indicada pela mudança da cor original do corante (BOLSANELLO et al., 2009).

Embora exista uma boa correlação entre o CMT e o cultivo bacteriológico positivo, ainda são significativas as culturas negativas em amostras reagentes ao CMT. Este fato pode ser justificado pela maior celularidade na espécie ovina que na bovina, pela ausência de isolamento nos meios de cultura convencionais de micro-organismos mais exigentes, pela eliminação intermitente dos agentes bacterianos, pela participação de algumas enzimas ou proteínas do leite (lisozima e lactoferrina), que poderiam inibir a detecção dos patógenos e pela administração prévia de antimicrobianos (BLAGITZ, 2007; CONTRERAS et al., 2007).

Porém, o CMT tem demonstrado ser o teste indireto mais adequado às condições de campo, como indicador de mastite subclínica em ovelhas e está associado ao aumento do número de células somáticas e isolamento bacteriano, podendo variar de acordo com a raça do animal, patogenicidade das bactérias, rebanho e o operador (McDOUGALL et al., 2001; OLIVEIRA, 2007). Este teste pode ser muito útil como triagem para identificação de ovelhas com mastite subclínica, considerando que as chances de seleção de animais com infecção intramamária são maiores quando amostras consideradas escores de CMT de 1+ ou superiores são selecionadas (MENZIES; RAMANOON, 2001).

Almeida (2007), em estudo da mastite subclínica em ovelhas Santa Inês no Agreste Meridional do estado de Pernambuco verificou forte associação entre o teste do CMT e o exame microbiológico, caracterizando a tendência linear crescente entre os resultados obtidos em ambas as provas, indicando maior probabilidade de isolamento bacteriano à medida que se intensifica a reação do CMT.

Para Watkins; Burriel e Jones (1991) e Maisi; Junttila e Seppanen (1987) houve uma boa correlação do CMT com os resultados da contagem de células somáticas e do exame bacteriológico do leite, demonstrando que o teste pode ser confiável e prático em animais de aptidão para carne.

2.6.2. Contagem de Células Somáticas

A contagem de células somáticas (CCS) é considerada uma importante ferramenta na avaliação da saúde da glândula mamária e da qualidade do leite. São representadas por células epiteliais de descamação e leucócitos de origem sanguínea que se deslocam para o interior da glândula mamária a fim de combater agressões externas como infecções causadas por micro-organismos, traumas e substâncias químicas. Assim, a redução da produção, alteração da composição do leite e aumento nas contagens de células somáticas indicam a presença de mastite (BRITO, 2004; PEIXOTO, 2009).

A CCS também apresenta variações devido a fatores não infecciosos como o número e estágio de lactação, porém esses efeitos são menores quando

comparados aos das infecções intramamárias. As células somáticas provenientes do leite de ovelhas sadias são compostas por 2-3% de células epiteliais, 10-35% de neutrófilos, 45-85% de macrófagos e 10-17% de linfócitos do total (BERGONIER; BERTHELOT, 2003).

As ovelhas possuem glândulas com secreção apócrina, por esse motivo secretam corpúsculos devido à descamação das células epiteliais que revestem os alvéolos. Muitos desses corpúsculos são anucleados e possuem a morfologia e diâmetro parecidos com dos leucócitos, por isso, muitas vezes são confundidos com células somáticas ao utilizar a contagem eletrônica (GOMES et. al., 2010; BLAGITZ et. al., 2013).

Os métodos de contagens mais utilizados são a CCS automática e a CCS microscópica. É necessário que as amostras para a CCS automática sejam bem armazenadas em frascos próprios, com conservantes ideais (bronopol) para o laboratório especializado. A preservação, a temperatura e o tipo de armazenamento das amostras podem influenciar no número de células (BLAGITZ, 2007). A CCS microscópica é um método direto, o qual proporciona contagem total e definição do predomínio celular na secreção. A coloração com verde de metil e pironina-Y é específica para células nucleadas, excluindo a presença dos corpúsculos citoplasmáticos presentes no leite de ovelhas (GOMES et al., 2010).

A contagem eletrônica de células somáticas é um processo caracterizado pela sua rapidez e precisão, realizada pela técnica de citometria de fluxo que utiliza-se aparelho com sistema óptico para detecção e contagem das células inflamatórias do leite, o qual é misturado com brometo de etídio, um corante que associado ao DNA, cora o núcleo das células somáticas, as quais emitem pulsos luminosos. Esses pulsos de luz são convertidos em pulsos elétricos, amplificados, eletronicamente filtrados e ordenados por tamanho, para que especifiquem as células somáticas. O computador conta os pulsos elétricos, como células inflamatórias (leucócitos) e os números encontrados são expressos em mil células por mililitro de leite (células/mL) (MANUAL BENTLEY, 1994).

Essa técnica é passível de adequação, por realizar a padronização dos aparelhos com leite de vaca, o que, apesar de garantir menor custo na realização do

teste, desconsidera as diferenças entre as características celulares das espécies (OLIVEIRA, 2007).

A CCS pode sofrer oscilações devido a fatores fisiológicos como raça, idade da fêmea, estágio de lactação, número de lactações, estresse, frações do leite, estado nutricional e por ação de fatores patogênicos como infecção da glândula mamária (BLAGITZ, 2007; FONSECA et. al., 2011). É também afetada, indiretamente, pela nutrição, ao fornecer dietas balanceadas com vitamina A, E e selênio, assim o estímulo à resposta imunológica pelas células da glândula mamária é aumentada e há diminuição da susceptibilidade das metades mamárias ao aparecimento de processos inflamatórios e infecciosos (FONSECA et. al., 2011).

De acordo com Paape et. al., (2001) e Barillet et al., (2001), citados por Brito (2004), o valor aceitável para CCS em leite de ovelha nos Estados Unidos é de 750.000 células / mL e na França as indústrias preconizam um valor de 400.000 células / mL de leite oriundo de ovelhas da raça Lacaune com aptidão para a produção de leite.

A contagem de células somática está sendo utilizada para controle de mastite em ovelhas na Espanha, baseando-se nas classificações de bovinos leiteiros. Entretanto, existem relatos que a CCS do leite de ovelha tem menor relação com condições patológicas, ocorrendo CCS >1.000.000 /ml em ovelhas de raça de corte com metades mamárias sadias, principalmente no final da lactação (FONSECA et. al., 2011).

As amostras de leite que apresentam valores inferiores a 500×10^3 células/mL com isolamento microbiológico são encontradas devido a presença de agentes etiológicos com baixa patogenicidade e amostras com contagens superiores a 500×10^3 células/mL e isolamento microbiológico negativo, deve-se a processos inflamatórios não infecciosos, a tratamentos recentes com antimicrobianos, além, do não isolamento do micro-organismo em apenas um exame ou da presença de agentes infecciosos com exigências de crescimento incompatíveis com os meios de cultivo empregados (BURRIEL, 1998; HARTMAN et al., 2007).

A contagem de células somáticas possui grande eficiência na avaliação da glândula mamária, apesar que pode sofrer influências fisiológicas e possui diferentes valores celulares em indivíduos de diferentes raças. Assim, o uso deste método para

avaliar a prevalência e diagnóstico de casos de mastite em animais de diferentes raças precisa de mais estudos como indicador da mastite subclínica (BERGONIER; BERTHELOT, 2003; CONTRERAS et al., 2007; BLAGITZ, 2007).

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Definir as características diagnósticas da CCS em ovinos de diferentes raças, em duas distintas fases de lactação.

3.2. Objetivos Específicos

- Estabelecer a etiologia infecciosa da mastite subclínica ovina em duas diferentes fases de lactação e a frequência desta enfermidade nas diferentes raças;
- Definir as características diagnósticas da contagem de células somáticas para o diagnóstico da mastite subclínica em ovelhas de diferentes raças, de acordo com diferentes classes de contagens celulares;
- Comparar o *California Mastitis Test* (CMT) com diferentes classes de contagens de células somáticas para avaliação de metades mamárias;
- Estabelecer um valor de triagem para a contagem de células somáticas como método diagnóstico da mastite subclínica em diferentes raças de ovelhas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Características dos animais e rebanho

O trabalho foi realizado em rebanho experimental formado pelas ovelhas das raças Santa Inês, Texel, Ile de France e Dorper (Figura 1), localizado na Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, São Paulo, entre setembro de 2013 e outubro de 2014. Durante esse período, o rebanho foi acompanhado por duas estações de parição consecutivas. As ovelhas das raças Texel, Ile de France e Dorper apresentaram ordem de lactação semelhantes (até a terceira lactação), enquanto a maioria das ovelhas da raça Santa Inês possuíam maior número de lactação.

Analisaram-se 1457 metades mamárias em duas diferentes fases de lactação, das quais 745 pertenciam a 212 ovelhas da raça Santa Inês, 236 metades mamárias de 64 ovelhas da raça Texel, 224 metades mamárias de 63 ovelhas da raça Ile de France e 252 metades mamárias de 68 ovelhas da raça Dorper, submetidas ao mesmo sistema de manejo semi-intensivo. Todos os animais foram mantidos em piquetes de capim Tanzânia, suplementados com fornecimento diário de silagem de milho, sal mineral e água à vontade e os cordeiros receberam suplementação pelo *creep feeding*. À noite os animais eram recolhidos para repouso em barracões de chão de terra, que não eram limpos frequentemente, sempre contendo fezes e umidade.



Figura 1. Ovelhas das raças Santa Inês (A), Texel (B), Ile de France (C) e Dorper (D) pertencentes ao rebanho experimental.

4.2. Identificação prévia da mastite clínica e subclínica e colheitas de amostras de leite

As amostras de leite foram colhidas de todas as ovelhas paridas, ao 16º dia pós-parto, em média, e no dia seguinte ao desmame dos cordeiros (ao 96º dia pós-parto, em média).

Sinais de inflamação como hiperemia, calor, dor, acompanhados ou não por endurecimento da glândula mamária e edema, com ou sem sinais sistêmicos de infecção como febre e anorexia foram investigados, assim como foi realizada a inspeção visual do leite para a investigação de possíveis alterações macroscópicas. A presença das alterações visuais inflamatórias da mama e/ou sinais macroscópicos de alterações do leite serviram de base para classificação do caso como clínico

(GARINO JÚNIOR et al., 2006). Ovelhas que apresentaram sinais clínicos de mastite não foram utilizadas para as colheitas de amostras de leite.

O CMT foi realizado como teste prévio para o diagnóstico de mastite subclínica. As misturas (leite + reagente) foram consideradas positivas quando apresentaram formação de gel viscoso, acompanhadas ou não pela coloração violeta, atribuindo-se escores de “um a três”, de acordo com o grau de resposta inflamatória. As misturas que permaneceram inalteradas, sem a clara evidência de viscosidade foram consideradas negativas (Figura 2) (SCHALM; NOORLANDER, 1957).



Figura 2. Resultado negativo ao CMT (A) e reação positiva ao CMT, escore 2+ (B).

Em seguida foram colhidas amostras de 2 a 5 ml de leite de cada metade mamária, reagentes ou não ao teste CMT, em duplicatas, em tubos de ensaio esterilizados para as análises microbiológicas, após prévia antissepsia dos óstios dos tetos com álcool etílico 70% (v/v). Estas amostras foram encaminhadas aos laboratórios da Embrapa Pecuária Sudeste em São Carlos, São Paulo.

As colheitas das amostras de leite para a CCS foram feitas em frascos plásticos de capacidade para 60 mL com o conservante bronopol, após as colheitas das amostras para os exames microbiológicos. As CCS foram determinadas utilizando-se a técnica de citometria de fluxo com o contador eletrônico de células somáticas Somacount 300 (Bentley), no laboratório da Clínica do Leite, localizado na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, na cidade de Piracicaba, SP.

4.3. Análises microbiológicas do leite para confirmação da mastite subclínica

Foram semeados 10 μ L das amostras de leite de cada metade mamária sobre a superfície de placas de Petri com meios de cultura ágar sangue ovino 5% e ágar MacConkey. Após a incubação a 37 °C durante 24 a 72 horas os micro-organismos foram identificados.

As colônias classificadas como cocos Gram-positivos, dispostos ou não sob a forma de cachos de uva foram submetidas às provas da catalase e da coagulase lenta com plasma de coelho (Figuras 3 e 4) (HOLMBERG, 1973).

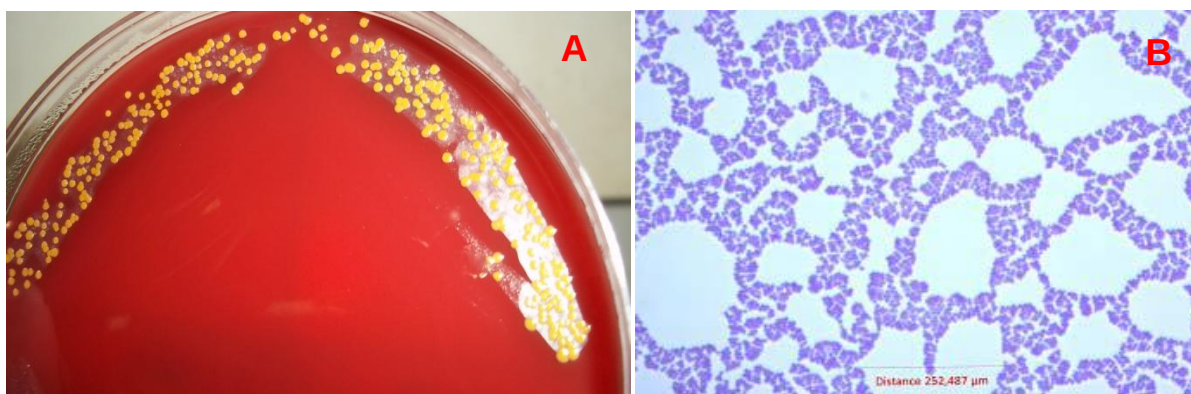


Figura 3. Colônias amarelas sugestivas de *Staphylococcus* spp. em ágar sangue ovino a 5% (A) e Cocos Gram-positivos em formato de cacho de uvas visualizados na coloração de Gram (aumento de 1000 vezes) (B).



Figura 4. Prova da catalase ilustrando resultados negativo e positivo ao teste (A) e Prova da coagulase lenta ilustrando reações negativa e positiva (B) (sequenciados de cima para baixo).

As cepas catalase e coagulase positivas foram, então, submetidas à prova para verificação da produção de acetoina e utilização ou não da maltose e trealose. As amostras positivas a estas provas foram classificadas como *Staphylococcus aureus* (HOLT et al., 1994; ZAFALON, 2003). As cepas coagulase-negativas foram submetidas a testes de oxidase e resistência à furazolidona com a finalidade de promover a diferenciação entre as bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus* (KONEMAN et al., 2001; ARIZNABARRETA; GONZALO e PRIMITIVO, 2002).

Os estafilococos negativos à prova da coagulase também foram submetidos ao teste de resistência à novobiocina. Depois de 16 a 20 horas de incubação a 35 °C, os diâmetros das zonas completas de inibição de multiplicação bacteriano visível ao redor de cada disco foram medidos em milímetros. Isto permitiu que este grupo de micro-organismos fosse dividido em dois subgrupos: estafilococos coagulase-negativos resistentes à novobiocina (ECNRN) com um diâmetro de inibição de até 12 mm e estafilococos coagulase-negativos sensíveis à novobiocina (ECNSN), com um diâmetro de inibição maior ou igual a 16 mm (KONEMAN et al., 2001).

A identificação das espécies de ECN foi realizada por meio das provas de fermentação dos açúcares, de acordo com o esquema proposto por Kloos e Schleifer (1975) (Figura 5), com a utilização dos açúcares ribose, xilose, arabinose, frutose, xylitol, trealose, sacarose, lactose, maltose e manitol, além da prova de redução de nitratos.

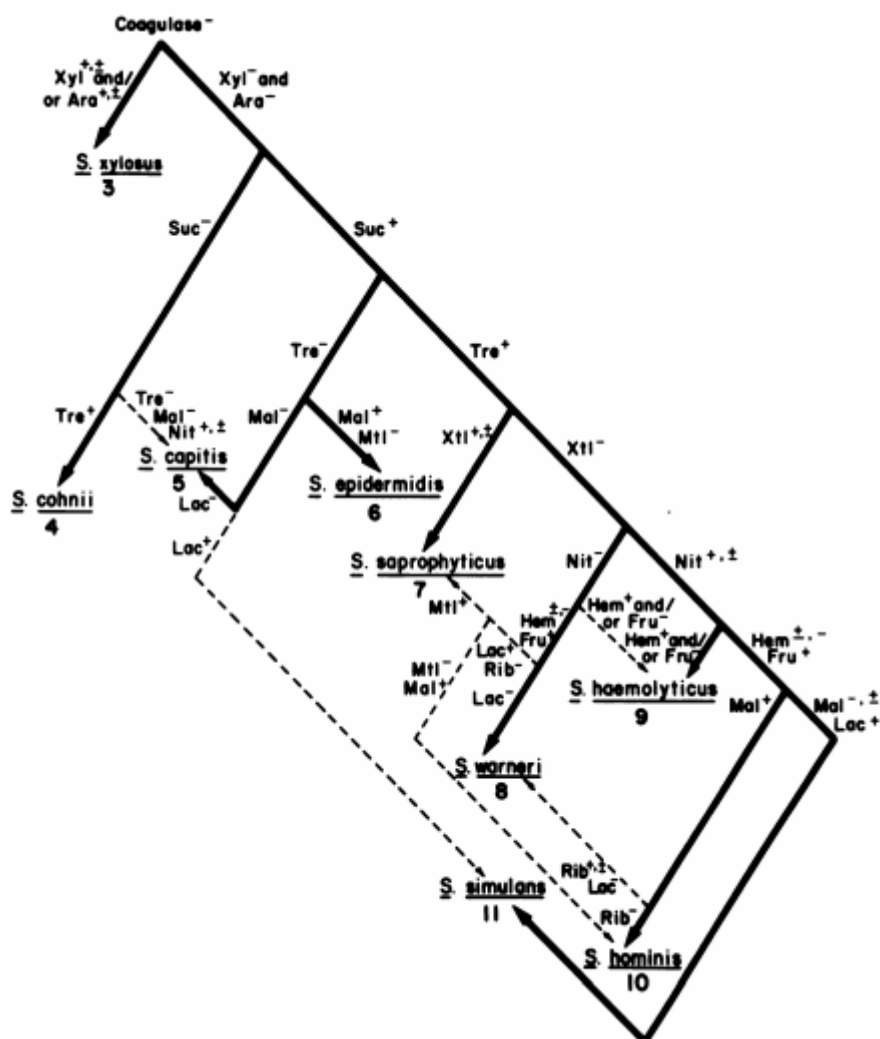


Figura 5. Fluxograma para a identificação de espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos, proposta por Kloos e Schleifer (1975).

As colônias que, semeadas em ágar sangue e incubadas a 37 °C por 24/48 horas, apresentaram-se pequenas, lisas, translúcidas, circundadas ou não por uma zona esverdeada ou clara de eritrócitos descoloridos ou células lisadas, respectivamente, reconhecidas como cocos Gram-positivos e negativos à prova da catalase foram identificadas como pertencentes ao gênero *Streptococcus* (HARMON et al., 1990; KONEMAN et al., 2001).

As colônias com formas circulares, brancas, cremes ou opacas em ágar sangue, após 48 horas de incubação a 37 °C, reconhecidas como bastonetes Gram-positivos pleomórficos que apresentaram-se sob a forma de paliçada foram submetidas à prova da catalase e verificação da produção de hemólise para

diferenciação entre *Corynebacterium* spp. e *Trueperella pyogenes*, anteriormente classificada como *Arcanobacterium pyogenes* (ARIZNABARRETA; GONZALO e PRIMITIVO, 2002; GONZALO et al., 2002; ZAFALON, 2003).

4.4. Análises estatísticas

As determinações da sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo do resultado positivo (VPR+), valor preditivo do resultado negativo (VPR-) e eficiência (Ef) da CCS foram realizadas de acordo com o modelo proposto por Medronho e Perez (2002) (Tabela 1). A sensibilidade foi considerada como a proporção de verdadeiros positivos entre todos os doentes ($S = a / a+c$). A especificidade foi considerada como a proporção dos verdadeiros negativos entre todos os sadios ($E = d / b+d$). O valor preditivo do resultado positivo foi a proporção de verdadeiros positivos entre todos os possíveis doentes detectados pelo teste ($VPR+ = a / a+b$), enquanto o valor preditivo do resultado negativo foi a proporção de verdadeiros negativos entre todos os possíveis sadios detectados pelo teste ($VPR- = d / c+d$). A eficiência ou acurácia foi a proporção de acertos do teste diagnóstico ($Ef = a + d / a + b + c + d$). O diagnóstico microbiológico foi utilizado para validação dos testes diagnósticos estudados (SCHMIDT; DUNCAN, 1999).

A prevalência verdadeira foi dada pela proporção do total de indivíduos realmente infectados ou doentes na população estudada ($a+c / N$), enquanto a prevalência aparente foi dada pela proporção do total de indivíduos positivos no teste diagnóstico na população estudada ($a+b / N$) (MEDRONHO; PEREZ, 2002).

Foram estabelecidos quatro pontos de corte de CCS para as diferentes raças estudadas e comparadas de acordo com a ausência ou presença de isolamento microbiológico:

Classe 1: CCS até 200.000 células/mL de leite

Classe 2: CCS até 500.000 células/mL de leite

Classe 3: CCS até 750.000 células/mL de leite

Classe 4: CCS até 1.000.000 células/mL de leite

Todas as amostras de leite pertencentes aos animais das raças Ile de France, Texel e Dorper que apresentaram CCS >1.000.000 células/mL, com ausência de isolamento microbiológico, foram consideradas positivas para mastite subclínica e utilizadas para definir as características diagnósticas dos pontos de corte de CCS e determinar o ponto de corte na curva TG-ROC (BERTHELOT et al., 2006).

Tabela 1. Possíveis resultados de um teste diagnóstico para a identificação de uma doença

		Doença		
		Presente	Ausente	Total
Teste	Positivo	a	b	a + b
		(Verdadeiro positivo)	(Falso positivo)	
	Negativo	c	d	c + d
		(Falso negativo)	(Verdadeiro negativo)	
Total		a + c	b + d	a + b + c + d (N)

Os resultados das contagens celulares foram comparados aos de CMT e submetidos à análise de método estatístico Kappa, cujos valores foram interpretados do seguinte modo: < 0,00 – concordância ruim; entre 0,00 e 0,20 – concordância fraca; entre 0,21 e 0,40 – concordância sofrível; entre 0,41 e 0,60 – concordância regular; entre 0,61 e 0,80 – concordância boa; entre 0,81 e 0,99 – concordância ótima; e 1,00 – concordância perfeita (PEREIRA, 2002).

De acordo com os níveis de sensibilidade e especificidade mais adequados, um ou mais pontos de corte para a CCS foram determinados por meio da análise da curva TG-ROC (*Two-graph receiver operating characteristic*) para cada raça ovina estudada, a qual foi calculada pela ferramenta on-line disponibilizada pela *AusVet Animal Health Services* (2015).

O teste de qui-quadrado foi empregado para estudar as distribuições de ocorrência dos casos de mastite subclínica entre as raças ovinas por meio do software R 3.2.3.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na lactação foram avaliadas 763 metades mamárias. Destas, 117 (15,3%) apresentaram isolamentos microbiológicos após as colheitas das amostras de leite. Os micro-organismos isolados ou em associação estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Micro-organismos isolados de amostras de leite de metades mamárias de diferentes raças ovinas durante a lactação.

Micro-organismos	Santa Inês		Texel		Ile de France		Dorper		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
ECNSN ¹	55	13,7	2	1,7	5	4,2	1	0,8	63	8,3
ECNRN ²	17	4,2	3	2,5	0	0,0	0	0,0	20	2,6
<i>Streptococcus</i> spp.	10	2,5	2	1,7	2	1,7	2	1,7	16	2,1
<i>Corynebacterium</i> spp.	4	1,0	0	0,0	1	0,8	0	0,0	5	0,7
ECP ³	3	0,7	0	0,0	2	1,7	0	0,0	5	0,7
Enterobactérias	3	0,7	0	0,0	2	1,7	0	0,0	5	0,7
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0,2	0	0,0	0	0,0	1	0,8	2	0,3
ECNSN / ECP	1	0,2	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,1
Amostras Negativas	308	76,6	113	94,2	108	90,0	117	96,7	646	84,7
Total	402	100,0	120	100,0	120	100,0	121	100,0	763	100,0

¹Estafilococos coagulase-negativos sensíveis à novobiocina; ²Estafilococos coagulase-negativos resistentes à novobiocina; ³Estafilococos coagulase-positivos

Os agentes etiológicos de maior frequência durante a lactação foram Estafilococos coagulase-negativos (ECN), correspondendo a 79,8% isoladamente, *Streptococcus* spp. (13,7%), *Corynebacterium* spp. (4,3%), Estafilococos coagulase-positivos (ECP) (4,3%), Enterobactérias (4,3%), *Staphylococcus aureus* (1,7%) e associação de ECN/ECP (0,9%).

Na fase de desmame foram avaliadas 694 metades mamárias, das quais 86 (12,4%) apresentaram isolamentos microbiológicos. Os micro-organismos isolados ou em associação estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Micro-organismos isolados de amostras de leite de metades mamárias de diferentes raças ovinas ao desmame.

Micro-organismos	Santa Inês		Texel		Ile de France		Dorper		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
ECNSN ¹	26	7,6	1	0,9	4	3,8	1	0,8	32	4,6
<i>Streptococcus</i> spp.	16	4,7	3	2,6	2	1,9	3	2,3	24	3,5
Enterobactérias	5	1,5	1	0,9	0	0,0	0	0,0	6	0,9
<i>Corynebacterium</i> spp.	3	0,9	0	0,0	1	1,0	2	1,5	6	0,9
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	0,9	0	0,0	1	1,0	1	0,8	5	0,7
ECNRN ²	3	0,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	3	0,4
ECNSN/ <i>Streptococcus</i> spp.	3	0,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	3	0,4
ECP ³	2	0,6	0	0,0	1	1,0	0	0,0	3	0,4
ECNSN/ <i>S. aureus</i>	1	0,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,1
ECP/ <i>Streptococcus</i> spp.	1	0,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,1
<i>S. aureus</i> / <i>Streptococcus</i> spp.	1	0,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,1
<i>S. aureus</i> /Enterobactérias	1	0,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,1
Amostras Negativas	278	81,0	111	95,7	95	91,3	124	94,7	608	87,6
Total	343	100,0	116	100,0	104	100,0	131	100,0	694	100,0

¹Estafilococos coagulase-negativos sensíveis à novobiocina; ²Estafilococos coagulase-negativos resistentes à novobiocina; ³Estafilococos coagulase-positivos

Dentre as amostras positivas ao exame microbiológico, os agentes etiológicos de maior frequência no desmame foram ECN, correspondendo a 40,7% isoladamente, seguidos por *Streptococcus* spp. (27,9%), Enterobactérias (7,0%), *Corynebacterium* spp. (7,0%), *Staphylococcus aureus* (5,8%), ECP (3,5%), e associações entre micro-organismos (8,1%).

No período de lactação e desmame, 1457 metades mamárias foram investigadas. Destas, 203 (13,9%) apresentaram-se positivas ao exame microbiológico. Os agentes etiológicos com maior ocorrência foram ECN, em percentuais que variaram de 58,1% a 60,6%, isoladamente e em associação, respectivamente. Estes resultados estão próximos aos de Hartman et al. (2009) e Santana et al. (2013), que obtiveram isolamentos de 59,5% e 52,4% destes micro-organismos isoladamente, respectivamente. Zafalon et al. (2015), ao acompanharem ovelhas Santa Inês por duas lactações, relataram a identificação de 56,2% e 58,5% de Estafilococos coagulase negativos, isoladamente e em associação. Hartman et al. (2009) e Guaraná et al. (2011) apresentaram percentuais de 16,2% e 15,9% de

ocorrência de *Streptococcus* spp., respectivamente, semelhantes aos isolamentos do presente trabalho.

Peixoto et al. (2010) obtiveram isolamento de 7,1% e 5,4% para Enterobactérias e *Corynebacterium* spp., similares ao presente trabalho. Lucheis; Hernandez e Troncarelli (2010) e Santana et al. (2013) também relataram percentuais semelhantes com relação aos isolamentos de Estafilococos coagulase positivos (3,9%) e *Staphylococcus aureus* (3,4%).

Quando comparadas as frequências de casos de mastite entre as raças, a Santa Inês apresentou significativamente maior número de casos de mastite subclínica ($p < 0,05$). As demais raças não diferiram entre si exceto Ile de France e Dorper ($p < 0,05$), cuja frequência para ambas foi de 9,4% e 4,4%, respectivamente, enquanto a Texel foi de 5,1%. Santana et al. (2013) e Zafalon et al. (2015) observaram percentuais de ocorrência de mastite subclínica de 20,0% e 20,1% em rebanhos formados por animais da raça Santa Inês.

Apesar de sua aptidão para a produção de carne, a presença de características da raça leiteira Bergamácia na composição genética tornou as ovelhas Santa Inês ótimas produtoras de leite. Estas ovelhas apresentam período de lactação mais prolongado que outras raças especializadas para corte, no entanto, em grande número de animais podem ser observados úberes com implantação não satisfatória, como tetas posicionadas lateralmente e também supranumerárias (CUNHA et al., 2004), características que podem favorecer a maior ocorrência de mastite (SOUSA; LOBO e MORAIS, 2005; MELO et al., 2008).

A prática de manter os animais confinados no interior de instalações utilizadas para a pernoite, por um período do dia ou durante todo o tempo, aumenta a exposição das fêmeas ao maior número de agentes causadores de mastite devido o acúmulo de matéria orgânica, aumento de umidade, de temperatura e sombreamento, que favorecem a multiplicação de agentes ambientais causadores de mastite (MOTA, 2008).

Ao realizar as colheitas de amostras de leite, observou-se maior facilidade de ordenha nas ovelhas da raça Santa Inês, enquanto as outras raças aparentavam apresentar maior tonicidade do esfíncter do óstio papilar. Essa informação pode ser explicada pelos fatores relacionados ao hospedeiro: idade, conformação do úbere,

tamanho e diâmetro do teto, formato do teto, facilidade de ordenha, raças (AMARAL, 1999).

Mudanças no metabolismo endócrino e no sistema imune de ovelhas ocorrem com o aumento do número de lactações, aumentando assim a susceptibilidade e a sensibilidade à infecção, o que pode explicar a maior ocorrência da enfermidade em ovelhas mais velhas e devido às sucessivas mudanças do tecido mamário (AL-MAJALI; JAWABREH, 2003).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são consideradas os principais agentes etiológicos da infecção intramamária em ovinos, estas quando presentes, geralmente, estão relacionados com falhas de higiene no manejo da ordenha dos animais ou na presença de variantes resistentes (CAVALCANTE, 2008). Após as análises laboratoriais para a confirmação estafilocócica na etiologia infecciosa da mastite, efetuou-se as provas de fermentação de açúcares para a identificação das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos. Definiram-se as espécies para cada raça de ovelha, conforme a Tabela 4.

Tabela 4. Espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos isolados em amostras de leite pertencentes a diferentes raças ovinas.

Espécies	Raças									
	Santa Inês		Texel		Ile de France		Dorper		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>S. xylosus</i>	92	88,5	6	100,0	6	66,7	3	100,0	107	87,7
<i>S. saprophyticus</i>	6	5,8	0	0,0	3	33,3	0	0,0	9	7,4
<i>S. capitis</i>	2	1,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	1,6
<i>S. simulans</i>	1	1,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,8
Não identificadas*	3	2,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	3	2,5
Total	104	100,0	6	100,0	9	100,0	3	100,0	122	100,0

*Não foi possível identificar as espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos por meio dos testes bioquímicos.

Nas ovelhas da raça Santa Inês, *S. xylosus* foram isolados com maior frequência, seguidas de *S. saprophyticus*, *S. capitis* e *S. simulans*. Nas raças Texel, Ile de France e Dorper, por sua vez, apenas no leite de metades mamárias da Ile de France foi isolada outra espécie além de *S. xylosus* (*S. saprophyticus*).

Resultados semelhantes foram relatados por Pilon et al. (2014), em que *S. xylosus* foi predominante nas raças Santa Inês e Morada Nova. Radostits et al. (2002) demonstraram que *S. xylosus*, *S. chromogenes* e *S. simulans* são as espécies mais frequentemente isoladas a partir de casos de mastite subclínica em ovelhas.

Outros autores identificaram espécies distintas como prevalentes na mastite ovina, como El-Jakee et al. (2013) que relataram como espécies frequentemente encontradas *S. cohnii* e *S. lugdunensis* em casos de mastite subclínica ou Silva (2012) que identificou a espécie *S. chromogenes* como a prevalente em seu estudo.

Após analisar amostras de leite de ovinos na região leste da Eslováquia, Pilipčincová et al. (2010) identificaram um total de 240 amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativos destacando-se *S. epidermidis* (36,3%), *S. caprae* (21,3%), *S. hominis* (6,6%), *S. chromogenes* (6,3%), *S. xylosus* (5,8%), *S. warneri* (5,0%) e *S. capitis* (4,6%) e, em menor frequência, as espécies *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. simulans*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. kloosii*, *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *S. auricularis* e *S. lugdunensis*. Por outro lado, Tejada et al. (2012) obtiveram maior isolamento de *S. lentus*, seguidos por *S. sciuri*, *S. vitulinus*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*.

Ao monitorar a ocorrência de mastite subclínica em um rebanho ovino, o teste de diagnóstico utilizado deve ser preciso e confiável para diagnosticar o maior número de animais infectados possíveis. A CCS é considerada uma importante ferramenta para a avaliação das metades mamárias das ovelhas, sendo assim, empregado diferentes pontos de corte para triagem da mastite subclínica. A sensibilidade, especificidade, valor preditivo do resultado positivo, valor preditivo do resultado negativo, eficiência, prevalência verdadeira e prevalência aparente do teste foram calculados no momento da lactação e ao desmame (Tabelas 5 e 6), respectivamente.

Tabela 5. Características diagnósticas de pontos de corte de CCS para detecção de mastite subclínica em diferentes raças ovinas na lactação.

Raças	Resultados	SE¹ (%)	ES² (%)	VPR+³ (%)	VPR -⁴ (%)	Ef⁵ (%)	PV⁶ (%)	PA⁷ (%)
Santa Inês	CCS ⁸ 200 x 10 ³	89	54	36	94	62	22	56
	CCS 500 x 10 ³	76	77	49	92	77	22	35
	CCS 750 x 10 ³	63	81	49	88	77	22	29
	CCS 1000 x 10 ³	57	85	53	87	79	22	24
Texel	CCS 200 x 10 ³	64	87	33	96	85	9	18
	CCS 500 x 10 ³	55	98	75	95	94	9	7
	CCS 750 x 10 ³	55	100	100	96	96	9	5
	CCS 1000 x 10 ³	45	100	100	95	95	9	4
Ile de France	CCS 200 x 10 ³	93	88	52	99	89	12	21
	CCS 500 x 10 ³	93	99	93	99	98	12	12
	CCS 750 x 10 ³	93	99	93	99	98	12	12
	CCS 1000 x 10 ³	86	100	100	98	98	12	10
Dorper	CCS 200 x 10 ³	75	85	26	98	84	7	19
	CCS 500 x 10 ³	63	99	83	97	97	7	5
	CCS 750 x 10 ³	63	100	100	97	98	7	4
	CCS 1000 x 10 ³	63	100	100	97	98	7	4

¹Sensibilidade; ²Especificidade; ³Valor Preditivo do Resultado Positivo; ⁴Valor Preditivo do Resultado Negativo; ⁵Eficiência; ⁶Prevalência Verdadeira; ⁷Prevalência Aparente; ⁸Contagem de Células Somáticas

Tabela 6. Características diagnósticas de pontos de corte de CCS para detecção de mastite subclínica em diferentes raças ovinas ao desmame.

Raças	Resultados	SE¹ (%)	ES² (%)	VPR+³ (%)	VPR-⁴ (%)	Ef⁵ (%)	PV⁶ (%)	PA⁷ (%)
Santa Inês	CCS ⁸ 200 x 10 ³	87	66	37	96	70	18	44
	CCS 500 x 10 ³	79	82	49	94	81	18	29
	CCS 750 x 10 ³	77	89	60	95	86	18	23
	CCS 1000 x 10 ³	75	91	66	94	88	18	21
Texel	CCS 200 x 10 ³	100	79	47	100	82	16	34
	CCS 500 x 10 ³	100	94	75	100	95	16	21
	CCS 750 x 10 ³	100	100	100	100	100	16	16
	CCS 1000 x 10 ³	94	100	100	99	99	16	15
Ile de France	CCS 200 x 10 ³	67	83	29	96	82	9	21
	CCS 500 x 10 ³	67	99	86	97	96	9	7
	CCS 750 x 10 ³	56	99	83	96	95	9	6
	CCS 1000 x 10 ³	56	100	100	96	96	9	5
Dorper	CCS 200 x 10 ³	88	69	31	97	72	14	39
	CCS 500 x 10 ³	88	87	52	98	87	14	24
	CCS 750 x 10 ³	88	92	65	98	92	14	19
	CCS 1000 x 10 ³	88	100	100	98	98	14	12

¹Sensibilidade; ²Especificidade; ³Valor Preditivo do Resultado Positivo; ⁴Valor Preditivo do Resultado Negativo; ⁵Eficiência; ⁶Prevalência Verdadeira; ⁷Prevalência Aparente; ⁸Contagem de Células Somáticas

Durante a lactação, a sensibilidade da CCS utilizando-se pontos de corte de 200, 500 e 750 x 10³ células/ mL de leite em ovelhas da raça Ile de France foi superior em relação às outras raças. As contagens de 750 e 1000 x 10³ células/ mL de leite apresentaram especificidade superior a 80% para todas as raças. No desmame, as sensibilidades da CCS com as contagens de 200, 500 e 750 x 10³ células/ mL de leite em ovelhas da raça Texel foram superiores em relação as outras raças. Os pontos de corte de 750 e 1000 x 10³ células/ mL de leite apresentaram especificidades superiores a 88% para todas as raças.

Santana (2014), após analisar 393 metades mamárias pertencentes a ovelhas das raças Santa Inês e Morada Nova no período de desmame, obteve sensibilidade de 86,6% ao utilizar o ponto de corte de 200 x 10³ células/ mL de leite e a

especificidade manteve-se superior a 80% nas contagens superiores a 400 e 500 x 10³ células/ mL de leite. Resultados semelhantes foram apresentados neste estudo nas raças Santa Inês e Dorper para os pontos de corte de 200 e 500 x 10³ células/ mL de leite.

Hussein; El-Khabaz; Malek (2015) relataram o valor de CCS $\geq 400 \times 10^3$ células/ mL de leite em ovelhas da raça Ossimi, no Egito, com sensibilidade de 90% e especificidade de 88% afirmando que este limiar possui maior probabilidade de detectar animais com mastite subclínica. Lafi (2006) apresentou valores de CCS cujos pontos de corte apresentaram sensibilidades superiores a 90% durante a lactação, o que tornou a contagem de células útil como teste de triagem para identificar metades mamárias com mastite subclínica em ovelhas da raça Awassi.

Diferentes valores para a CCS podem ser utilizados como pontos de corte para detectar metades mamárias com mastite subclínica, de acordo com a proporção de animais acometidos e agentes infecciosos existentes no rebanho. Contudo, o método de diagnóstico deve apresentar sensibilidade que seja suficiente para detectar a maioria das ovelhas com mastite subclínica, assim como especificidade adequada para não gerar quantidade excessiva de indivíduos falso-positivos, uma vez que nem sempre é possível realizar exames microbiológicos para confirmação da doença por apresentarem custo elevado, serem demorados e inviáveis em grandes rebanhos.

Os índices de concordâncias entre os diferentes graus de reação do CMT e a contagem de células somáticas estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Índices de concordâncias (Kappa – k) entre diferentes graus de reação ao CMT e limites de CCS ($\times 10^3$ células/ mL de leite) no diagnóstico da mastite subclínica em ovelhas de diferentes raças na lactação e no desmame.

Santa Inês								
Reações ao CMT	Lactação				Desmame			
	CCS ¹ 200	CCS 500	CCS 750	CCS 1000	CCS 200	CCS 500	CCS 750	CCS 1000
CMT ² (1+)	0,52	0,73	0,73	0,66	0,56	0,70	0,66	0,63
CMT (2+)	0,37	0,68	0,77	0,79	0,46	0,65	0,69	0,73
CMT (3+)	0,21	0,42	0,52	0,60	0,38	0,61	0,68	0,74

Texel								
	Lactação				Desmame			
	CCS 200	CCS 500	CCS 750	CCS 1000	CCS 200	CCS 500	CCS 750	CCS 1000
CMT (1+)	0,55	0,57	0,52	0,56	0,58	0,65	0,48	0,50
CMT (2+)	0,40	0,70	0,82	0,90	0,45	0,64	0,68	0,71
CMT (3+)	0,28	0,65	0,79	0,88	0,28	0,47	0,63	0,66

Ile de France								
	Lactação				Desmame			
	CCS 200	CCS 500	CCS 750	CCS 1000	CCS 200	CCS 500	CCS 750	CCS 1000
CMT (1+)	0,37	0,54	0,54	0,60	0,36	0,55	0,46	0,35
CMT (2+)	0,25	0,46	0,46	0,52	0,17	0,47	0,33	0,16
CMT (3+)	0,12	0,23	0,23	0,27	0,07	0,21	0,24	0,27

Dorper								
	Lactação				Desmame			
	CCS 200	CCS 500	CCS 750	CCS 1000	CCS 200	CCS 500	CCS 750	CCS 1000
CMT (1+)	0,31	0,55	0,60	0,60	0,35	0,51	0,49	0,37
CMT (2+)	0,24	0,79	0,88	0,88	0,32	0,49	0,55	0,44
CMT (3+)	0,13	0,49	0,56	0,56	0,21	0,34	0,43	0,38

¹Contagem de Células Somáticas; ² CMT: *California Mastitis Test* (1+), (2+) ou (3+) = Intensidade da reação positiva no CMT.

As amostras de leite de metades mamárias de ovelhas Santa Inês colhidas na lactação com reação 1+ ao CMT com valores de 500 e 750 x 10³ células/ mL de leite e a reação 2+ ao CMT com o valor 750 e 1000 x 10³ células/ mL de leite, apresentaram boas concordâncias. O leite de metades mamárias de ovelhas Texel com reação 2 + ao CMT com valores de 750 e 1000 x 10³ células/ mL de leite e reação 3+ com valores de 1000 x 10³ células/ mL, obtiveram ótimas concordâncias (superior a 0,81). O mesmo ocorreu na raça Dorper entre reação 2 + ao CMT com valor de CCS 750 e 1000 x 10³ células/ mL de leite. Reações 1+ e 2+ ao CMT, oriundas de amostras de ovelhas Ile de France, apresentaram concordâncias regulares com os pontos de corte 500, 750 e 1000 x 10³ células/mL de leite.

No desmame, as reações 1+ ao CMT em amostras de leite de metades mamárias de ovelhas Santa Inês e Texel apresentaram boa concordância quando utilizado o ponto de corte 500 x 10³ células/ mL de leite. As amostras das respectivas raças com reações 2+ e 3+ ao CMT apresentaram boa concordância com valor 750 e 1000 x 10³ células/ mL de leite.

Santana (2014) observou boas concordâncias entre o CMT 1+ e os valores de CCS superiores a 300 e 500 x 10³ células/ mL de leite, com concordância superior (0,71) entre este grau de reação ao CMT e CCS superior a 400 x 10³ células/ mL de leite. Ao utilizarem um ponto de corte 500 x 10³ células/ mL de leite para o diagnóstico de mastite subclínica em ovelhas Corriedale, Pradieé et al. (2012), relataram uma fraca concordâncias com o CMT >2+ (0,152).

Barbosa et al. (2004) e Veríssimo et al. (2010) também concluíram que o valor de CMT 3+ pode ser utilizados para o diagnóstico da mastite subclínica ao desmame, respectivamente. Berthelot et al. (2006), obtiveram 90% de sensibilidade e especificidade da relação dos testes de CMT e CCS demonstrando que o teste é confiável e útil para identificação de infecção intramamária em ovelhas.

Uma ferramenta destinada a descrever o desempenho de um teste de diagnóstico, a curva TG-ROC tem como objetivo determinar um ponto de corte de forma que um indivíduo com mensurações menores ou iguais ao ponto de corte é classificado como não doente e um indivíduo com uma resposta ao teste maior que o ponto de corte é classificado como doente (MARTINEZ; LOUZADA-NETO; PEREIRA, 2003)

O ponto de corte ideal para diagnóstico indireto da mastite subclínica utilizando apenas a CCS na lactação e no desmame, pode ser determinado por meio da análise da curva TG-ROC (*Two-graph receiver operating characteristic*) (Figuras 6, 7, 8 e 9).

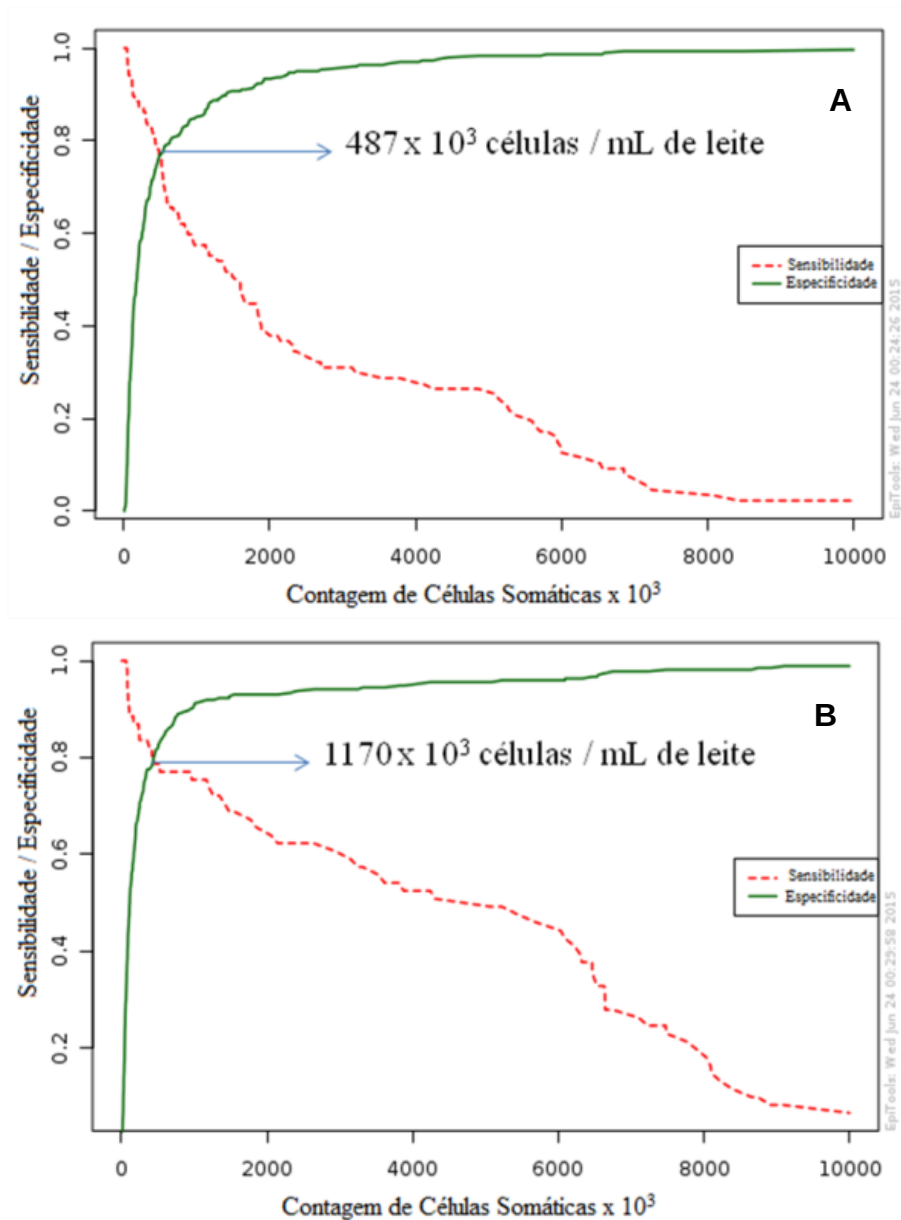


Figura 6. Pontos de corte para CCS e curva TG-ROC de acordo com os resultados de contagens celulares e exames microbiológicos em leite de metades mamárias de ovelhas Santa Inês durante a lactação (A) e desmame (B).

Ao relacionar os resultados dos exames microbiológicos com a CCS das amostras de leite de ovelhas da raça Santa Inês no período de lactação, verificou-se um ponto de corte 487×10^3 células/mL de leite, respectivamente. No desmame,

observou-se um ponto de corte 1170×10^3 células/mL de leite. Nunes et al. (2008), acompanharam ovelhas Santa Inês ao longo da lactação e relataram que o ponto de corte 500×10^3 células/mL de leite foi ideal para o diagnóstico da mastite em ovelhas. Blagits et al. (2008) selecionaram ovelhas Santa Inês próximas do período de desmame e obtiveram amostras de leite com exame bacteriológico positivo com média 857.040 células/mL de leite.

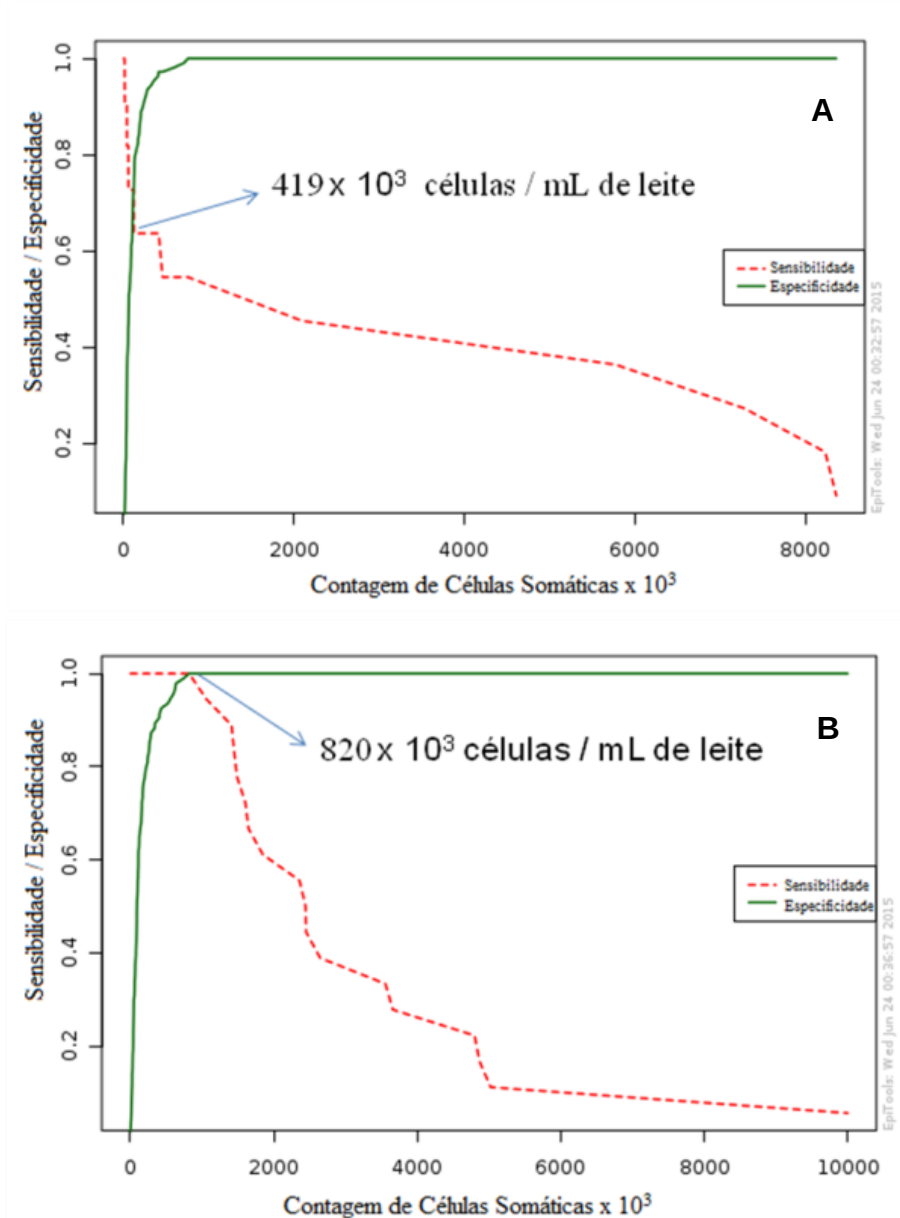


Figura 7. Pontos de corte para CCS e curva TG-ROC de acordo com os resultados de contagens celulares, considerado valores superiores a 1.000.000 como positivo para mastite subclínica e exames microbiológicos em leite de metades mamárias de ovelhas Texel durante a lactação (A) e desmame (B).

Nas ovelhas da raça Texel, constatou-se ponto de corte 419×10^3 células/mL de leite no período de lactação e ao desmame, o ponto de corte ideal para a CCS foi 820×10^3 células/mL de leite. Ponto de corte semelhante ao da raça Texel na lactação foi apresentado por Kern et al. (2013), que relataram um limite de 400×10^3 células/mL de leite para a detecção de mastite.

Santana (2014), por sua vez, avaliou 393 metades mamárias de ovelhas das raças Santa Inês e Morada Nova no momento da secagem e obteve ponto de corte 388×10^3 células/mL. Contagem semelhante foi apresentada por Olechnowicz e Jaskowski (2014), que relataram valores inferiores a 400×10^3 células/mL em animais de produção leiteira.

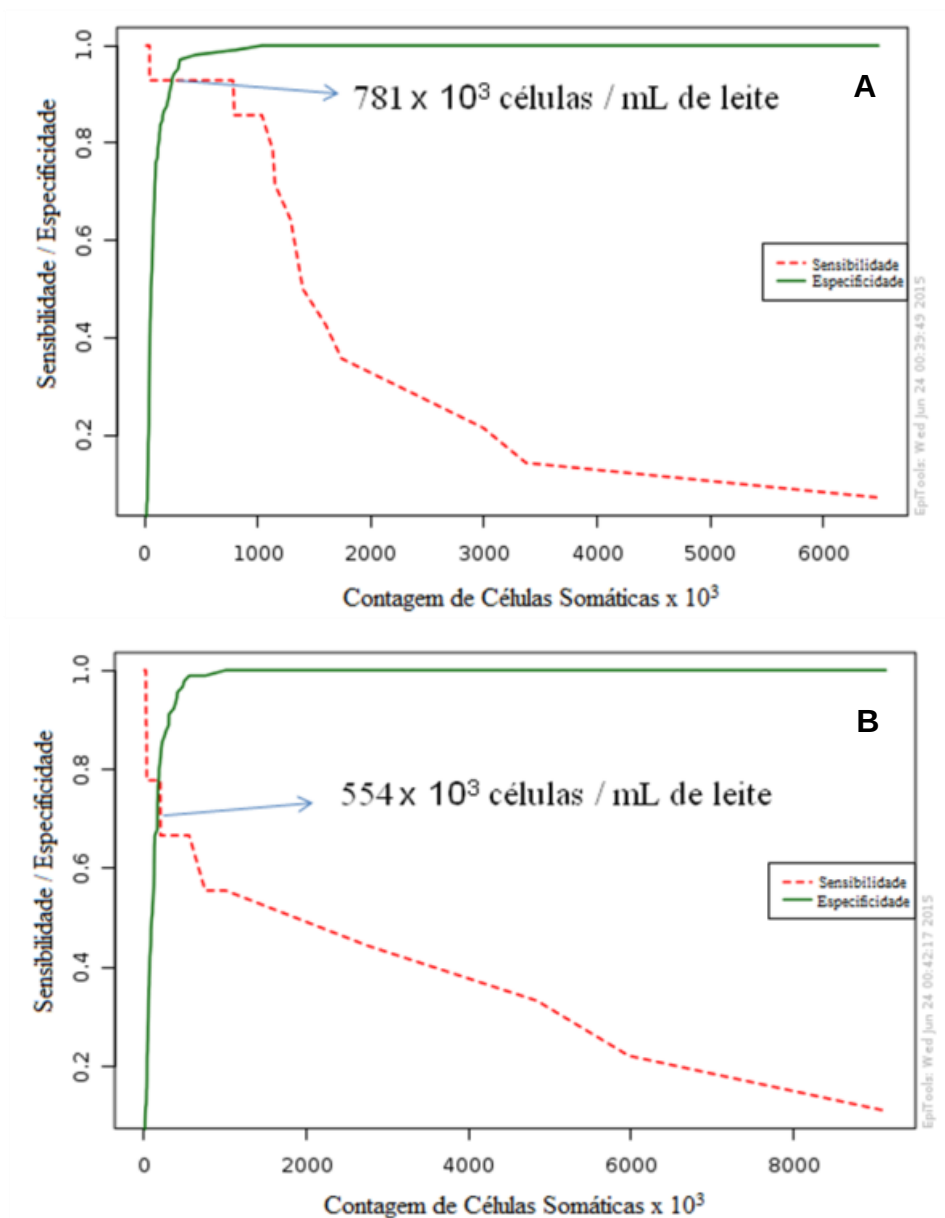


Figura 8. Pontos de corte para CCS e curva TG-ROC de acordo com os resultados de contagens celulares, considerado valores superiores a 1.000.000 como positivo para mastite subclínica e exames microbiológicos em leite de metades mamárias de ovelhas Ile -de- France durante a lactação (A) e desmame (B).

Determinou-se ponto de corte 781×10^3 células/mL para as amostras de leite da raça Ile de France no período de lactação e o valor de CCS apresentado ao desmame foram inferiores em relação aos resultados da lactação, com ponto de corte 554×10^3 células/mL de leite.

Silva et al. (2009) observaram alta contagem de células somáticas em ovelhas Santa Inês no primeiro mês de lactação, obtendo média de 900 mil

células/mL de leite. Blagits et al. (2010) selecionaram ovelhas da raça Santa Inês 12 dias antes do desmame, relatando amostras de leite com exame bacteriológico positivo com média de CCS 635.500 células/mL de leite.

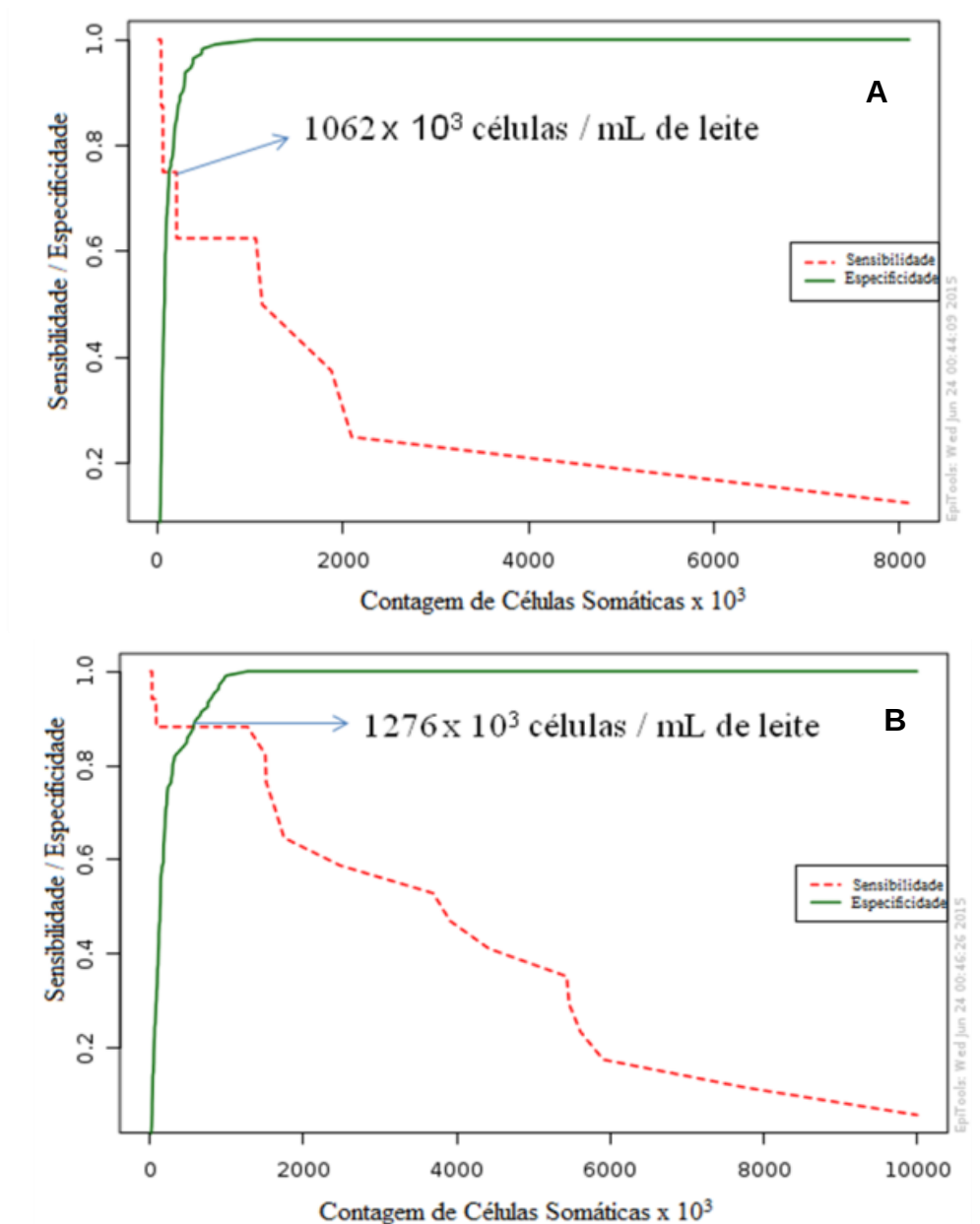


Figura 9. Pontos de corte para CCS e curva TG-ROC de acordo com os resultados de contagens celulares, considerado valores superiores a 1.000.000 como positivo para mastite subclínica e exames microbiológicos em leite de metades mamárias de ovelhas Dorper durante a lactação (A) e desmame (B).

As amostras de leite oriundas de ovelhas da raça Dorper no período de lactação apresentaram pontos de corte para CCS superiores em relação às outras

raças estudadas, 1062×10^3 células/mL de leite no período de lactação e 1276×10^3 células/mL de leite no período de desmame. Clements; Taylor e Fitzpatrick (2003), realizaram contagem de células somáticas e exames microbiológicos em 195 metades mamárias clinicamente normais no período de duas semanas após o parto e sugeriram um ponto de corte 1200×10^3 células/mL de leite.

Em seus estudos com ovelhas da raça Ossimi durante a lactação, Hussein; El-Khabaz e Malek (2015) relataram média de CCS de 1520×10^3 células/mL de leite em amostras com mastite subclínica e 293×10^3 células/mL de leite em metades mamárias saudáveis.

No presente trabalho, houve poucos resultados de isolamento microbiológico em amostras de leite de metades mamárias de ovelhas das raças Texel, Ile de France e Dorper. Assim, as amostras de leite que apresentaram CCS superior a 1.000.000 com ausência de isolamento microbiológico foram consideradas positivas para mastite subclínica, devido a baixa ocorrência de casos nestas raças.

Na França, Berthelot et al. (2006), determinaram o valor de CCS inferior a 500×10^3 células/mL de leite como classificação de metades mamárias saudáveis e CCS superior a 1000 ou 1200×10^3 células/mL de leite para metades mamárias infectadas. Contagens entre 500 e 1000×10^3 células/mL de leite indicam casos de mastite subclínica com a necessidade de realizar exames microbiológicos para a correta confirmação.

Diante da dificuldade de identificar animais com mastite subclínica uma vez que faltam métodos de diagnóstico confiáveis para a espécie ovina, a CCS possui grande eficiência na identificação de metades mamárias com processos inflamatórios, mas seus resultados podem ser influenciados por fatores fisiológicos como fase da lactação, número de lactações, frações do leite, idade da fêmea, estresse, estados nutricionais e por fatores patológicos causadores de infecção intramamária (BERGONIER; BERTHELOT, 2003; ANDERSON; HULL; PUGH, 2005)

Além disso há também uma grande variação na CCS entre propriedades e entre rebanhos formados por diferentes raças (HUSSEIN; EL-KHABAZ; MALEK, 2015) como foi observado neste estudo. Futuramente, trabalhos de cruzamentos entre as raças podem ser desenvolvidos com a finalidade de identificar o potencial genético para a resistência à mastite.

6. CONCLUSÕES

- Ovelhas da raça Santa Inês apresentaram maior ocorrência de mastite subclínica em relação as outras raças, cuja etiologia infecciosa predominante foi composta por *Estafilococos* coagulase-negativos. A espécie mais frequente foi *Staphylococcus xylosus*.

- Maiores valores de sensibilidade e especificidade para a CCS foram obtidos para as raças Ile de France e Dorper na lactação, enquanto ao desmame destacaram-se as raças Texel e Dorper.

- Não houve concordâncias ideais ao comparar as reações de CMT e CCS para a triagem da mastite subclínica. Os resultados do teste variaram de acordo com a raça ovina.

- A CCS pode ser utilizada para triagem da mastite subclínica em ovelhas de corte de acordo com a prevalência da doença em cada raça, auxiliando técnicos e produtores a melhorar o controle da enfermidade nos rebanhos.

7. REFERÊNCIAS

- ACCO-SC, Associação Catarinense de Criadores de Ovinos. **Padrão racial: White Dorper**, 2013. Disponível em: <http://www.acco-sc.com.br/?page_id=238>. Acesso em: 29 de agosto de 2015.
- AL-MAJALI, A.M.; JAWABREH, S. Period prevalence and etiology of subclinical mastitis in Awassi sheep in southern Jordan. **Small Ruminant Research**, v.47, p.243-248, 2003.
- ALMEIDA, B. M. **Aspectos da sustentabilidade da ovinocultura e avaliação de uma metodologia profilática contra mastite clínica em ovelhas Santa Inês no agreste sergipano**. 2007. 66 f. Dissertação (Mestre em Agroecossistemas) - Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão, Sergipe. Brasil.
- 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, v.1, p.19-26, 1999.
- AMARAL, F.R.; ESCRIVÃO, S.C. Aspectos relacionados à búfala leiteira. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n.2, p.111-117, 2005.
- ANDERSON, D. E.; HULL, B. L.; PUGH, D. G. Enfermidades da glândula mamária. In: PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo:Roca, p.379-399, 2005.
- ANDREWS, A.H.; BLOWEY, R.W.; BOYD, H.; EDDE, R.G. **Medicina Bovina. Doenças e Criação de Bovinos** (2ª Ed.), São Paulo, Editora Roca, p.276-359, 2008.
- ANUALPEC 2014. **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: Informa economics FNP South America, p.241, 2014.
- ARIZNABARRETA, A.; GONZALO, C.; PRIMITIVO, F.S. 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, 2002.
- ARSENAULT, J.; DUBREUIL, J.; HIGGINS, R.; BE´LANGER, D. Risk factors and impacts of clinical and subclinical mastitis in commercial meat-producing sheep flocks in Quebec, Canada. **Preventive Veterinary Medicine**, v.87, n.3-4, p.373-393, 2008.
- AUSVET ANIMAL HEALTH SERVICES. **Calculate test Sensitivity and Specificity and ROC curves**. Disponível em:<http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=ROC_curves>. Acesso em 29 de maio de 2015.

BARBOSA, D. A.; BLAGITZ, M. G.; AZEDO, M. R.; BATISTA, C. F.; GOMES, V.; BARBOSA, P. R.; BERGMANN, G. Composição do sangue e do leite em ovinos leiteiros do sul do Brasil: variações na gestação e na lactação. **Ciência Rural**, v.36, n.3, 2006.

BARBOSA, D.A.; BLAGITZ, M.G.; KITAMURA, S.S.; GOMES, V.; BASTOS, C.R.; BINTES, N.R.; VERÍSSIMO, C.J.; MADUREIRA, K.M.; DELLA LIBERA, A.M.M.P. Comparação entre a contagem de células somáticas em leite de ovinos empregando técnicas direta e indireta. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.71, p.384-387, 2004. Suplemento. Trabalho apresentado na REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 17., 204, São Paulo. Resumo 203.

BARREIRA, A. C. R. **Avaliação da qualidade do leite de ovelha na Beira Baixa com base em contagem de células somáticas**, 2008 64p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública Veterinária) - Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, 2008.

BARROS, N.N.; VASCONCELOS, V.R.; WANDER, A.E.; ARAÚJO, M.R.A. Eficiência bioeconômica de cordeiros F1 Dorper x Santa Inês para produção de carne. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.8, p.825-831, 2005.

BATAVANI, R.A.; MORTAZ, E.; FALAHIAN, K.; DAWOODI, M.A. Study on frequency, etiology and some enzymatic activities of subclinical ovine mastitis in Urmia, Iran. **Small Ruminant Research**, v.50, p.45-50, 2003

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

BERTHELOT, X.; LAGRIFFOUL, G.; CONCORDET, D. et al. Physiological and pathological thresholds of somatic cell counts in ewe Milk. **Small Ruminant Research**, v.62, p.27-31, 2006.

BIBERSTEIN, E. L.; HIRSH, D. C. Corinebactérias; *Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes*; *Rhodococcus equi*. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.119-126, 2003.

BLAGITZ, M.G.; BATISTA, C.F.; GOMES, V.; SOUZA, F.N.; DELLA LIBERA, A. M. M. P . Variações metodológicas na contagem de células somáticas do leite de ovelhas da raça Santa Inês. **Ciência Rural**, v.43, n.4, p.668-671, 2013.

BLAGITZ, M. G.; BATISTA, C. F.; NUNES, G. R.; SOUZA, F. N.; GOMES, V.; AZEDO, M. R.; SUCUPIRA, M. C. A.; MELVILLE, A. M.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. D. Características físico-químicas, celulares e microbiológicas da secreção mamária de ovelhas Santa Inês no período lactante e pós-desmame. **Revista de Ciências Agrárias**, v.53, n.2, p.137-142, 2010.

BLAGITZ, M.G.; BATISTA, C.F.; SOUZA, F.N.; BENITES, N.R.; MELVILLE, P.A.; STRICAGNOLO, C.R.; RICCIARDI, M.; GOMES, V.; AZEVEDO, M.R.; SANCHES, B.G.S.; DELLA LIBERA, A.M.M.P. Perfil celular e microbiológico do leite de ovelhas Santa Inês no período lactante e pós-desmame. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.9, p.417-422, 2008

BLAGITZ, M. G. **Avaliação da relação do exame físico da glândula mamária de ovelhas da raça Santa Inês com o perfil citológico e bacteriológico do leite**, 2007 195p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2007.

BOLSANELLO, R. X.; HARTMAN, M.; DOMINGUES, P.F.; MELLO JÚNIOR, A. S.; LANGONI, H. Etiologia da mastite em ovelhas Bergamácia submetidas á ordenha mecânica criadas em propriedades de Botucatu, SP. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.1, p.221-227, 2009.

BRITO, A. História da raça: ovino Dorper e White Dorper, 2012. **Revista on-line Rural Centro**. Editoria: Pecuária. Disponível em: <<http://ruralcentro.uol.com.br/noticias/historia-da-raca-ovino-dorper-e-white-dorper-52673>>. Acesso em: 22 de julho de 2015.

BRITO, M. A. **Variação dos perfis metabólico, hematológico e lácteo de ovinos leiteiros em confinamento**, 2004 59p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, 2004.

BURRIEL, A. R. Isolation of coagulase-negative staphylococci from the milk and environment of sheep. **Journal of Dairy Research**, v.65, n.1, p.139-142, 1998.

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

CAVALCANTE, M. P. **Mastite caprina: etiologia bacteriana e sensibilidade aos antimicrobianos**, 2008 82p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2008.

CLEMENTS, A.C.A.; TAYLOR, D.J.; FITZPATRICK, J.L. Evaluation of diagnostic procedures for subclinical mastitis in meat-producing sheep. **Journal of Dairy Research**, v.70, p.139-148, 2003.

CLOETE, J.J.E.; CLOETE, S.W.P.; OLIVIER, J.J.; HOFFMAN, L.C. Terminal crossbreeding of Dorper ewes to Ile de France, Merino Landsheep and SA Mutton Merino sires: ewe production and lamb performance. **Small Ruminant Research**, v.69, p.28-35, 2007.

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

CORREIA, C.A.R. **Caracterização de mamites em pequenos ruminantes abatidos para consumo**, 2013 90p. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar). Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2013.

COUTINHO, M.A.B.A.P. **Avaliação da relação entre contagens de células somáticas e os agentes mais prevalentes de mastite em exploração leiteira da região de Douro e Vouga**, 2014 62p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2014.

COUTINHO, D. A.; COSTA, J. N.; RIBEIRO, M. G.; TORRES, J. A. Etiologia e sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de bactérias isoladas de ovelhas da raça Santa Inês com mastite subclínica. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.7, n.2, p.139-151, 2006.

CUNHA E.A.; BUENO, M.S.; SANTOS, L.E.; VERÍSSIMO, C.J. Santa Inês – A produção intensiva de carne. **Revista o Berro**. n.63, p.6, 2004.

DELLA LIBERA, A. M. M. P.; ARAUJO, W. P.; COSTA, E. O.; GARCIA, M.; TÁVORA, J. F. P.; BENATTI, L. A. T. Características físico-químicas e microbiológicas do leite de vacas sem alterações ao exame físico da glândula mamária e com alta contagem de células somáticas. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.1, n.2, p.42-47, 2001.

DRESCHER, G.; MATTIELLO, S. P.; PEIXOTO, R. M.; VARGAS, A. C.; MACIEL, M. N.; COSTA, M. M. Caracterização bioquímica e perfil de sensibilidade de agentes bacterianos isolados de mastite subclínica ovina na região oeste de Santa Catarina. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.1, p.188-193, 2010.

DYCE, K.M., SACK, W.O & WENSING, C.J.G. **Textbook of Veterinary Anatomy** (4º Ed). Philadelphia: Saunders The Curtis Center, p.721-727, 2010.

EL-JAKEE, J. K.; AREF, N.E.; GOMAA, A.; EL-HARIRI, M.D.; GALAL, H.M.; OMAR, S.A.; SAMIR, A. Emerging of coagulase negative staphylococci as a cause of mastitis in dairy animals: An environmental hazard. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v.1, p.74-78, 2013.

FONSECA, J. F.; BRUSCHI, J. H.; MARINHO, A. C. S.; RODRIGUES, I. M. Produção de Caprinos e Ovinos de Leite. **Embrapa Gado de Leite**, cap.9, p.193-212, 2011.

GARCIA, I.F.F.; PEREZ, J.R.O.; TEIXEIRA, J. C. Componentes de carcaça e composição de alguns cortes de cordeiros Texel x Bergamácia, Texel x Santa Inês e Santa Inês puros, terminados em confinamento, com casca de café como parte da dieta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1999-2003, 2003.

GARINO JÚNIOR, F.; WATANABE, E.T.; SANTOS, F.G.B.; BALBINO, T.C.L.; COSTA, E.O. Eficácia terapêutica em mastite clínica e análise de fatores preditivos. **Revista Napgama**, v.9, n.2, p.9-16, 2006.

GOMES, V.; AMATO, A.L.; PONTES, G.C.T.G.; BLAGITZ, M.; MADUREIRA, K.M.; MELVILL, A.M.; DELLA LIBERA, P. Contagem automática e microbiológica direta das células somáticas do leite de ovelhas da raça Lacaune, utilizando como corantes o Rosenfeld e Verde de Metil e Pironina-Y. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.1, p.162-167, 2010.

GOMES, M.J.P. **Staphylococcus spp.** In: LABACVET 2007-II. Microbiologia Clínica. Disponível em: < <http://www.ufrgs.br/labacvet/pdf/staphylo.pdf> >. Acesso em 15 de Novembro de 2015.

GONZALO, C.; ARIZNABARRETA, A.; CARRIEDO, J.A.; PRIMITIVO, F.S. Mammary pathogens and their relationship to somatic cell count and milk yield losses in dairy ewes. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.6, p.1460-1467, 2002.

GUARANÁ, E. L. S.; SANTOS, R. A.; CAMPOS, A. G. S. S.; SILVA, N. S. AFONSO, J. A. B.; MENDONÇA, C. L. Dinâmica celular e microbiológica do leite de ovelhas Santa Inês acompanhadas durante a lactação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.10, p.851-858, 2011.

HARMON, R. J.; EBERHART, R. J.; JASPER, D. E.; LANGLOIS, B. E.; WILSON, R. A. *Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infections*, 3ª ed. Arlington, VA, **National Mastitis Council**, 1990.

HARTMAN, M.; BOLSANELLO, R.X.; DOMINGUES, P.F.; MELLO JÚNIOR, A.S.; LANGONI, H. Efeito da mastite sobre a contagem de células somáticas (CCS) em ovelhas da raça Bergamácia. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.1, p.213-220, 2009.

HEIDRICH, H.J.; RENK, W. **Enfermedades de las glandulas mamarias en los animales domesticos**. Barcelona: Labor, 502p., 1969.

HIRSH, D. C. Família Enterobacteriaceae. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.59-62, 2003.

HOLMBERG, O. *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.45, p.1-144, 1973.

HOLT, J.G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; STANLEY, T. W. **Gram-positive cocci**. In: **BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p.544-551, 1994.

HUSSEIN, H.A.; EL-KHABAZ, K.A.S.; MALEK, S.S. Is udder ultrasonography a diagnostic tool for subclinical mastitis in sheep? **Small Ruminant Research**. n.129, p.121-128, 2015.

KERN, G.; TRAULSEN, I.; KEMPER, N.; KRIETER, J. Analysis of somatic cell counts and risk factors associated with occurrence of bacteria in ewes of different primary purposes. **Livestock Science**, v.157, p.597–604, 2013.

KLOOS, W. E.; SCHLEIFER, K. H. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.1, n.1, p.82-88, 1975.

KOBAYASHI, S. D.; BRAUGHTON, K. R.; PALAZZOLO-BALANCE, A. M.; KENNEDY, A. D.; SAMPAIO, E.; KRISTOSTURYAN, E.; WHITNEY, A. R.; STURDEVANT, D. E.; DORWARD, D.W.; HOLLAND, S.M.; KREISWIRTH, B. N.; MUSSER, J. M.; DeLEO, F. R. Rapid neutrophil destruction following phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Innate Immunity**, v. 2, n.6, p. 560-575, 2010.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR, W.C.W. **Diagnóstico microbiológico** – Texto e atlas colorido. 5.ed. Rio de Janeiro: Medsi, p.1465, 2001.

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, n.1-2, p.83-86, 2006.

LAZIA, B. Ovinos da raça Santa Inês são bons produtores de carne, leite e pele, 2012. **Portal Agropecuário** - CPT (Centro de Produção Técnica). Disponível em: <<http://www.portalagropecuario.com.br/ovinos-e-caprinos/criacao-de-ovelhas/ovinos-da-raca-santa-ines-sao-bons-produtores-de-carne-leite-e-pele/>>. Acesso em: 1 de agosto de 2015.

LUCHEIS, S.B.; HERNANDES, G.S.; TRONCARELLI, M.Z. Monitoramento microbiológico da mastite ovina na região de Bauru, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.3, p.395-403, 2010.

MAISI, P.; JUNTILA, J.; SEPPANEN, J. Detection of subclinical mastitis in ewes. **British Veterinary Journal**, v.143, n.5, p.402-409, 1987.

MANGIERI JUNIOR, R. **Mastite subclínica em rebanhos ovinos e elaboração de tratamento homeopático para prevenção e controle destas doenças**, 2010 86p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2010.

MANUAL BENTLEY 2000 Operator's manual. Chaska, EUA, Bentley Instruments, p.77, 1994.

MARTINEZ, E.Z.; LOUZADA-NETO, F.; PEREIRA, B.B. **A curva ROC para testes diagnósticos**. Caderno Saúde Coletiva, v.11, n.1, p.7-31, 2003.

McDOUGALL, S.; MURDOUGH, P.; PANKEY, W.; DENANEY, C.; BARLOW, J.; SCRUTON, D. Relationship among somatic cell count, California Mastitis Test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. **Small Ruminant Research**, v.40, p.245-254, 2001.

MEDRONHO, R.A.; PEREZ, M.A. 2002. **Testes diagnósticos**, p.259-270. In: Medronho R.A. (ed.) Epidemiologia. Editora Atheneu, São Paulo.

MELO, C.; ALMEIDA, B.M.; OLIVEIRA, A.A.; AZEVEDO, H.C.; MELO, I.S.S.; MATA, S.S. Avaliação de uma metodologia profilática contra a mastite clínica em ovelhas da raça Santa Inês. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.60, n.4, p.1011-1013, 2008.

MENDONÇA, C. L.; AFONSO, J. A. B.; COSTA, N. A. **Mastite em ovelhas**. Veterinária e Zootecnia, CRMV-PE, n.1, p.7, 2005.

MENZIES, P. I.; RAMANOON, S. Z. Mastitis of sheep and goats. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v.17, n.2, p.333-358, 2001.

MILNE, C.; The history of the Dorper sheep. **Small Ruminant Research**, n.36, p.99-102, 2000.

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

NUNES. G. R.; BLAGITZ, M. G.; FREITAS, C. B.; SOUZA, F. N.; RICCIARDI, M.; STRICAGNOLO, C. R.; SANCHES, B. G. S.; AZEDO, M. R.; SUCUPIRA, M. C. A.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Avaliação de Indicadores Inflamatórios no diagnóstico da mamite ovina. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, n.3, p.271-278, 2008.

OLECHNOWIEZ, J.; JASKOWSKI, J. M. Mastitis in small ruminants. **Medycyna Weterynaryjna**, v.70, p.67-72, 2014.

OLIVEIRA, L.G.L. **Estudo clínico-epidemiológico e bacteriológico da mastite em ovelhas da raça Santa Inês no Agreste Meridional do Estado de Pernambuco**, 2007 48p. Dissertação de Mestrado em Clínica Médica Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.

OVIEDO-BOYSSO, J.; VALDEZ-ALARCÓN, J. J.; CAJERO-JUÁREZ, M.; ZARZOSA, A. O.; MEZA, J. E. L.; PATIÑO, A. B.; BAIZABAL-AGUIRRE, V. M. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. **Journal Infection**, v.54, p.399-409, 2006.

PAIVA, S.R.; SILVÉRIO, V.C.; EGITO, A.A.; MCMANUS, C.; DE FARIA, D.A.; MARIANTE, A.S.; CASTRO, S.R.; ALBUQUERQUE, M.S.M.; DERGAM, J.A. Genetic variability of the Brazilian hair sheep breeds. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.9, p.887-893, 2005.

PEIXOTO, R.M. **Mastite em pequenos ruminantes: etiologia, fatores de risco, diagnósticos e sensibilidade aos agentes antimicrobianos e extratos de plantas**, 2009. 111p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina, 2009.

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

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia: Teoria e Prática**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabra Koogan, 596p., 2002.

PEREIRA, P.F.V.; STOTZER, E.S.; PRETTO-GIORDANO, L.G. et al. Fatores de risco, etiologia e aspectos clínicos da mastite em ovelhas de corte no Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.1, p.1-10, 2014.

PESSOA, R. S.; AZEVÊDO, D. M. M. R.; SILVA, D. C.; MOURA JÚNIOR, P. N. **Origem e principais características da raça Santa Inês**, 2003. Disponível em: <<http://www.ufpi.br/subsiteFiles/capriovis/arquivos/files/Artigo%208.pdf>>. Acesso em: 14 de julho de 2015.

PILIPČINCOVÁ, I.; BHIÐE, M.; DUDRIKOVÁ, E.; TRÁVNICEK, M. Genotypic Characterization of Coagulase-negative *Staphylococci* Isolated from Sheep Milk in Slovakia. **Acta Veterinaria Brno**, v.79, n.2, p.269-275, 2010.

PILON, L. E.; ZAFALON, L.F.; SANTANA, R.C.M.; FIM JÚNIOR, G.A.; MANIERI, F.Z.; LOPES, N.S.S. Espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos isoladas da glândula mamária de ovelhas com mastite subclínica. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.8, n.5, p.35-39, 2014.

PRADIEÉ, J.; MORAES, C.R.; GONÇALVES, M.; VILANOVA, M.S.; CORRÊA, G.F.; LAUZ, O.G.; OSÓRIO, M.T.M.; SCHMIDT, V. Somatic cell count and California Mastitis Test as a diagnostic tool for subclinical mastitis in ewes. **Acta Scientiae Veterinariae** v.40, n.2, p.1038, 2012.

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

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Veterinary Medicine - A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. W. B. Saunders, 10º Ed., p. 603-700, 2007.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9.ed. Rio de Janeiro, p.1737, 2002.

RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. **Veterinary Research**, v.37, n.3, p.369-400, 2006.

RAINERI, C.; GAMEIRO, A. H.; MENDES, R. A. Em busca de uma melhor coordenação na ovinocultura brasileira, 2010. **FarmPoint: Cadeia Produtiva**. Disponível em: <<http://www.farmpoint.com.br/cadeia-produtiva/espaco-aberto/em-busca-de-uma-melhor-coordenacao-na-ovinocultura-brasileira-60426n.aspx>>. Acesso em: 30 de setembro de 2015.

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

RIVAS, A. L.; SCHWAGER, S. J.; GONZÁLEZ, R. N.; QUIMBY, F. W.; ANDERSON, K.L. Multifactorial relationships between intramammary invasion by *Staphylococcus aureus* and bovine leukocyte markers. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.71, n.2, p.135-144, 2007.

RODA, D.S.; SANTOS, L.E.; CUNHA, E.A. Desempenho de ovinos em sistema de acasalamento a cada oito meses. **Boletim da Indústria Animal**, Nova Odessa, v.50, p.49-54, 1993.

SANTANA, R.C.M. **Tratamento da mastite subclínica de ovelhas no período seco com antimicrobiano convencional e antimicrobiano nanoparticulado**. 2014. 92p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal. Jaboticabal.

SANTANA, R.C.M.; ZAFALON, L.F.; ESTEVES, S.N.; TANAKA, E.V.; PILON, L.E.; MASSA, R. Occurrence of etiologic agents causing subclinical mastitis in Morada Nova and Santa Ines ewes. **ARS VETERINARIA**, v.29, n.3, p.148-152, 2013.

SANTOS, J.C. Ovinocultura: Um mercado a ser explorado, 2015. **"Revista Cabra & Ovelha - Sua Parceira de Verdade"**. Disponível em :<<http://extrasm.com.br/blogs/ovinocultura-um-mercado-a-ser-explorado/>>. Acesso em: 02 de outubro de 2015.

SANTOS, L.M.M. **Mastite Caprina: Etiologia e influência na qualidade do leite**, 2009. 43p. Monografia (Especialização em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal) - Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, 2009.

SANTOS, E. M. P.; BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C.; BRITO, J. R. F.; CERQUEIRA, M. M. P. *Streptococcus* e gêneros relacionados como agentes etiológicos de mastite bovina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, n.1, p.17- 27, 2007.

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

SCHMIDT, M.I.; DUNCAN, B.B. **Epidemiologia clínica e a medicina embasada em evidências**. In: ROUQUAYROL, M.Z., ALMEIDA FILHO, N. Epidemiologia e Saúde. 5.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1999, 600 p.

SEBRAE (Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas). **Ovinocaprinocultura**, 2013. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/setor/ovino-e-caprino/o-setor/raca-ovino/texel/bia-t-279/2006-11-01.5830047856>>. Acesso em: 02 de agosto de 2015.

SILVA, G. V. Identificação das espécies de *Staphylococcus* presente no leite de ovinos. **Revista Verde (Mossoró – RN)**, v.7, n.4, p.188-194, 2012.

SILVA, N.S.; SILVEIRA, J.A.; PINHEIRO, C.P.; SOUSA, M.G.S.; OLIVEIRA, C.M.C.; MENDONÇA, C.L.; DUARTE, M.D.; BARBOSA, J.D. Etiologia e perfil de sensibilidade de bactérias isoladas de ovelhas com mastite na região nordeste do estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.12, p.1043-1048, 2010.

SILVA, M.A.P.; DIAS, M.J.; CORRÊA, F.A.F.; TIARINE, R.R.; BARROS, J.C.; SANTOS, P.A.; NICOLAU, E.S. Avaliação eletrônica do leite de ovelhas da raça Santa Inês. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.3, n.25, p.624, 2009.

SOUSA, W. H.; LOBO, R. N. B.; MORAIS, R. M. Santa Inês: estado de arte e perspectivas. **Revista O Berro**, v. 82, p. 78-82, 2005.

SOUSA, W.H.; LEITE, P.R.M. Ovinos de corte: a raça Dorper. João Pessoa: EMEPA-PB, 75p. 2000.

SWANSON, T. J.; HAMMER, C. J.; LUTHER, J. S.; CARLSON, D. B.; TAYLOR, J. B.; REDMER, D. A.; NEVILLE, T. L.; REED, J. J.; REYNOLDS, L. P.; CATON, J.S.; VONNAHME, K.A. Effects of gestational plane of nutrition and selenium supplementation on mammary development and colostrum quality in pregnant ewe lambs. **Journal of Animal Science**, v.86, p.2415-2423, 2008.

TEIXEIRA, T. **Sistema de criação de ovinos nos ambientes ecológicos do sul do Rio Grande do Sul**. Embrapa Pecuária Sul- Sistema de Produção, agosto/2008. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ovinos/CriacaoOvinosAmbientesEcologicosSulRioGrandeSul/racas.htm>. Acesso em: 30 de julho de 2015.

TEJADA, T.S.; SILVA, D.T.; DIAS, P.A.; CONCEIÇÃO, R.C.S.; MÜLLER NETO, H.; TIMM, C.D. Mastite subclínica por *Staphylococcus* coagulase negativa em ovinos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.4, p.1074-1076, 2012.

VERÍSSIMO, C.J.; ZAFALON, L.F.; OTSUK, I.P.; NASSAR, A.F.C. Prejuízos causados pela mastite em ovelhas Santa Inês. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.4, p.583-591, 2010.

WATKINS, G. H.; BURRIEL, A. R.; JONES, J. E. A field investigation of subclinical mastitis in sheep in southern England. **British Veterinary Journal**, v.147, n.5, p. 413-420, 1991.

WHITE, E. The prevalence of mastitis in small ruminants and the effect of mastitis on ruminant production. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING, San Antonio. **Proceedings...** San Antonio: NMC, v.46, p.119-127, 2007.

ZAFALON, L.F.; VESCHI, J.L.A.; MARTINS, K.B.; SANTANA, R.C.M. Ocorrência de mastite subclínica ovina durante duas lactações consecutivas em rebanho da raça Santa Inês. **Ciência Animal Brasileira**, v.16, n.1, p.116-124, 2015.

ZAFALON, L.F. **Mastite subclínica bovina por *Staphylococcus aureus*: qualidade e quantidade de leite secretado por quartos tratados e não tratados e relação custo/benefício do tratamento durante a lactação** 66p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal, 2003.