

Dinâmica celular e microbiológica do leite de ovelhas Santa Inês acompanhadas durante a lactação¹

Eduardo Levi de Sousa Guaraná², Rogério Adriano dos Santos², Anne Grace S. Siqueira Campos², Natália da Silva e Silva³, José Augusto Bastos Afonso⁴ e Carla Lopes de Mendonça^{4*}

ABSTRACT.- Guaraná E.L.S., Santos R.A., Campos A.G.S.S., Silva N.S., Afonso J.A.B. & Mendonça C.L. 2011. [Cellular dynamics and microbiological of milk of Santa Inês ewes accompanied during lactation.] Dinâmica celular e microbiológica do leite de ovelhas Santa Inês acompanhadas durante a lactação. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 31(10):851-858. Clínica de Bovinos, Campus Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Bom Pastor s/n, Cx. Postal 152, Mundaú, Garanhuns, PE 55292-901, Brazil. E-mail: carlalopes.mendonca@gmail.com

The aim of this study was to evaluate the dynamics of intramammary infection in ewes by means of clinical examination, direct somatic cell count and the isolation of bacterial agents involved in the process during lactation, as well as the sensitivity profile of these isolates to different antimicrobials. Thirty four ewes from the Santa Inês breed, raised under semi-intensive conditions and submitted to identical sanitary and nutritional management were evaluated before and after parturition, about 10 days before parturition, 15 days after parturition (dap), 30 dap, 60 dap and 90 dap (weaning). In the respective phases a clinical exam of the mammary gland was accomplished. The direct somatic cell count (SCC) and the California Mastitis Test (CMT) were carried out in the phases postpartum (15 dap, 30 dap, 60 dap and 90 dap) as well as the bacteriological analysis which was also accomplished in the experimental phase that preceded parturition when the ewes were not milked. Milk sampling was achieved by manual means. All ewes were submitted to lentivirus serology test. The variable data of SCC were tested for normality according to Kolmogorov-Smirnov and not attended the premise of normality were transformed into log base 10 (Log10). Therefore was performed the analysis of variance and contrast of means by Tukey test with significance level of $P < 0.05$. A descriptive study of the variables studied was done by frequency distribution (%). The average somatic cell count in negative reactions to the CMT varied 387.896,08 cells/mL to 620.611,11 cells/mL and glands reagents ranged up to 6.730.514,50 cells/mL, but there was no influence in the different stages of lactation. The results allowed to conclude that subclinical mastitis represents a sanitary concern in the breeding of Santa Inês ewes. The phase that precedes parturition is particularly worrying and deserves more attention since there is a higher bacterial isolation percentage in apparently healthy glands. In association, it was also in the first 30 days of lactation (initial phase) that a high frequency of bacterial isolation was perceived, with coagulase-negative *Staphylococcus* as the agent isolated in higher percentage.

INDEX TERMS: California Mastitis Test, somatic cell direct count, intramammary infection, *Staphylococcus* spp., sensitivity profile.

¹ Recebido em 14 de abril de 2011.

Aceito para publicação em 20 de junho de 2011.

Parte da Dissertação do primeiro autor no Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

² Pós-Graduando em Ciência Veterinária, UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil.

³ Pós-Graduanda em Saúde Animal na Amazônia, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará (UFPA), Campus Castanhal, Rua Maximino Porpino da Silva 1000, Castanhal, PA 68740-080, Brasil.

⁴ Clínica de Bovinos, Campus Garanhuns, UFRPE, Av. Bom Pastor s/n, Boa Vista, Cx. Postal 152, Garanhuns, PE 55292-270, Brasil. *Autor para correspondência: carlalopes.mendonca@gmail.com

RESUMO.- Objetivou-se neste estudo, avaliar a dinâmica da infecção intramamária de ovelhas por meio da avaliação clínica, da contagem de células somáticas e do isolamento de bactérias envolvidas na infecção mamária ao longo de toda a lactação, bem como o perfil de sensibilidade destes isolados frente a antimicrobianos. Foram avaliadas 34 ovelhas da raça Santa Inês criadas em sistema semi-intensivo e submetidas ao mesmo manejo higiênico-sanitário e nutricional acompanhadas antes e durante o período de lactação: aproximadamente 10 dias que precedeu ao parto, 15 dias pós-parto (dpp), 30 dpp, 60 dpp e 90 dpp (secagem). Nestes momentos foi realizado o exame clínico da glândula. A contagem de células somáticas (CCS) e o CMT foram realizados nos momentos seguintes ao parto (15dpp, 30dpp, 60dpp e 90dpp), assim como a análise bacteriológica, realizada além dos momentos citados anteriormente, também no momento que precedeu ao parto. A colheita do leite foi realizada por ordenha manual. Todas as ovelhas foram submetidas à sorologia para lentivírus. Os dados da variável CCS foram submetidos ao teste de normalidade segundo Kolmogorov-Smirnov e por não atender a premissa de normalidade, foram transformados em log de base 10 (Log10). Por conseguinte efetuou-se a análise de variância e contraste de médias pelo teste de Tukey com nível de significância de $P < 0,05$. Foi realizado o estudo descritivo das variáveis empregando-se a distribuição de frequências (%). O valor médio da CCS das glândulas não reagentes ao CMT, ao longo do período de lactação, variou de 387.896,08 células/mL a 620.611,11 células/mL e nas glândulas reagentes, dependendo do escore do CMT, apresentou valores médios que variaram de 2.133.914,19 células/mL a 6.730.514,50 células/mL, sem contudo sofrer influência das diferentes fases da lactação. Os resultados obtidos permitiram concluir que a mastite subclínica representa uma preocupação sanitária na criação de ovelhas Santa Inês, chamando-se atenção para o período que precede o parto devido o alto percentual de isolamento bacteriano em glândulas aparentemente saudáveis, bem como a elevada frequência de isolamento, particularmente de *Staphylococcus coagulase-negativo* no primeiro mês de lactação.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *California Mastitis Test*, contagem de células somáticas, infecção intramamária, *Staphylococcus* spp., perfil de sensibilidade.

INTRODUÇÃO

A exploração de ovinos na região Nordeste é uma opção viável e rentável não somente para pequenos e médios produtores, mas também para grandes pecuaristas (Alencar & Rosa 2006). Dentre as raças oriundas e criadas na região, destaca-se a Santa Inês, de aptidão para corte, por sua rusticidade, resistência às condições áridas, bom desenvolvimento ponderal e por se reproduzir o ano todo, representando excelente opção para matrizes em sistemas de produção, que envolvam cruzamento industrial. Contudo por ser uma raça originária das raças Bergamácia e Morada Nova apresenta características, que beneficiam a produção de leite, favorecendo o

aleitamento e o peso dos cordeiros, particularmente em manejo semi-intensivo e intensivo, verificando-se maior pré-disposição para a infecção da glândula mamária, não sendo o leite excedente consumido pelo borrego (Oliveira 2006).

Pouco se conhece sobre as particularidades da glândula mamária da ovelha, principalmente as de aptidão para corte. Em ovelhas, a mastite tem um grande impacto econômico para o produtor, se comparado aos efeitos na vaca e na cabra, pois a doença pode levar à redução no ganho de peso dos cordeiros e aumento da mortalidade. Nos casos agudos, os prejuízos decorrentes dessa enfermidade estão diretamente relacionados à morte de ovelhas no pico da lactação, com efeito deletério no desenvolvimento da cria, podendo ocasionar a morte do borrego, além de custos adicionais com a utilização de sucedâneos, bem como o descarte prematuro de animais, muitas vezes de alto valor genético nos casos crônicos (Menzies & Ramanoon 2001, Oliveira et al. 2007). Os casos clínicos de mastite podem ocorrer em qualquer período da lactação ou mesmo no período seco. As infecções mais graves ocorrem duas a quatro semanas após o parto e algumas vezes logo após o desmame (Menzies & Ramanoon 2001). Oliveira et al. (2007) observou na região do Agreste Meridional de Pernambuco maior ocorrência da doença logo após o parto. Um período considerado de maior risco é o final da lactação, caracterizado pela involução da glândula mamária, que tem início no momento em que os borregos são separados de suas mães e tem seu término em aproximadamente 30 dias depois, conforme relatado por Tatarczuch et al. (1997).

A mastite subclínica não é facilmente detectada na ovelha, no entanto compromete a produção do animal (Menzies & Ramanoon 2001). As alterações provocadas no tecido mamário refletem não somente na produção, como também nas características físicas e químicas do leite, no qual os principais componentes podem estar alterados, comprometendo a qualidade nutricional deste para a alimentação dos borregos (Almeida 2008). Segundo Watkins et al. (1991), a prevalência da mastite subclínica aumenta com a idade, sendo observada associação significativa entre a forma subclínica e a ocorrência de mastite clínica, causada pelo mesmo agente etiológico. Dentre os agentes causadores de mastite em ovelhas, *Staphylococcus* spp. é mais frequentemente diagnosticado. Outros microrganismos também foram relatados como causadores de mastite clínica, entre os quais *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Corynebacterium bovis*, *Actinomyces pyogenes*, *Histophilus ovis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Menzies & Ramanoon 2001, Oliveira et al. 2007). Como causadores de mastite subclínica destaca-se os *Staphylococcus coagulase-negativo* (SCN), já tendo sido também relatados *S. aureus*, *Corynebacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp., enterobactérias, *Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas* spp (McDougall et al. 2001, Menzies & Ramanoon 2001, Coutinho et al. 2006, Almeida 2008).

Muitos fatores, como a fase da lactação, o estado sanitário da glândula mamária, a produção, a variabilidade individual e a patogenicidade do agente etiológico, contribuem para o comprometimento da qualidade do leite (Bergonier et al. 2003). Nas ovelhas, principalmente com aptidão para corte, os estudos sobre alguns destes fatores são escassos e oriundos de informações pontuais, em virtude da maior dificuldade do acompanhamento durante toda a lactação, fato também ressaltado por Lafi et al. (1998). Com o intuito de melhor compreender a dinâmica da infecção intra-mamária em ovelhas Santa Inês submetidas a um mesmo sistema de criação, acompanhadas antes e após o parto, este estudo teve por objetivo realizar o acompanhamento clínico, a contagem direta de células somáticas e o isolamento bacteriano dos principais agentes envolvidos no processo durante todo o período de lactação, bem como o perfil de sensibilidade destes isolados frente a antimicrobianos

MATERIAL E MÉTODOS

Foram acompanhadas 34 ovelhas primíparas e múltíparas da raça Santa Inês criadas em sistema semi-intensivo e submetidas ao mesmo manejo higiênico-sanitário e nutricional acompanhadas antes e durante o período de lactação, compreendendo os seguintes momentos de avaliação: 10 dias que precedeu ao parto, 15 dias pós-parto (dpp), 30 dpp, 60 dpp e 90 dpp. O exame clínico do animal e, especificamente, da glândula mamária foi realizado seguindo as recomendações de Diffay et al. (2004). Os resultados do *California Mastitis Test* (CMT) foram classificados em escores: negativo (reação negativa ou traços) e positivo (1+, 2+ e 3+) (Schalm et al. 1971).

As análises das variáveis propostas neste estudo foram efetuadas nos momentos seguintes ao parto (15dpp, 30dpp, 60dpp e 90dpp), com exceção da análise bacteriológica, que foi realizada também no momento que precedeu ao parto (10 dias antes), fase esta de formação do colostro, a qual foi estabelecida por não ordenhar as ovelhas.

A colheita do leite foi realizada logo após a realização do exame clínico, pela manhã, por meio de ordenha manual, com separação prévia dos borregos 12h antes. A contagem direta de células somáticas (CCS) foi realizada de acordo com o método de Prescott & Breed, modificado pelo *Subcommittee on Screening Tests, National Mastitis Council* (1968) e adaptado por Santos et al. (2007). As amostras para o cultivo bacteriológico foram colhidas após higienização prévia do úbere, após desprezar os primeiros jatos e criteriosa antissepsia do óstio do teto com álcool 70%. As amostras (aproximadamente 3mL) foram acondicionadas em tubos previamente esterilizados e transportadas ao laboratório, sob refrigeração em caixa de material isotérmico. O cultivo bacteriológico foi realizado seguindo as recomendações do *National Mastitis Council* (1990) em placas de ágar-sangue de carneiro desfibrinado a 5% e ágar McConckey com posterior incubação a 37°C. As leituras foram realizadas às 24, 48, 72 e 96 horas; sendo observadas as características culturais das colônias (morfologia, produção de pigmento e hemólise) e morfotintórias, por meio do método de coloração de Gram e posterior caracterização bioquímica (Quinn et al. 1994). Os isolados bacterianos foram mantidos criopreservados (-80°C) em caldo BHI, adicionado de glicerol a 15%.

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado pelo método de difusão por discos (Bauer et al. 1966), seguindo as especificações do *Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI/NCCLS* (2005). Foram utilizados discos (Sensibiodisc, Cecon/Sensifar-Vet, Cefar Diagnóstica) impregnados com os seguintes antimicrobianos: Ampicilina (AMP-10µg), Cefalotina (CEP-30µg), Cefoxitina (FOX-30µg), Enrofloxacin (ENR-5µg), Eritromicina (ERY-15 µg), Estreptomicina (STR-10µg), Gentamicina (GEN-10µg), Kanamicina (KAN-30µg), Neomicina (NEO-30µg), Oxacilina (OXA-1µg), Penicilina G (PEN-10 UI), Sulfazotrim (SXT-25µg) e Tetraciclina (TCY-30µg). Para o controle na qualidade de execução, cepas padrão (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) foram testadas sob as mesmas condições de meios de cultivo e incubação (37°C/24h) e as após a leitura do diâmetro dos halos, determinado o perfil de sensibilidade e resistência dos isolados.

No momento que antecedeu ao parto (10 dias antes) foram resgatadas informações referentes às ovelhas como, número de parições anteriores, número de crias, ocorrência anterior de mastite, número de glândulas acometidas e utilização prévia de antimicrobianos intramamário. Neste mesmo momento que antecedeu ao parto e na fase final da lactação (90dpp) foi realizada a sorologia para lentivírus (IDGA) (Biovotech Ltda-ME, Recife, PE).

Os dados da variável CCS foram submetidos ao teste de normalidade segundo Kolmogorov-Smirnov e, como não atendeu a premissa de normalidade, estes foram transformados em log de base 10 (Log10). Por conseguinte efetuou-se a análise de variância e contraste de médias pelo teste de Tukey com nível de significância de $P < 0,05$. Os dados da CCS foram expressos como média e desvio padrão, porém a estatística foi baseada com os dados transformados. Foi realizado o estudo descritivo das variáveis estudadas empregando-se a distribuição de frequências (%) (Curi 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante os cinco momentos de observação, antes e ao longo de toda a lactação, foram avaliadas 340 amostras de leite provenientes das 68 glândulas mamárias examinadas (n=34 ovelhas). Destas 340, cinco amostras (1,47%) foram provenientes de glândulas diagnosticadas com mastite clínica. No decorrer do trabalho duas ovelhas morreram por motivos outros que não mastite e outras não apresentaram leite, tinham secado, na fase final de lactação aos 90 dpp, totalizando 17 amostras. O resultado do exame sorológico para o diagnóstico de lentivírus foi negativo em todas as ovelhas estudadas. Das 318 amostras restantes analisadas, 68 eram provenientes do momento que antecedeu ao parto, correspondente à fase de formação do colostro, empregadas apenas para realização do cultivo bacteriológico, e as outras 250 restantes eram amostras de glândulas que foram submetidas ao exame clínico e ao CMT em todos os momentos estabelecidos na lactação. Das 250 amostras de leite submetidas ao CMT 163 (65,2%) não reagiram ao teste e 87 (34,8%) foram reagentes, ao longo de toda a lactação, conforme pode ser observado no Quadro 1.

Quadro 1. Percentual de amostras de leite de ovelhas da raça Santa Inês não reagentes e reagentes (1+, 2+, 3+) no CMT em diferentes fases da lactação

Reação ao CMT	Fases da lactação				
	15 dpp %(n)	30 dpp %(n)	60 dpp %(n)	90 dpp %(n)	TOTAL %(n)
Não reagentes	64,18(43)	65,67(44)	63,64(42)	68,0(34)	65,2(163)
1 +	5,97(04)	16,42(11)	13,63(09)	14,0(07)	12,4(31)
2 +	10,45(07)	5,97(04)	15,15(10)	6,0(03)	9,6(24)
3 +	19,40(13)	11,94(08)	7,58(05)	12,0(06)	12,8(32)
Reagentes (1+, 2+, 3+)	35,82(24)	34,33(23)	36,36(24)	32,0(16)	34,8(87)
Total	n=67	n=67	n=66	n=50	n=250

Os resultados obtidos foram semelhantes aos verificados por Coutinho et al. (2006), Domingues et al. (2006) e Almeida (2008), que relataram percentuais entre 30% e 36% de positividade no teste e inferiores aos relatados por Oliveira (2006), de 41,1%. Por outro lado, Bolsanello et al. (2009) examinando 482 amostras de leite de ovelhas, relataram percentual de 4,36% de amostras reagentes ao CMT, atribuindo este baixo percentual ao cuidado higiênico-sanitário adotado durante a ordenha.

Considerando todas as 68 glândulas mamárias submetidas ao exame clínico em cada uma das fases da lactação, constatou-se percentual de ocorrência de mastite subclínica de 23,53% a 35,29%. Observa-se uma equidistribuição destes percentuais nos primeiros dois meses de lactação, com valores inferiores na fase final, aos 90 dias (Quadro 2). A frequência de ocorrência da mastite subclínica durante o período de lactação permaneceu situada no intervalo relatado em estudos que levam em consideração resultados isolados, independente da fase de lactação, conforme observado por Bergonier & Berthelot (2003), Coutinho et al. (2006), Domingues et al. (2006) e Almeida (2008) e superiores aos relatados por Contreras et al. (2007) e Silva et al. (2010).

Das ovelhas acompanhadas, 26 (76,47%) eram multíparas, principalmente de 2ª e 4ª parição, corroborando com achados de Albenzio et al. (2002), que relataram ele-

Quadro 2. Percentual de ocorrência de mastite subclínica nas glândulas mamárias de ovelhas da raça Santa Inês em diferentes fases da lactação

CMT	Fases da lactação			
	15 dpp n (%)	30 dpp n (%)	60 dpp n (%)	90 dpp n (%)
Reagente (1+, 2+, 3+)	24 (35,29%) n=68	23 (33,82%) n=68	24 (35,29%) n=68	16 (23,53%) n=68

vação da ocorrência da mastite subclínica com o aumento do número de lactações. Em 52,94% das ovelhas estudadas observou-se a parição de apenas uma cria; resultado semelhante foi observado por Almeida (2008). Segundo Menzies & Ramanoon (2001) a predisposição para a ocorrência de mastite deve-se ao fato da sucção incompleta do leite da glândula pelo borrego.

Notou-se durante todas as fases da lactação diferença estatística significativa ($P < 0,05$) dos valores da CCS entre os diferentes escores do CMT (negativo, 1+, 2+ e 3+), estando estes valores sempre mais elevados quanto maior a intensidade da reação (Quadro 3). Ao longo da lactação constatou-se diferença significativa ($P < 0,05$) apenas na CCS do grupo não reagente ao CMT, sem entretanto, notar elevação nas diferentes fases. As amostras de leite com reação 1+, 2+ e 3+, apresentaram durante a lactação, valores médios de 2.133.914,19 células/mL, 5.255.667,72 células/mL e 6.730.514,50 células/mL, respectivamente (Quadro 3). Estes resultados divergem dos relatados por Fthenakis (1996), Anderson et al. (2005) e Paape et al. (2007), que indicam valores superiores de CCS na fase final da lactação, atribuindo este achado à concentração de células no período de secagem. As glândulas negativas ao CMT (glândulas sadias) apresentaram o valor médio da CCS nos momentos da lactação acima do relatado por Almeida (2008), de 157.622,54, em ovelhas da raça Santa Inês; porém, situado entre 171.750 e 630.000 células/mL, conforme preconizado por diversos autores para leite de ovelhas (Fthenakis 1994, McDougall et al. 2001, Brito et al. 2006).

Quadro 3. Valores médios e desvios padrão ($x \pm s$) da contagem de células somáticas (CCS) de acordo com as respectivas reações no CMT no leite de ovelhas da raça Santa Inês em diferentes fases da lactação

Reação ao CMT	Fases da lactação				Média da CCS
	15 dpp	30 dpp	60 dpp	90 dpp	
Não Reagente	620.611,11 ± 557.704,60 aC*	387.896,08 ± 409.709,05 bC	594.052,39 ± 908.019,56 abC	389.970,39 ± 429.700,12 bC	498.132,49
1+	2.673.397,38 ± 506.947,98 aB	2.459.213,02 ± 1.904.199,21 aB	1.643.660,62 ± 1.024.197,70 aB	1.759.385,75 ± 570.550,15 aB	2.133.914,19
2+	5.652.199,98 ± 2.938.870,47 aAB	5.711.609,10 ± 2.735.780,20 aA	3.561.173,36 ± 2.788.922,09 aB	6.097.688,43 ± 1.936.630,38 aA	5.255.667,72
3+	6.423.864,93 ± 1.109.517,49aA	7.000.000,00 ± 0,0aA**	7.000.000,00 ± 0,0aA**	6.498.193,00 ± 1.229.170,89aA	6.730.514,50

Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos.

Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os momentos de observação.

Antimicrobianos *S. aureus* (n=4) SCN (n=56) *Streptococcus* spp. (n=11)

*Valores médios com estatística expressa pela transformação em Log10; **CCS > 7,0x10⁶.

Durante a lactação, dependendo da intensidade da reação verificada no CMT, os valores da CCS foram semelhantes aos citados por Fthenakis (1995), que obteve resultados de $1,57 \times 10^6$ e $5,48 \times 10^6$ células/mL, exceto na reação 3+ que ultrapassou esta margem. No entanto, McDougall et al. (2001) relataram valores médios para esta mesma reação de $8,8 \times 10^6$ células/mL, considerando que a diferença entre estudos possivelmente se deve a diferentes interpretações dos resultados obtidos no CMT. Ao considerar o limite mínimo de $1,0 \times 10^6$ células/mL como indicativo de infecção, proposto por Fthenakis (1996), Paape et al. (2007) e Almeida (2008), os resultados obtidos neste estudo foram superiores, com valores médios de 2.133.914,19 células/mL em amostras de leite com reação CMT 1+. Este resultado pode ser atribuído à patogenicidade dos agentes etiológicos envolvidos na infecção, acarretando resposta celular mais intensa (McDougall et al. 2001). Diante da diferença estatística ($P < 0,05$) observada na CCS para os diferentes escores do CMT pode-se afirmar que o aumento na contagem, paralelamente à intensidade da reação é desencadeada pela resposta celular oriunda da ação do microrganismo envolvido, ratificando os relatos de Paape et al. (2007), mostrando que os resultados obtidos no CMT podem ser confiáveis, além de práticos, em animais de aptidão para carne (Almeida 2008). Das 250 amostras de leite submetidas ao CMT durante a lactação, verificou-se crescimento bacteriano em 58 (23,2%). Naquelas amostras reagentes ao CMT (1+, 2+, 3+) ($n=87$), observou-se crescimento em 44 (50,58%), enquanto nas não reagentes ($n=163$) verificou-se 14 (8,59%) amostras bacteriológica-mente positivas. À medida que se intensifica a reação ao CMT, aumenta a frequência de isolamento (Quadro 4). A inexistência de anormalidades na inspeção e palpação da glândula mamária de ovelhas dificulta o diagnóstico da forma subclínica da mastite, particularmente em rebanhos de corte, onde não se tem o hábito de observação da mama, mesmo na fase de lactação (McFarland et al. 2000), salientando a importância da adoção de métodos indiretos de diagnóstico, como o CMT, tendo em vista a alta prevalência da mastite subclínica nos rebanhos (Menzies & Ramanoon 2001, Nunes et al. 2008).

Do total de amostras submetidas ao exame bacteriológico ($n= 323$), observou-se crescimento bacteriano em 80 delas (antes do parto e durante a lactação), constatando que a grande maioria dos isolados foram resgatados na fase que precedeu ao parto (21,25%), e na fase inicial da lactação, 15dpp e 30dpp, ambos com percentuais de 22,5% (Figura 1). Os agentes isolados, em sua totalidade

Quadro 4. Frequência de isolamento bacteriano (%) nas amostras de leite de ovelhas Santa Inês de acordo com a reação ao CMT

Reação ao CMT	Fases da lactação			
	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Não reagente	6,98%	12,82%	9,52%	5,88%
1+	50,00%	45,45%	0%	28,57%
2+	42,86%	50,00%	40,00%	66,67%
3+	69,23%	62,50%	100,00%	83,33%



Fig.1. Percentual de isolamento bacteriano das amostras de leite ($n=80$) de ovelhas da raça Santa Inês antes do parto e durante a fase da lactação.

em cultura pura, foram provenientes de 17 amostras de leite colhidas no momento que precedeu ao parto (fase de formação do colostro), 44 de amostras reagentes no CMT, 14 de amostras não reagentes no CMT e cinco de casos clínicos de mastite.

Chama-se atenção o percentual de isolamento bacteriano de 21,25% ($n=17$) na fase de formação do colostro, no qual se esperava percentuais bem menores, isolando-se neste momento de observação, em maior percentual, os SCN ($n=15$). Das 17 glândulas em que se obteve crescimento bacteriano do leite antes do parto, verificou-se o re-isolamento dos mesmos microrganismos logo no momento seguinte (15dpp) em 10 delas. Estes achados corroboram os estudos realizados em vacas por Dingwell et al. (2002) em que 49% das novas infecções diagnosticadas no período seco tiveram como agente etiológico *Staphylococcus coagulase-negativo*, e por Sandholm & Pyörälä (1995b) que relataram que as infecções por *S. aureus* e SCN durante o primeiro mês da lactação geralmente derivam da lactação anterior ou do período seco. Na fase final da lactação (90 dpp.), foi possível verificar que das 12 amostras com crescimento bacteriano, sete foram provenientes de quartos mamários com isolamento em pelo menos outros três momentos anteriores, e destas sete, quatro foram de mamas com isolamento também na fase que precedeu ao parto. A infecção intramamária observada antes do parto, pode predispor a glândula a infecções futuras, desde que ocorra queda na imunidade da ovelha, principalmente logo após o parto (Menzies & Ramanoon 2001), bem como na fase final da lactação (Fthenakis 1994).

A forma clínica da mastite foi diagnosticada em cinco metades mamárias com crescimento bacteriano em todas as amostras. Das cinco mamas, três eram de uma mesma ovelha, em que a mastite foi diagnosticada e tratada no 15º dpp, no momento seguinte (30º dpp) não apresentou alteração na glândula/leite e nos dois momentos restantes (60º e 90º dpp) ocorreu a recidiva da infecção. O agente etiológico mais frequente foi *Staphylococcus aureus* (40%), seguido dos SCN (20%), *Streptococcus* spp. (20%) e *Escherichia coli* (20%). Estes resultados ratificam as citações de Lafi et al. (1998), Bergonier & Berthelot (2003) e Olivei-

ra et al. (2007), que observaram *S. aureus* como a bactéria mais frequentemente isolada na mastite clínica em ovelhas. O isolamento de *Staphylococcus* coagulase-negativo também foi relatado por Oliveira et al. (2007), que chama a atenção para este agente, considerado de baixa virulência, como causador de mastite clínica em ovelhas da raça Santa Inês. A frequência de isolamento de *Streptococcus* spp. corrobora o intervalo citado por Bergonier & Berthelot (2003), cujos valores variam entre 3-26% dos isolados. O isolamento de *E. coli* foi também descrito por Lafi et al. (1998) e Bergonier & Berthelot (2003) em casos clínicos de mastite.

As glândulas diagnosticadas com mastite clínica apresentaram atrofia e fibrose de parênquima mamário acompanhado ou não de aumento de volume e temperatura, corroborando as alterações relatadas por Oliveira et al. (2007), sendo estes achados desencadeados pela reação inflamatória no tecido glandular devido aos subprodutos do crescimento e metabolismo bacteriano (Schalm 1977). Além dos achados clínicos, notou-se que o comprometimento mamário destas glândulas foi em sua totalidade unilateral e em 80% ocorreram na metade direita. Segundo Lafi et al. (1998), o maior comprometimento da glândula direita estaria relacionado ao comportamento do animal (ruminar e descansar) que favorece a ocorrência de lesões e contaminação.

Nas amostras de leite reagentes ao CMT (n=87), verificou-se isolamento bacteriano em 50,58% das amostras. A ausência de crescimento pode ser justificada pela eliminação intermitente dos agentes bacterianos (Burriel 1997, Albenzio et al. 2002), pela participação de algumas enzimas ou proteínas do leite (lisozina e lactoferrina), que poderiam inibir a detecção dos patógenos (Albenzio et al. 2002) e pela administração prévia de antimicrobianos (Contreras et al. 2007). O microrganismo isolado em maior percentual dos casos subclínicos foi *Staphylococcus* coagulase-negativo (65,9%), seguido de *Streptococcus* spp. (15,9%), bactérias Gram-negativas (13,65%) e *S. aureus* (4,55%). O percentual de isolamento de SCN de casos subclínicos foi semelhante aos descritos por González-Rodríguez et al. (1995) e Almeida (2008), de 62,5% e 65,09%, respectivamente. Vale salientar o efeito negativo deste microrganismo no tecido glandular da ovelha, podendo comprometer a composição do leite (Burriel 1997, Almeida 2008, Guaraná 2011).

O percentual de isolamento de *Streptococcus* spp. foi similar aos descritos por González-Rodríguez et al. (1995) e Coutinho et al. (2006), com valores entre 12% e 16,2%, respectivamente. As bactérias Gram-negativas fermentadoras e não fermentadoras foram isoladas em 13,65% das amostras subclínicas, sendo a *E. coli* o agente mais frequente destes grupos de bactérias. A presença de enterobactérias no leite de ovelhas com mastite subclínica chama a atenção para a possibilidade de desencadarem um quadro clínico, tendo em vista os fatores de virulência inerentes a este grupo de bactérias, aliado à condição de estresse do animal (Sandholm & Pyörälä 1995a), o que torna o isolamento de membros da família Enterobacteriaceae, em glândula com ausência de sinais clínicos, um achado incomum (Drescher et al. 2010).

Das 163 amostras de leite não reagentes ao CMT durante a lactação, constatou-se crescimento bacteriano em 14 (8,59%), cujo isolamento provavelmente esteja relacionado à presença destas bactérias na cisterna do teto de glândulas sadias, podendo considerar como possíveis sítios de origem (Fthenakis 1988), atuando estes animais como portadores assintomáticos (Burriel 1997). Outra possibilidade foi descrita por Albenzio et al. (2002), ao relatarem que o isolamento pode não ser acompanhado por um aumento na celularidade, pois em muitos casos o processo infeccioso progride lentamente sem expressar um estágio agudo ou tem uma fase aguda de curta duração. O agente isolado em maior percentual foi SCN (78,57%), seguido de *Streptococcus* spp (14,29%) e *Acinetobacter lwoffii* (7,14%). Várias espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativo são comumente encontradas nos canais do teto e na pele do teto de ruminantes domésticos e podem ser introduzidas na glândula mamária no ato de sucção do cordeiro, sem contudo existir infecção do parênquima mamário (Fthenakis 1988, Batavani et al. 2003).

Os resultados obtidos no teste de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativo revelaram de maneira geral que os isolados apresentaram percentual de sensibilidade elevado frente aos medicamentos empregados (Quadro 5), variando de 64,3% (penicilina G) a 98,2% (cefotaxima). O perfil de sensibilidade antimicrobiana revelou que as cepas de *Staphylococcus aureus* (Quadro 5) apresentaram sensibilidade de 75% diante de oito das 12 drogas testadas e com 100% dos isolados sensíveis à cefotaxima. Das estirpes de *Streptococcus* spp. isolados das amostras de leite de ovelhas da raça Santa Inês 72,7% foram sensíveis à ampicilina, cefalotina e cefotaxima, e 63,6% sensíveis à eritromicina. As demais drogas demonstraram percentuais variados de resistência (Quadro 5). Resultados semelhantes foram também descritos por Fernández Riera et al. (2000) e Lollai et al. (2008), que observaram um alto percentual de sensibilidade antimicrobiana das cepas de *S. aureus* isoladas de mastite clínica e subclínica ovina.

O perfil de sensibilidade dos isolados de SCN frente à gentamicina foram semelhantes aos descritos por Coutinho et al. (2006) e Domingues et al. (2006), que consideraram a gentamicina uma das drogas de melhor eficácia. A alta sensibilidade das cepas de *Staphylococcus* spp. frente a maioria das drogas antimicrobianas, também foi relatada por Almeida (2008). Este achado pode ser justificado pela pouca utilização destas drogas no momento de secagem da ovelha, sendo mais amplamente utilizado no tratamento das mastites clínicas. A maior resistência à estreptomomicina, kanamicina e tetraciclina, também foi relatada por Almeida (2008) avaliando as amostras de *Streptococcus* spp., no entanto observando percentuais menores. Diferentemente dos resultados obtidos neste estudo, Coutinho et al. (2006) relataram a sensibilidade de 100% das cepas testadas para a tetraciclina.

As bactérias Gram negativas fermentadoras (Quadro 6) foram sensíveis apenas à cefotaxima (83,3%), ampicilina e sulfazotrim (100%). Os agentes Gram negativos foram os que apresentaram o maior percentual de amostras resistentes com valores entre 50% (neomicina) a 100% (es-

Quadro 5. Sensibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase-negativo* e *Streptococcus* spp. isolados do leite de ovelhas da raça Santa Inês

Antimicrobianos	<i>S. aureus</i> (n=4)			SCN (n=56)			<i>Streptococcus</i> spp. (n=11)		
	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)
AMP (10 µg)	75,0	0	25,0	76,8	0	23,2	72,7	0	27,3
CEP (30 µg)	75,0	0	25,0	96,4	0	3,6	72,7	9,1	18,2
FOX (30 µg)	100,0	0	0	98,2	1,8	0	72,7	18,2	9,1
ERY (15 µg)	0	75,0	25,0	14,3	76,8	8,9	63,6	9,1	27,3
STR (10 µg)	0	0	100,0	42,8	26,8	30,4	0	0	100,0
GEN (10 µg)	75,0	25,0	0	94,6	1,8	3,6	9,1	18,2	72,7
KAN (30 µg)	75,0	25,0	0	85,7	8,9	5,4	0	9,1	90,9
NEO (30 µg)	50,0	50,0	0	82,1	10,7	7,1	0	9,1	90,9
OXA (1 µg)	75,0	0	25,0	87,5	0	12,5	0	0	100,0
PEN (10 UI)	75,0	0	25,0	64,3	0	35,7	36,4	36,4	27,2
SXT (25 µg)	75,0	25,0	0	80,4	8,9	10,7	36,4	0	63,6
TCY (30 µg)	75,0	0	25,0	82,1	1,8	16,1	0	9,1	90,9

Quadro 6. Sensibilidade antimicrobiana das bactérias Gram-negativas isoladas de leite de ovelhas da raça Santa Inês

Antimicrobianos	Gram negativas					
	Fermentadoras (n=6)			Não fermentadoras (n=3)		
	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)
AMP (10 µg)	100,0	0	0	66,7	0	33,3
CEP (30 µg)	16,7	0	83,3	66,7	0	33,3
FOX (30 µg)	83,3	16,7	0	100,0	0	0
ENR (5 µg)	16,7	50,0	33,3	66,7	33,3	0
STR (10 µg)	0	0	100,0	33,3	0	66,7
GEN (10 µg)	33,3	0	66,7	66,7	0	33,3
KAN (30 µg)	16,7	0	83,3	66,7	33,3	0
NEO (30 µg)	0	50,0	50,0	66,7	33,3	0
SXT (25 µg)	100,0	0	0	100,0	0	0
TCY (30 µg)	0	33,3	66,7	66,7	0	33,3

treptomicina). A alta resistência apresentada por bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae, particularmente *E. coli*, vem sendo relatadas por alguns autores após isolar cepas do leite de vacas resistentes a quatro ou mais drogas. (Ribeiro et al. 1999, Ribeiro et al. 2006). As bactérias Gram negativas não fermentadoras apresentaram sensibilidade frente a nove drogas testadas, com valores de 66,7% a 100% (cefexotina e sulfazotrim). O perfil de sensibilidade apresentado pelas bactérias Gram negativas não fermentadoras foi similar ao descrito por Almeida (2008), porém com valores percentuais menores.

O acompanhamento das ovelhas antes e durante a lactação, permitiu concluir que a mastite subclínica representa um problema sanitário na criação de ovelhas da raça Santa Inês, sendo particularmente a fase que precede o parto merecedora de atenção, assim como os 30 primeiros dias de lactação tendo em vista o alto percentual de isolamento bacteriano de glândulas aparentemente sadias, sendo SCN isolado em maior percentual. A contagem celular foi caracterizada pelo seu aumento nas amostras reagentes ao CMT sem, entretanto, ser influenciada pelas diferentes fases da lactação. Constatou-se alta sensibilidade das bactérias

Gram positivas frente à ampicilina, cefalotina e cefoxitina e, para as bactérias Gram negativas uma boa sensibilidade frente à ampicilina, cefoxitina e sulfazotrim.

Agradecimentos.- Ao Prof. Dr. Pierre Castro Soares do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE pela colaboração na análise estatística; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (MCT/CNPq Edital Universal-15/2007) pelo apoio financeiro e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da Bolsa de Mestrado (Edital PBPG-13/2008).

REFERÊNCIAS

- Albenzio M., Taibi L., Muscio A. & Sevi A. 2002. Prevalence and etiology of subclinical mastitis in intensively managed flock and related changes in the yield and quality of ewe milk. *Small Rumin. Res.* 43(3):219-226.
- Alencar L. & Rosa F.R.T. 2006. Ovinos: panorama e mercado. Disponível em <http://www.zebus.com.br/berro/noticias_ver.php?CdNotici=9> Acesso em 25 out. 2010.
- Almeida M.Z.P.R.B. 2008. Estudo da Mastite subclínica em ovelhas da raça Santa Inês e sua influência sobre as características físico-químicas do leite. Tese de Doutorado em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 104p.
- Anderson D.E., Hull B.L. & Pugh D.G. 2005. Enfermidades da glândula mamária, p.379-399. In: Pugh D.G. (Ed.), *Clínica de Ovinos e Caprinos*. Roca, São Paulo.
- Batavani R.A., Mortaz E., Falahian K. & Dawoodi M.A. 2003. Study on frequency, etiology and some enzymatic actives of subclinical ovine mastitis in Urmia, Iran. *Small Rumin. Res.* 50(1/2):45-50.
- Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C. & Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standartized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45(4):493-496.
- Bergonier D. & Berthelot X. 2003. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livestock Production Science* 79(1):1-16.
- Bergonier D., Crémoux R., Rupp R., Lagriffoul G., Berthelot X. 2003. Mastitis of dairy small ruminants. *Veterinary Research* 34(5):689-716.
- Bolsanello R.X., Hartman M., Domingues P.F., Mello Júnior A.S. & Langoni L. 2009. Etiologia da mastite em ovelhas Bergamáceas submetidas à ordenha mecânica, criadas em propriedades de Botucatu, SP. *Veterinária e Zootecnia, Botucatu*, 16(1):221-227.
- Brito M.A., González F.D., Ribeiro L.A., Campos R., Lacerda L., Barbosa P.R. & Bergmann G. 2006. Composição do sangue e do leite em ovinos leiteiros do sul do Brasil: variações na gestação e na lactação. *Ciência Rural* 36(3):942-948.

- Burriel A.L. 1997. Dynamics of intramammary infection in the sheep caused by coagulase-negative Staphylococci and its influence on udder tissue and milk composition. *Vet. Rec.* 140(16):419-423.
- Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI/NCCLS 2005. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 26. M 100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- Contreras A., Sierra D., Sánchez A., Corrales J., Marco J., Paape M. & Gonzalo C. 2007. Mastitis in small ruminants. *Small Rumin. Res.* 68(1/2):145-153.
- Coutinho D.A., Costa J.N., Ribeiro M.G. & Torres J.A. 2006. Etiologia e sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de bactérias isoladas de ovelhas da raça Santa Inês com mastite subclínica. *Revta Bras. Saúde Prod. Anim.* 7(2):139-151.
- Curi P.R. 1997. Metodologia e Análise da Pesquisa em Ciências Biológicas. Tipomic, Botucatu. 263p.
- Diffay B.C., McKenzie D., Wolf C. & Pugh D.G. 2004. Abordagem e exame de ovinos e caprinos, p.1-19. In: Pugh D.G. (Ed.), *Clínica de Ovinos e Caprinos*. Roca, São Paulo.
- Dingwell R.T., Duffield T.F., Leslie K.E., Keefe G.P., DesCoteaux L., Kelton D.F., Lissemore K.D., Schukken Y.H., Dick P. & Bagg R. 2002. The efficacy of intramammary tilmicosin at drying-off, and other risk factors to the prevention of new intramammary infections during the dry period. *J. Dairy Sci.* 85(12):3250-3259.
- Domingues P.F., Lucheis S.B., Serrão L.S., Fernandes S., Contente A.P.A., Martins E.C.V. & Langoni H. 2006. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite subclínica em ovelhas da raça Santa Inês. *Ars Vet.* 22(2):146-152.
- Drescher G., Mattiello S.P., Peixoto R.M., Vargas A.C., Maciel M.N. & Costa M.M. 2010. Caracterização bioquímica e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de agentes bacterianos isolados de mastite subclínica ovina na região oeste de Santa Catarina. *Ciênc. Anim. Bras.* 11(1):188-193.
- Fernández Riera E., Las Herasdel Río A., López Paredes I., Porrero Calonge M. C., Domínguez Rodríguez L., Fernández-Garayzábal Fernández J.F.Y. & Moreno Romo M.A. 2000. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis ovinas. *Patología Animal* 11:381-384.
- Fthenakis G.C. 1988. Ovine mastitis with special reference to subclinical mastitis associated with coagulase-negative Staphylococci. PhD Thesis, Royal Veterinary College, University of London. 390p.
- Fthenakis G.C. 1994. Prevalence and aetiology of subclinical mastitis in ewes of Southern Greece. *Small Ruminant Research* 13(3):293-300.
- Fthenakis G.C. 1995. California Mastitis Test and Whiteside Test in diagnosis of subclinical mastitis of dairy ewes. *Small Rumin. Res.* 16(3):271-276.
- Fthenakis G.C. 1996. Somatic cell counts in Milk of Welsh-Mountain, Dorset-Horn and Chios ewes throughout lactation. *Small Rumin. Res.* 20(2):155-162.
- González-Rodríguez M.C., Gonzalo C., San Primitivo F. & Carmenes P. 1995. Relationship between somatic cell count and intramammary infection of the half udder in dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 78(12):2753-2759.
- Guaraná E.L.S. 2011. Dinâmica da infecção intramamária em ovelhas da raça Santa Inês acompanhadas durante a lactação e seu impacto sobre a composição físico-química do leite. Dissertação de Mestrado em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE. 76p.
- Lafi S.Q., Al-Majali A.M., Roman M.D. & Alawneh J.M. 1998. Epidemiological studies of clinical and subclinical ovine mastitis in Awassi sheep in northern Jordan. *Prev. Vet. Med.* 33:171-181.
- Lollai S.A., Ziccheddu M., Di Mauro C., Manunta D., Nudda A. & Leori G. 2008. Profile and evolution of antimicrobial resistance of ovine mastitis pathogens (1995-2004). *Small Rumin. Res.* 74:249-254.
- McDougall S., Murdough P., Pankey W., Denaney C., Barlow J. & Scruton D. 2001. Relationship among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Rumin. Res.* 40(3):245-254.
- McFarland M., Holcombe D., King D., Allen J. & Redelman D. 2000. Quantification of subclinical mastitis in sheep. Disponível em < http://www.cabnr.unr.edu/AB/Resources/Nevada_Cattlemen/2001/16.htm > Acesso em 24 dez. 2010.
- Menzies P.I. & Ramanoon S.Z. 2001. Mastitis of sheep and goats. *Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract.* 17(2):333-358.
- National Mastitis Council 1990. Microbiological Procedures for The Diagnosis of Bovine Udder Infection. 3rd ed. NMC. Arlington. 34p.
- 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. 2008. Avaliação de indicadores inflamatórios no diagnóstico da mamite ovina. *Arqs Inst. Biológico, São Paulo*, 75(3):271-278.
- Oliveira V.L.M. 2006. Aspectos do leite e mastite em ovinos da raça Santa Inês em Sergipe. Dissertação de Mestrado em Agroecossistemas, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE. 70p.
- Oliveira L.G.L., Almeida M.Z.P.R.B., Afonso J.A.B., Lázaro N.S. & Mendonça C.L. 2007. Aspectos clínico-epidemiológicos e etiológico da mastite clínica em ovelhas da raça Santa Inês no agreste meridional do Estado de Pernambuco. *Arch. Vet. Sci.*12(supl):124.
- Paape M.J., Wiggans G.R., Bannerman D.D., Thomas D.L., Sanders A.H., Contreras A., Moroni P. & Miller R.H. 2007. Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. *Small Rumin. Res.* 68(1/2):114-125.
- Quinn P.J., Carter M.E., Markey B. & Carter G.R. 1994. *Clinical Veterinary Microbiology*. Mosby, Philadelphia. 648p.
- Ribeiro M.G., Costa E.O., Langoni H., Ribeiro A.R. & Assis M.Z. 1999. Susceptibilidade e resistência múltipla a antimicrobianos em amostras de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. *Anais 3º Encontro de Pesquisadores em Mastites, Botucatu, SP*, p.170. (Resumo)
- Ribeiro M.G., Costa E.O., Leite D.S., Langoni H., Garino Júnior F., Victória C. & Listoni F.J.P. 2006. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58(5):724-731.
- Sandholm M. & Pyörälä S. 1995a. Coliform mastitis, p.149-160. In: Sandholm M., Monhaken-Buzalski T., Kaartinen L. & Pyörälä S. (Eds), *The Bovine Udder and Mastitis*. University of Helsinki, Helsinki.
- Sandholm M. & Pyörälä S. 1995b. Dry cow therapy, p.209-214. In: Sandholm M., Monhaken-Buzalski T., Kaartinen L. & Pyörälä S. (Eds), *The Bovine Udder and Mastitis*. University of Helsinki, Helsinki.
- Santos R.A., Mendonça C.L., Afonso J.A.B. & Simão L.C.V. 2007. Aspectos clínicos e características do leite em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. *Pesq. Vet. Bras.* 27(1):6-12.
- Schalm O.W. 1977. Pathologic changes in the milk and udder of cows with mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 170(10):1137-1140.
- Schalm O.W., Carroll E.J. & Jain N.C. 1971. *Bovine Mastitis*. Lea and Febiger, Philadelphia. 360p.
- Silva N.S., Silveira J.A.S., Pinheiro C.P., Sousa M.G.S., Oliveira C.M., Mendonça C.L., Duarte M.D. & Barbosa J.D. 2010. Etiologia e perfil de sensibilidade de bactérias isoladas de ovelhas com mastite na região nordeste do estado do Pará. *Pesq. Vet. Bras.* 30(12):1043-1048.
- Subcommittee on Screening Tests, National Mastitis Council 1968. Direct microscopic somatic cell count in milk. *J. Milk Food Technol.* 31:350-354.
- Tatarczuch L., Philip C. & Lee C.S. 1997. Involution of the sheep mammary gland. *J. Anatomy* 190:405-416.
- Watkins G.H., Burriel A.R. & Jones J.E. 1991. A field investigation of subclinical mastitis in sheep in southern England. *Brit. Vet. J.* 147(5):413-420.