

Influência dos estádios de lactação sobre a contagem de células somáticas do leite de vacas da raça holandesa e identificação de patógenos causadores de mastite no rebanho

Tadeu Vinhas Voltolini¹, Geraldo Tadeu dos Santos^{1*}, Maximiliane Alavarse Zambom¹, Newton Pöhl Ribas², Ernst Eckehardt Müller³, Júlio Cesar Damasceno¹, Luis Carlos Vinhas Ítavo⁴ e Darcy Rodrigues da Veiga⁵

¹Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, Campus Universitário, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. ²Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

³Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

⁴Departamento de Zootecnia, Universidade Católica do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁵Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH), Curitiba, Paraná, Brasil *Author for correspondence. e-mail: gtsantos@uem.br

RESUMO. O presente trabalho foi conduzido na Fazenda Experimental da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Estado do Paraná, com os objetivos de determinar a influência dos estádios de lactação sobre a CCS e identificar os patógenos causadores de mastite no rebanho. Foram utilizadas 47 vacas da raça Holandesa malhada de preto nas quais, quinzenalmente, foram efetuados o Califórnia Mastite Teste (CMT) e a Contagem de Células Somáticas (CCS). A CCS foi feita na Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) em Curitiba, por meio de um contador eletrônico de células somáticas, enquanto que o CMT foi realizado na Fazenda Experimental. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa ($P>0,05$), nos valores de CCS para os estádios de lactação. Os patógenos isolados com maior frequência foram *Staphylococcus* coagulase positivo (49%) e *Staphylococcus* coagulase negativo (19%).

Palavras-chave: CMT, CCS, mastite, qualidade do leite.

ABSTRACT. Influence of lactation stages on the counting of somatic cells of Holstein milk cows and identification of sources of mastitis pathogens in cattle.

Assay was carried out on the Experimental Farm of the Universidade Estadual de Maringá, Maringá PR Brazil. Influence of lactation stages and identification of causes of mastitis pathogens in cattle was evaluated. Forty-seven Black and White Holsteins cows were submitted to biweekly SCC and CMT analyses. SCC analyze was done in the Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) by an electronic somatic cell counter, whereas CMT was performed on the Experimental Farm. Results showed that no significant differences ($p>0.05$) were found in SCC values for the lactation stages. *Staphylococcus* positive coagulase (49%) and *Staphylococcus* negative coagulase (19%) were the pathogens isolated with higher frequency.

Key words: CMT, SCC, mastitis etiology, milk quality.

A mastite é considerada a doença que mais onera a produção de leite, acarretando graves prejuízos econômicos aos produtores e à indústria leiteira (Monardes, 1994). Entretanto, muitos produtores ainda não se preocupam com este problema, talvez por não saberem das perdas decorrentes desta enfermidade (Silva, 1996; Costa *et al.*, 2000).

Os prejuízos são caracterizados por: redução na produção de leite de até 50%, descarte de leite de vacas tratadas, depreciação da qualidade nutritiva, custos com medicamentos, gastos com assistência

técnica e reposição de vacas e tempo extra, perdido no manejo e aplicação de medicamentos (Keown, 2000).

Vários métodos laboratoriais têm sido recomendados, no sentido de diagnosticar a incidência de mastite, principalmente subclínica, nos rebanhos leiteiros. Dentre elas, pode-se citar a coadura do leite (caneca telada ou de fundo preto), Califórnia Mastite Teste (CMT), Wisconsin Mastitis Teste (WMT) e a Contagem de Células Somáticas (CCS) (Torres, 1985; Cardozo *et al.*, 1996).

As células somáticas no leite são constituídas por células de defesa ou epiteliais. As células de defesa são os leucócitos (células que migram para o úbere quando este sofre alguma agressão, defesa natural), como, por exemplo, nos casos de infecções. Os leucócitos fagocitam e digerem os microrganismos invasores. Do total de células somáticas, 75 a 98% correspondem a células de defesa e 2 a 25%, de células epiteliais, provenientes da descamação natural que ocorre no tecido de revestimento e secretor interno da glândula mamária (Ribas, 1994).

A International Dairy Federation (1981) estabeleceu 500.000 células (cél)/mL de leite como limite máximo para leite normal de um teto. Entretanto, altas CCS nem sempre estão associadas com infecções, uma vez que vários fatores podem influenciar no seu valor. Desta forma, decisões de manejo devem ser tomadas após observações de amostras consecutivas, a partir do controle da CCS e do histórico do animal (Ribas, 1999).

Dentre os fatores que influenciam a CCS, pode-se citar a idade da vaca, estações do ano, estresse, estádios de lactação, entre outros. Os estádios de lactação estão associados a variações na CCS em vacas livres de infecção na glândula mamária (Schutz et al., 1990; Laevens et al., 1997), e esta influência pode ocorrer tanto no início quanto no final da lactação. No início da lactação, observa-se um acréscimo no valor da CCS devido à presença de imunoglobulinas e conseqüentemente de células de defesa. No final da lactação, também se verifica um acréscimo na CCS, devido a uma maior descamação natural do epitélio da glândula mamária (Harmon e Reneau, 1993; Monardes, 1994). O conhecimento dos fatores que influenciam nas infecções da glândula mamária é importante para o correto diagnóstico da mastite (Ribas, 1999).

O Paraná, através da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa, foi o primeiro Estado a implantar a CCS no Brasil. Neste sentido, os produtores de leite passaram a dispor desta importante ferramenta para o diagnóstico e controle da mastite em seus rebanhos (Daniel, 1998).

Indiretamente, o número de leucócitos pode ser determinado pelo CMT, que se baseia na reação de um detergente aniônico adicionado de púrpura de bromocresol que, misturado ao leite, desenvolve geleificação e modificação da cor do indicador nos casos de mastite subclínica. A reação do CMT é proveniente da ação do reagente sobre as células somáticas presentes no leite, que se torna gelatinoso devido à liberação do ácido desoxiribonucleico (DNA), presente no núcleo dessas células. Desta

maneira, quanto maior a quantidade de células, mais forte é a reação (Embrapa, 1984). O CMT é um bom teste para avaliar a sanidade da glândula mamária (Thiers et al., 1999).

Os agentes etiológicos da mastite podem ser classificados em dois grupos: contagiosos e ambientais, de acordo com a fonte de infecção. Na mastite contagiosa, o agente é encontrado no úbere e é transmitido durante a ordenha e na mastite ambiental, a vaca se infecta por microrganismos encontrados no meio ambiente (Costa, 1998; Costa et al., 2000).

Entre os agentes etiológicos, isolados com maior frequência nos casos de mastite, destacam-se os estreptococos e os estafilococos, principalmente o *Staphylococcus aureus* (Faria et al., 1996; Nicolau et al., 1996).

O *Staphylococcus aureus* é o principal responsável pelas mastites contagiosas dos rebanhos leiteiros. A mastite contagiosa caracteriza-se por grande número de infecções subclínicas, com episódios esporádicos de mastite clínica (Eberhart et al., 1987).

Os patógenos ambientais são coliformes (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp* e *Enterobacter aerogenes*), Streptococcus (*Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus bovis*) e enterococos (*Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*) (Hogan e Smith, 1987). Vários autores têm se dedicados em estudar a etiologia da mastite bovina, dentre eles destacam-se os trabalhos de Muller et al. (1978); Fernandes (1992); Pardo (1997) e Costa et al. (2000).

O trabalho teve por objetivos determinar a influência dos estádios de lactação sobre a CCS e identificar os principais patógenos causadores de mastite no rebanho.

Material e métodos

O trabalho foi conduzido na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Estado do Paraná, no período de março de 1998 a março de 1999. Foram utilizadas 47 vacas da raça Holandesa malhadas de preto. Quinzenalmente, foram efetuados o Califórnia Mastite Teste (CMT) e a Contagem de Células Somáticas (CCS). As amostras de leite positivas ao CMT foram enviadas para ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina, em Londrina, Estado do Paraná, para o diagnóstico microbiológico.

As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia, sendo a primeira ordenha realizada às 6:00 h e a segunda às 15:30 h. Antes e após cada ordenha, realizava-se o pré e o pós-dipping com soluções de

hipoclorito de sódio e iodo glicerinado, respectivamente.

Após cada ordenha, lavava-se toda a instalação. Já a limpeza das ordenhadeiras foi dividida em 3 etapas: pré-lavagem, lavagem principal e enxágüe final.

O CMT foi realizado antes da ordenha em uma bandeja provida de quatro pequenos compartimentos, onde foram colhidas amostras de leite diretamente dos tetos, desprezando os três primeiros jatos, totalizando 2 mL de leite em cada copo da bandeja, com o cuidado de não formar espuma; em seguida adicionava-se idêntica quantidade do reagente. Após homogeneização, inclinava-se a bandeja em um ângulo de 45° para entornar o excesso. A composição do reagente foi 300 mL de detergente aniônico com 600 mL de água destilada. Ajustou-se o pH para 8, acrescentando-se 15 mL de púrpura de bromo cresol e 5 mL de verde de bromo cresol (ambas soluções a 0,5%). O pH final foi de 7,5.

A leitura e interpretação dos resultados foram realizadas após 20 segundos, através de movimentos giratórios lentos, baseadas na tabela de graduação abaixo. (Tabela 1)

Tabela 1. Interpretação dos resultados obtidos pelo teste CMT

Resultados	Leitura
Negativo	A mistura permanece fluída, sem precipitação
Fracamente positivo (+)	Apresenta distinta precipitação, sem formação de gel
Distintamente positivo (++)	Apresenta formação gelatinosa
Fortemente positivo (+++)	Apresenta formação gelatinosa e umbelização central

Fonte: Embrapa – Gado de Leite (1984)

A coleta das amostras para a CCS foi realizada após a pesagem e homogeneização do leite.

As amostras de leite foram acondicionadas em frascos de plástico (polietilênico), com capacidade para 60 mL. Os frascos continham um conservante para leite (dicromato de potássio na concentração de 155 mg, em pastilhas).

As amostras foram encaminhadas ao Laboratório do Programa de Análise do leite da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) em Curitiba, Estado do Paraná.

A CCS foi executada por um contador eletrônico de células somáticas (Somacount 500), onde os núcleos das células são corados e expostos a um raio laser, refletindo luz vermelha (fluorescência). Os sinais são transformados em impulsos elétricos que são detectados por um fotomultiplicador e transformados em contagens, cujos resultados são visualizados no equipamento, impressos e transcritos para os relatórios.

Todos os resultados, com CCS ≥ 500.000 céls/mL de leite durante o ano, foram confrontados com os resultados do CMT para os mesmos animais. Igualmente, foi realizado um outro tipo de contraste, comparando os resultados positivos do CMT com os resultados para CCS ≥ 500.000 céls/mL de leite e com a cultura de bactérias.

As amostras de leite para exames microbiológicos foram colhidas dos tetos positivos ao CMT, sendo a assepsia destes realizada com algodão embebido em álcool 70°. As amostras foram catalogadas e armazenadas sob refrigeração a -20°C para posterior análise.

No laboratório, as amostras de leite foram semeadas em placas de ágar sangue de ovino a 5% e ágar MacConkey e incubadas a 37°C por 24 a 48 h. As placas de ágar sangue sem crescimento foram incubadas por mais 72 h. Os microrganismos isolados foram identificados por suas características morfológicas, culturais e bioquímicas segundo Pardo (1997).

Para as análises estatísticas dos dados, foi empregado o método dos quadrados mínimos. No modelo estatístico, foram considerados os efeitos de animal e mês de coleta para avaliar a CCS das vacas.

$$Y_{ij} = \mu + V_i + E_j + b(D_i - \bar{D}) + e_{ij}$$

em que:

Y_{ij} = variável observada;

μ = constante geral;

V_i = efeito da vaca i ($i = 1, 2, \dots, 47$);

E_j = efeito do mês de coleta j ($j = 1, 2, 3, \dots, 12$);

b = coeficiente de regressão linear da CCS em função do dia de lactação;

D_i = dias de lactação da vaca i ;

$\bar{D}$ = média dos dias de lactação;

e_{ij} = erros associados as observações Y_{ij} .

Resultados e discussão

Foram encontrados, durante 12 meses, 97 resultados para CCS ≥ 500.000 células/mL, sendo que 26 destes foram confirmados pelo CMT, ou seja, 27% dos casos. Por outro lado, foram encontrados 38 resultados positivos para o CMT, sendo que 30 destes foram confirmados pela CCS, ou seja, 79%, enquanto que a cultura de bactérias confirmou 16 resultados, perfazendo um percentual de 42%. De fato, existe uma alta correlação ($r = 0,9638$) entre contagem direta de células somáticas e o teste de CMT no leite de vacas (Thiers *et al.*, 1999).

O CMT é um método subjetivo, onde outras proteínas não celulares presentes no leite poderiam

influenciar sua viscosidade no momento da reação (Philpot e Nickerson, 1991). A CCS, por sua vez, também pode ser influenciada por muitos fatores (Harmon e Reneau, 1993). Neste sentido, destaca-se a importância de não se utilizar um teste para diagnóstico de mastite isoladamente devido à presença de resultados falso-positivos e falso-negativos.

A CCS no leite de vaca tem sido um importante método utilizado para se verificar a presença do processo inflamatório nas glândulas mamárias. Na Figura 1, verifica-se que a CCS em relação aos estádios de lactação apresentou um acréscimo numérico no início e no final da lactação, porém esses valores não mostraram diferenças significativas ($P>0,05$). Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Laevens *et al.* (1997), que não observaram influência dos estádios de lactação sobre a CCS para vacas livres de infecções. Por outro lado, contrariam os obtidos por Harmon e Reneau (1993) e Monardes (1994), segundo os quais todos os tetos, mesmo livres de infecções, têm elevadas CCS imediatamente após o parto; um rápido declínio, portanto, foi observado 30-35 dias após o parto.

Schutz *et al.* (1990) trabalharam com vacas da raça Holandesa, Guernsey e Jersey, e observaram o mesmo comportamento para os estádios de lactação, ou seja, maiores valores para o início e final da lactação. Entretanto, na primeira ordem de parto, o pico da CCS ocorreu no oitavo dia pós-parto, sugerindo que elevadas CCS nesta fase poderiam estar associadas com mudanças fisiológicas para a secreção do leite, como, por exemplo, o edema de úbere, enquanto que na segunda ordem de parto, o pico ocorreu na secagem, onde estaria envolvida a concentração das células somáticas em um menor volume de leite.

Os resultados encontrados para os estádios de lactação podem ser explicados pelo fato de o rebanho estudado apresentar um bom manejo higiênico sanitário e, principalmente, por apresentar uma baixa CCS durante toda a lactação, dificultando oscilações da mesma. Os estádios de lactação poderiam exercer maior influência sobre a CCS em rebanhos com altas contagens. Além disso, o início e final da lactação são as fases mais estressantes para a vaca, razão pela qual apresentará, naturalmente, uma elevada CCS.

Bodoh *et al.* (1976) encontraram um aumento na CCS no final da lactação somente quando a produção decresceu para 4 kg de leite por dia, mas o “status” da infecção nestes animais não foi determinado. Assim, supõe-se que a maior

influência dos estádios da lactação na CCS esteja relacionada ao “status” da infecção.

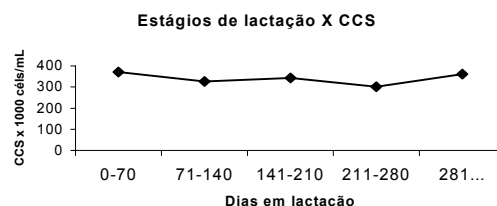


Figura 1. Contagem de Células Somáticas x 1000 céls/mL de leite nos diferentes estádios de lactação

$$Y = 10,786x^2 - 69,214x + 429,4 \quad r^2 = 0,59$$

Na Figura 2, observa-se que 58% das culturas examinadas deram negativas. Estes resultados foram mais expressivos que aqueles relatados por Costa *et al.* (2000), quando analisaram três tipos de propriedades de leite A, B e C e encontraram resultados negativos de 37,28; 24,93 e 20,97%, respectivamente.

O CMT foi confirmado pela cultura de bactérias em apenas 42% dos casos, ou seja, foram isolados patógenos em 16 amostras dentre as 38 positivas ao CMT.

Tetos positivos ao CMT e sem infecção podem ser uma consequência, em certos casos, do efeito bactericida dos leucócitos, isto é, no momento da amostragem as bactérias ou outros patógenos já haviam sido destruídos. Por outro lado, tetos com patógenos e negativos ao CMT podem ser explicados por infecções apenas nas extremidades, colonização do canal galactóforo ou infecções latentes (Daniel, 1998).

Na Figura 3, verifica-se que dentre as 16 amostras, os patógenos isolados com maior frequência foram 08 *Staphylococcus* coagulase positivo - SCP (49%), 03 *Staphylococcus* coagulase negativo - SCN (19%), 02 leveduras e *Streptococcus spp.* (13%) e 01 *Corynebacterium bovis* (6%). Estes resultados são concordantes com aqueles obtidos por Faria *et al.* (1996) e Nicolau *et al.* (1996). Estes últimos autores trabalharam com 5 rebanhos e 700 vacas lactantes no Estado de São Paulo. Selecionaram 63 vacas com resultados positivos ao CMT e infectadas por cepas de *Staphylococcus*. Das 63 amostras, em 41 foram isolados SCP e em 22, SCN. Além disso, a contagem de leucócitos polimorfonucleares foi maior para as cepas de SCP, destacando as distintas características patogênicas dos *Staphylococcus*. Estes achados também são concordantes com os estudos levados a efeito por Costa *et al.* (2000) nas sete principais bacias leiteiras do Estado de São Paulo.

Dos 5.216 microrganismos encontrados nas amostras de leite de glândulas mamárias de bovinos, 65,5% foram de SCP e 34,5% de SCN.

Todavia, Pardo (1997), em pesquisa com novilhas de alta produtividade, no 1º ao 7º dia pós-parto, na região Norte do Estado do Paraná, constatou maior presença para os SCN (64,20%), seguidos de SCP (8,52%); *Streptococcus* (7,96%) e outros (19,32%). Timmis e Schultz (1987) demonstraram que, em casos de infecção de SCN, ocorre uma elevada CCS e diminuição na produção de leite.

Faria *et al.* (1996) estudaram a dinâmica das infecções por *Staphylococcus aureus* em 31 vacas e 124 tetos e verificaram maior número de quartos infectados na semana do parto, comparativamente a um mês pós-parto e ao período seco, sugerindo que o longo período seco (160 dias em média) poderia ter contribuído para o aumento das infecções, uma vez que aumentou o tempo de exposição dos tetos frente aos patógenos.

Salvador *et al.* (2000) trabalharam com novilhas no pós-parto nas regiões Norte do Estado do Paraná e Sudoeste de Estado de São Paulo e verificaram que, das 1985 amostras de leite analisadas, 311 (16,5%) apresentaram SCN, enquanto que Dias *et al.* (2000) trabalharam com o mesmo número de amostras e isolaram *Corynebacterium bovis* em 56 (2,9%).

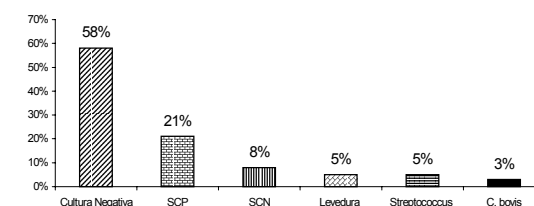
Deste modo, pode-se destacar que o aumento da mastite foi de natureza infecciosa, pois, SCP, SCN e *Corynebacterium bovis* são agentes contagiosos, os quais corresponderam a 74% das amostras isoladas, enquanto que os patógenos ambientais (Levedura e *Streptococcus sp.*) corresponderam a 26%.

Os patógenos contagiosos são os mais freqüentemente isolados na glândula mamária em casos de mastite, sendo facilmente transmitidos por qualquer forma de contato, incluindo o ordenhador e equipamentos de ordenha. Esses patógenos são os mais adaptados para sobreviver e multiplicar na glândula mamária. No rebanho, a principal fonte desses patógenos é a glândula mamária infectada (Embrapa, 1984).

A terapia antibiótica é menos eficaz para eles, pois os mesmos podem sobreviver dentro dos neutrófilos fagocíticos que permanecem no úbere e liberam bactérias viáveis após a morte das células de defesa (Hillerton, 1996).

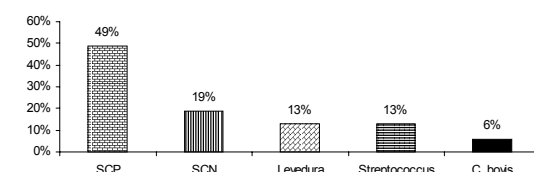
Os dados obtidos sugerem, para o rebanho estudado, que há prováveis falhas no manejo profilático, e estes resultados justificam a adoção de medidas preventivas, como a troca dos insufladores,

seguindo as instruções de uso do fabricante e higiene dos ordenhadores.



SCP= *Staphylococcus coagulase* positivo; SCN= *Staphylococcus coagulase* negativo; C. bovis = *Corynebacterium bovis*

Figura 2. Percentagem de culturas negativas e microrganismos isolados em relação aos resultados positivos ao CMT



SCP= *Staphylococcus coagulase* positivo; SCN= *Staphylococcus coagulase* negativo; C. bovis = *Corynebacterium bovis*

Figura 3. Percentagem de microrganismos isolados nas culturas de bactérias positivas

Nas condições em que foi realizado o trabalho, pode-se concluir que os estádios de lactação não influenciaram a CCS.

A CCS por métodos diretos (eletrônica) ou indiretos (CMT) não são suficientes para a tomada de atitudes terapêuticas e profiláticas, sendo necessária a realização de exames laboratoriais de diagnósticos de agentes patogênicos, para detecção da presença ou ausência de processo infeccioso.

Os patógenos isolados com maior freqüência foram *Staphylococcus coagulase* positivo e *Staphylococcus coagulase* negativo.

Referências

- BODOH, G.W. *et al.* Variation in somatic cell counts in dairy herd improvement milk samples. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v. 59, p. 1119-1123, 1976.
- CARDOZO, R.M. *et al.* Avaliação de testes para diagnóstico de mastites subclínicas em bovino de leite. *Revista Unimar*, Maringá, v. 18, n. 3, p. 627-636, 1996.
- COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. *Rev. Educação Continuada*. CRMV-SP, v. 1, p. 3- 9, 1998.
- COSTA, E. O. *et al.* Estudo da etiologia das mastites bovinas nas sete principais bacias leiteiras do Estado de São Paulo. *Napagama*, São Paulo, Ano III, no. 4, p. 6 – 13, 2000.
- DANIEL, M. *Contagem de células somáticas do leite de vacas holandesas para detecção de mastite subclínica*. 1998 (Trabalho

- de Graduação em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 1998.
- DIAS, J.A. et al. Mastite em vacas primíparas por *Corynebacterium bovis*. In: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 9, 2000, Londrina. *Anais...* Londrina: PIBIC/CNPq - UEL, 2000, p. 389-390.
- EBERHART, R.J. et al. Current concepts of bovine mastitis. In: *Natl. Mastitis Counc.*, 3 ed., Arlington, VA [s.n], 1987.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite. Mastite bovina: causas e conseqüências na produção e qualidade do leite do gado mestiço da microregião de Juiz de fora - MG. 3.ed. Coronel Pacheco, MG: Embrapa-CNPGL, 1984. 8 p. (Circular Técnica, 3).
- FARIA, J.E. et al. Infecção estafilocócica em vacas no final da lactação e no início da seguinte. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v. 48, n. 5, p. 533-541, 1996.
- FERNANDES, J. C. T. Agentes etiológicos de mastite bovina no RS no período de 1972 - 1989. *Arq. Fac. Med. Vet. UFRGS*, Porto Alegre, v. 20, p. 150-163, 1992.
- HARMON, R.J.; RENEAU, J.K. *Fatores que afetam a contagem de células somáticas no leite*. Curitiba: Altech do Brasil, 1993.
- HILLERTON, J.E. Controle de Mastite Bovina. In: WORKSHOP SOBRE PROGRAMAS DE CONTROLE INTEGRADO DA MASTITE BOVINA, 1, 1996, Juiz de Fora. *Anais...* Juiz de Fora: EMBRAPA/CNPGL, 1996, p. 6-21.
- HOGAN, J.S.; SMITH, K.L.A. Practical look at environmental mastitis. In: COMPENDIUM ON CONTINUING EDUCATION FOR THE PRACTICING IN VETERINARY, 1987, *Proceedings...* p. 341-346.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION - IDF. The IDF group of experts on mastitis. Laboratory methods for use in mastitis word. *Int. Nat. Dairy Fed.*, 132: 3-27, 1981.
- KEOWN, J.F. How to interpret the DHIA-230 Somatic Cell Count Report. Assesado em 07 de maio de 2000. Disponível em <http://www.ianr.unl.edu/pubs/Dairy/g860.htm>.
- LAEVENS, H. et al. Influence of Parity and Lactation Stage on the Somatic Cell Count in Bacteriologically negative dairy cows. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v. 80, p. 3219-3226, 1997.
- MONARDES, H. Somatic cell counting and Genetic Improvement of Resistance to Mastitis. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 31, 1994, Maringá. *Anais...* Maringá: UEM, 1994. p. 1-19.
- MULLER, E. E. et al. Estudo da prevalência da mastite bovina. *Semina*, Londrina, v. 1, no. 1, p. 47 - 48, 1978.
- NICOLAU, E.S. et al. Influência da mastite subclínica estafilocócica sobre as características físico químicas e celulares do leite. *Pesqui. Vet. Bras.*, Brasília, v. 16, n. 1, p. 35-38, 1996.
- PARDO, P.E. *Infecções intramamárias em novilhas: 1 - Etiologia das infecções intramamárias em novilhas no período pós parto; 2 - Mastite em novilhas por *Mycoplasma bovis**. 1997. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1997.
- PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. Mastitis: counter attack. *Babson Bros Co*, 1991, 150 p.
- RIBAS, N.P. Análise do Leite. *Revista de Gado Holandês*, São Paulo, v. 2, n. 18, p. 26-31, 1994.
- RIBAS, N.P. Importância da contagem de células somáticas (CCS) para a saúde da glândula mamária e qualidade do leite. In: WORKSHOP SOBRE PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE, 1, 1999, Maringá. *Anais...* Maringá-PR: UEM, 1999. p. 13-19.
- SALVADOR, R. et al. Infecções intramamárias por *Staphylococcus coagulase negativos* (ECN) em vacas primíparas nos primeiros quatro meses de lactação. In: Encontro Anual de Iniciação Científica, 9, 2000, Londrina, PR. *Anais...* Londrina: PIBIC/CNPq - UEL, 2000, p. 400-401.
- SCHUTZ, M.M. et al. Variation of milk, fat, protein, and somatic cells for dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v. 73, p. 484-493, 1990.
- SILVA, D.M. Mastite prevenir ou remediar? *Revista Batavo*, v. 8, n. 53, p. 8-11, 1996.
- TIMMIS, L.L.; SCHULTZ, L.H. Dynamics and significance of coagulase negative and staphylococcal intramammary infections. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v. 70, p. 2648-2657, 1987.
- THIERS, F. O. et al. Correlação entre contagem direta de células somáticas e o teste de "California Mastitis Test" no leite de vacas. *Napgamma*, Ano II, no. 4, p. 9 - 12, 1999.
- TORRES, C.L.A. *Mastite bovina*. Florianópolis: EMPASC, 1985.

Received on May 31, 2000.

Accepted on July 25, 2001.