

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA

ANDRESSA SOARES ZANETTE

DESENVOLVIMENTO DE MASTITE EM BOVINOS

PORTO ALEGRE

2020/1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA

DESENVOLVIMENTO DE MASTITE EM BOVINOS

Autor: Andressa Soares Zanette

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. André Gustavo Cabrera Dalto

Co-orientadora: Prof. Dr. Monique Tomazele Rovani

PORTO ALEGRE

2020/1

ANDRESSA SOARES ZANETTE

DESENVOLVIMENTO DE MASTITE EM BOVINOS

Aprovado em:

APROVADO POR:

Prof. Dr. André Gustavo Cabrera Dalto
Orientador

Prof. Dr. Monique Tomazele Rovani
Co-orientadora

Prof. Dr. Beatriz Riet-Correa Rivero
Membro da banca

Prof. Dr. Franciele Maboni Siqueira
Membro da banca

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente aos meus pais André e Edy, por todo o apoio e por terem se dedicado ao máximo para que as suas filhas pudessem realizar um curso superior. As minhas irmãs Pauline e Taise e meu cunhado Ricardo por todo o apoio e incentivo. Ao William, meu namorado, por sempre me incentivar, apoiar e por compreender os vários momentos de ausência. E a todos os familiares que auxiliaram, para que fosse possível a realização desta grande etapa da minha vida.

Aos meus amigos Alessandra, Bibiana, Caroline, Nathalia, Milânia, Fábio, Cláudia, Luana que estiveram presente ao longo desta caminhada deixando-a mais suave.

Ao Setor de Grandes ruminantes por todos os ensinamentos, troca de experiências, amizades e por tornar este trabalho possível. Em especial ao meu orientador André Dalto e minha co-orientadora Monique Rovani por todo o auxílio e paciência ao longo da realização deste trabalho e por serem exemplos de profissionais a todos nós.

As professoras coordenadoras do núcleo Ruminação e a todos os estagiários que compõem essa equipe, que representou uma etapa fundamental na minha vida acadêmica e no meu desenvolvimento pessoal.

A médica veterinária Marjana pela dedicação ao projeto. A disponibilidade da propriedade onde foi realizada a coleta das amostras, e ao grupo MSD pelo apoio a pesquisa.

RESUMO

A mastite é uma enfermidade que causa grandes prejuízos econômicos na cadeia produtiva do leite, devido às perdas de produção, queda na qualidade do leite, descarte dos animais entre outras perdas. O seu desenvolvimento envolve a condição do sistema imunológico do animal, o potencial infeccioso do patógeno e a qualidade do ambiente que este animal se encontra. A mastite pode ser diagnosticada através dos sinais clínicos ou, na ausência destes, pelo aumento na contagem de células somáticas (CCS) presentes no leite. A mastite pode ser classificada em contagiosa, ambiental e oportunista; e os patógenos são identificados e classificados através dos métodos de cultivo bacteriológico no laboratório ou na fazenda e métodos moleculares. O objetivo do estudo foi identificar os patógenos presentes em uma propriedade no município de Condor - RS e correlacionar os valores de CCS com o número de lactações e categorias de microrganismos encontrados, demonstrando a importância da realização do cultivo microbiológico nas propriedades, para a tomada de decisão sobre a realização de tratamentos dos animais com mastite e introdução de manejos para controlar e evitar novos casos da doença.

Palavras-chave: Mastite. Animal. Patógeno. Ambiente.

ABSTRACT

Mastitis is a disease that causes great economic damage in the milk production chain, due to production losses, drop in milk quality, animal disposal and other losses. Its development involves the condition of the animal's immune system, the infectious potential of the pathogen and the quality of the environment that this animal is in. Mastitis can be diagnosed through clinical signs or, in the absence of these, by an increase in somatic cell count (SCC) present in milk. Mastitis can be classified as contagious, environmental and opportunistic; and pathogens are identified and classified using bacteriological culture methods in the laboratory or on the farm and molecular methods. The objective of the study was to identify the pathogens present in a property in the municipality of Condor - RS and to correlate the SCC values with the number of lactations and categories of pathogens found, demonstrating the importance of carrying out microbiological culture in the properties, for the decision making regarding the treatment of animals with mastitis and the introduction of managements to control and prevent new cases of the disease.

Keywords: *Mastitis. Animal. Pathogen. Environment.*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 FISIOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA	9
3 SISTEMA IMUNOLÓGICO DA GLÂNDULA MAMÁRIA DE BOVINOS	10
4 MASTITE	13
4.1 Caracterização dos agentes bacterianos causadores de mastite contagiosa	13
4.2 Caracterização dos agentes bacterianos causadores de mastite ambiental	16
4.3 Caracterização dos agentes bacterianos causadores de mastite oportunista.....	18
5 MANEJO DO AMBIENTE.....	19
6 MÉTODOS DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE MASTITE BOVINA.....	20
6.1 Manejo de ordenha.....	20
7 DIAGNÓSTICO	22
7.1 Cultivo microbiológico no laboratório.....	22
7.2 Métodos moleculares para diagnóstico	22
7.3 Cultivo microbiológico na fazenda.....	23
8 TRATAMENTO	24
9 CONCLUSÕES	25
REFERÊNCIAS	26
10 ARTIGO	30

1 INTRODUÇÃO

A mastite é uma doença de extrema importância na bovinocultura leiteira. Estima-se que 140 patógenos podem desenvolver esta enfermidade, mas existem outros fatores também relacionados ao desenvolvimento da enfermidade, lembrando da tríade epidemiológica em que nesse caso teremos o patógeno envolvido na infecção, a resposta do animal e o ambiente ao qual ele está exposto. Todos esses fatores possuem importância significativa para o desenvolvimento da doença (CONSTABLE *et al.*, 2017; SANTOS; FONSECA, 2019).

Os impactos econômicos causados por esta enfermidade são altos, tanto os de efeito direto quanto os de efeito indireto, sendo considerada a doença que causa maior prejuízos na produção leiteira (PETROVSKI; TRAJCEV; BUNESKI, 2006). Os impactos também são observados na qualidade do leite produzido, ocorrendo alterações na sua composição, como por exemplo o aumento na contagem de células somáticas (CCS) com consequências na qualidade do produto e seus derivados e tempo de prateleira (SANTOS; FONSECA, 2019).

O controle desta enfermidade está correlacionado com manejos de ordenha adequados e identificação dos patógenos. Após identificá-los, realiza-se a escolha do protocolo de tratamento e controle mais adequado (CONSTABLE *et al.*, 2017). O sucesso da implementação de métodos de controle de mastite está associado a adesão dos produtores ao projeto e a capacidade dos técnicos em difundir os seus conhecimentos. O incentivo às pesquisas na área de controle e tratamento desta enfermidade é muito importante para que novas técnicas continuem sendo desenvolvidas (RUEGG, 2017).

O trabalho tem como objetivo fazer uma revisão sobre os fatores mais relevantes para o desenvolvimento da mastite e apresentar os dados do experimento realizado para demonstrar importância da identificação dos agentes causadores de mastite para o controle desta enfermidade. Foi realizado o acompanhamento de uma propriedade na região de Condor, onde foram coletadas 465 amostras de leite de animais sem sinais clínicos para mastite para identificar os agentes presentes no leite daquela propriedade, correlacionar com as causas e propor melhorias para a propriedade.

2 FISIOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA

A glândula mamária de bovinos é dividida em 4 quartos mamários compostos de glândula e teta. A glândula é responsável pela produção e armazenamento do leite, composta de lobo, lóbulos, ducto menor e maior, cisterna da glândula e teto. Este possui a cisterna do teto, roseta de Fürstenberg, esfíncter e o canal do teto (REECE, 2006; SANTOS; FONSECA, 2019).

O leite é produzido continuamente ao longo do dia e armazenado na glândula, principalmente nos alvéolos e na cisterna da glândula. As células secretoras dos alvéolos sintetizam o leite, que será direcionado para o interior dos alvéolos, ductos menores, lóbulo, lobo, ducto maior, cisterna da glândula, cisterna do teto, atingindo o exterior da glândula. A liberação de ocitocina, iniciada pelo reflexo neuroendócrino, causa a contração das células mioepiteliais que circundam os ductos e alvéolos expulsando o leite da glândula. O esfíncter do teto se abre devido à pressão, causando a ejeção do leite (CUNNINGHAM, 2004).

3 SISTEMA IMUNOLÓGICO DA GLÂNDULA MAMÁRIA DE BOVINOS

O sistema imunológico é responsável pela proteção do organismo contra agentes infecciosos ou mutações celulares. A imunidade pode ser classificada em inata ou inespecífica, considerada a resposta imediata do organismo à exposição, constituída de barreiras anatômicas, fisiológicas, fagocíticas e inflamatórias; e adaptativa ou específica, sendo uma resposta específica capaz de gerar memória, facilitando o combate à recidivas de infecções do mesmo agente. É constituída principalmente por linfócitos T e B (ZACHARY; MCGAVIN, 2013).

Na glândula mamária a barreira anatômica é composta pela integridade da pele, canal do teto e esfíncter muscular. A integridade da pele é importante para dificultar a colonização do teto por bactérias ambientais e infecciosas (RAINARD; RIOLLET, 2006; SANTOS; FONSECA, 2019). O canal do teto é a principal forma de ascensão das bactérias, possuindo mecanismos como o esfíncter muscular e uma camada de queratina derivada do epitélio escamoso estratificado da pele, que possuem ácidos graxos de cadeia longa com ação antimicrobiana e proteínas iônicas com ação bactericida, além de ser uma barreira física, podendo obstruir parcialmente ou totalmente o canal do teto (SORDILLO, 2005; SANTOS; FONSECA, 2019).

Os patógenos que conseguem ultrapassar a barreira anatômica e adentrar na cisterna do teto encontram fatores solúveis não específicos que possuem característica antibacterianas (AITKEN *et al.*, 2011). A lactoferrina é uma glicoproteína que pode ser encontrada no leite, secretada a partir das células epiteliais glandulares (LEGRAND *et al.*, 2004; CHANETON *et al.*, 2008). Ela possui a capacidade de se ligar ao ferro, diminuindo a disponibilidade deste elemento, inibindo a multiplicação bacteriana de estafilococos e coliformes (SANTOS; FONSECA, 2019). Encontra-se em altas concentrações no período de involução da glândula mamária, sendo uma defesa importante para os animais que estão no período seco. (MOLENAAR *et al.*, 1996).

A enzima lisozima também pode ser encontrada no leite e atua sobre a parede celular e membrana externa de bactérias Gram-positivas e Gram-negativa (SANTOS; FONSECA, 2019). Associada a lactoferrina por exemplo consegue alcançar mais facilmente o peptidoglicano de *Staphylococcus epidermidis* (LEITCH; WILLCOX, 1999). Porém, as concentrações de lisozima no leite são baixas o que indica que não possui participação expressiva no sistema imune da glândula mamária (RAINARD; RIOLLET, 2006).

O Sistema Complemento é formado por proteínas encontradas no leite e no sangue, produzidas por hepatócitos, monócitos e macrófagos teciduais. Possui função de lisar as

bactérias, realizar a adesão de microorganismo a células fagocíticas, tendo um papel importante para o início e controle da inflamação (FRANK; FRIES, 1991; SANTOS; FONSECA, 2019).

O sistema lactoperoxidase é formado pela enzima lactoperoxidase, pelo íon tiocinato e por peróxido de hidrogênio. O sistema tem ação bactericida sobre bactérias gram-negativas e bacteriostática sobre bactérias gram-positivas. Por estar presente no leite em baixas concentrações, desempenha uma participação limitada do sistema lactoperoxidase na imunidade da glândula mamária (KUSSENDRAGER; HOOIJIDONK, 2000; SANTOS; FONSECA, 2019).

A ocorrência de lesão ou uma invasão dos tecidos por microrganismos desencadeia uma resposta inflamatória, que se inicia quando os padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) são reconhecidos pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRR). Os PRR iniciam a liberação de citocinas, que possuem papel importante na resposta inflamatória sendo produzida durante todas as etapas da inflamação e de quimiocinas (ZACHARY; MCGAVIN, 2013; SANTOS; FONSECA, 2019). Durante o processo inflamatório, ocorre a dilatação dos vasos sanguíneos, que causa um aumento na permeabilidade dos vasos permitindo a passagem de neutrófilos e monócitos (TIZARD, 2002).

Os neutrófilos possuem a função de fagocitose e são as primeiras células a chegarem no local da inflamação. Os macrófagos também possuem função fagocítica, além de atuar atraindo neutrófilos para o local da inflamação e sinalizar para células do sistema imune específico. O aumento de neutrófilos na glândula mamária causa aumento na quantidade de células somáticas presentes no leite, essas células que eram compostas predominantemente por células de descamação passam a ter os neutrófilos em maior concentração (SANTOS; FONSECA, 2019).

Após os microrganismos ultrapassarem as barreiras da imunidade inata, a segunda linha de defesa é a imunidade adaptativa que possui características como especificidade e memória, composta por linfócitos T e linfócitos B e as células apresentadoras de antígenos (TIZARD, 2002). Os linfócitos T possuem sítios de ligações específicos para os antígenos e causam uma resposta celular sobre os patógenos invasores. Quando esses linfócitos são ativados por células apresentadoras de antígenos, ocorre uma multiplicação e diferenciação em categorias de linfócitos efetores: os linfócitos T citotóxicos e os linfócitos T auxiliares (TIZARD, 2002; ZACHARY; MCGAVIN, 2013). Os linfócitos B não necessitam de células apresentadoras de antígenos, já que as imunoglobulinas são capazes de identificar os antígenos. Após a identificação dos antígenos, ocorre a transformação dos linfócitos B em plasmócitos com a capacidade de secretar diversas imunoglobulinas com especificidade antigênica, e em células de memória que garantirão no momento de uma reinfecção que ocorra uma resposta imune

maior e mais rápida (TIZARD, 2002). A presença de imunoglobulinas no leite é constante, mas durante um processo infeccioso ou no início da lactação, ocorre um aumento dos valores podendo chegar a 80mg/ml de leite (SANTOS; FONSECA, 2019).

4 MASTITE

A mastite é uma inflamação da glândula mamária, que pode ser desencadeada por muitas causas, mas os microrganismos são os mais importantes, especialmente as bactérias (SANTOS; FONSECA, 2019). Os microrganismos causadores de mastite podem ser classificados de duas formas: conforme a patogenicidade do agente causador, sendo classificados em primários ou secundários; e de acordo com a forma de transmissão e local que estes microrganismos são encontrados, sendo categorizados em contagioso, ambiental e oportunista (CONSTABLE *et al.*, 2017; SANTOS; FONSECA, 2019).

4.1 Caracterização dos agentes bacterianos causadores de mastite contagiosa

Os microrganismos classificados como contagiosos são aqueles que tem como reservatório a glândula mamária e podem ser transmitidos durante o processo de ordenha do animal ou da glândula contaminada para os sadios. Os principais microrganismos são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma spp.* e *Corynebacterium bovis* (SANTOS; FONSECA, 2019). O *S. aureus* é cocos gram-positivo, anaeróbio facultativo, catalase-positiva, oxidase-negativa, imóvel, não formadores de esporos e que se agrupam em formas de cachos de uva. As colônias apresentam coloração amarelo-douradas, produção de hemolisina do tipo alfa e beta e em ágar-sangue e são coagulase positivo (QUINN *et al.* 2007).

O *S. aureus* é um dos principais agentes causadores de mastite em bovinos leiteiros, possui um alto potencial infeccioso, podendo ser transmitidos de animais contaminados para os demais através da contaminação de teteiras, da mão do ordenhador, panos para secagem de tetos usados em vários animais e vetores. Essas bactérias podem se multiplicar na pele ou, em alguns casos, chegarem ao canal do teto através de lesões que diminuem as barreiras fisiológicas do animal ou ordenhadeiras com flutuação de vácuo (CONSTABLE *et al.*, 2017; SANTOS; FONSECA, 2019)

As mastites causadas por *S. aureus* podem ter apresentação clínica sendo subdivida em hiperaguda, aguda e crônica. A mastite hiperaguda é pouco frequente nos bovinos leiteiros, mas possui alta letalidade. As vacas no pós-parto imediato, sofrem uma supressão do sistema imunológico por isto são mais suscetíveis a infecção, quando acometidas apresentam inchaço e rubor do quarto mamário. O leite adquire consistência mais densa, podendo ocorrer presença de grumos e pus e, em alguns casos, pode ocorrer a forma gangrenosa, que causa congestão das

veias, edema do úbere e liberação de toxinas do tecido necrosado e microrganismos. O úbere adquire coloração escura e formação de enfisema subcutâneo. Os animais apresentam sinais sistêmicos como hipertermia, aumento da frequência cardíaca, anorexia, ausência de motilidade ruminal e fraqueza que pode evoluir para decúbito. A evolução do quadro clínico para o animal comatoso pode ser em algumas horas (CONSTABLE *et al*, 2017).

A apresentação aguda e crônica de mastites por *S. aureus* são semelhantes, diferindo no grau de proliferação das bactérias nos ductos. A forma aguda não é frequente, e ocorre à obstrução de ductos e desenvolve-se focos de inflamação grave na glândula. Na forma crônica a inflamação é branda e ocorre a formação de tecido conjuntivo que diminuí a funcionalidade da glândula, também pode ocorrer a formação de abscessos, que dificulta a cura desses animais, e causa uma eliminação intermitente do patógeno (CONSTABLE *et al*, 2017).

As infecções por *S. aureus* causam grandes prejuízos aos produtores devido ao aumento na CCS e diminuição na produção de leite e rendimento de gordura (BOTARO *et al.*, 2015), além de causar preocupações em saúde pública devido à produção de toxinas (CARDOSO; CARMO; SILVA, 1999). A prevalência de mastite subclínica no Rio Grande do Sul foi de 32,2% a 69% e destas 17,6 % eram causadas por *S. aureus* (BANDEIRA *et al*, 2013).

O diagnóstico realizado através de cultura microbiológica a partir de única amostra de leite por vaca, formada pelo pool de todos os tetos, tem uma sensibilidade de 53%. Já a coleta individual por teto permite obter taxa de sensibilidade de 75%. Ainda, se forem realizadas três coletas seriadas do mesmo teto, a sensibilidade aumenta para 95% (CONSTABLE *et al*, 2017; SANTOS; FONSECA, 2019).

O *S. agalactiae* é um coco Gram-positivo, anaeróbio facultativo e catalase negativo, as colônias formadas em ágar-sangue são pequenas e translúcidas e produzem beta hemólise (QUINN *et al.* 2007). O patógeno encontra-se na glândula mamária de vacas infectadas e sua transmissão para vacas sadias pode ocorrer no momento da ordenha, pela falta de desinfecção de teteiras entre os animais, pela mão dos ordenhadores, por contaminação de ambientes, por panos de secagem dos tetos de uso comum entre os animais e pela ausência do *pós-dipping* após a ordenha (CONSTABLE *et al.*, 2017; SANTOS; FONSECA, 2019).

O *S. agalactiae* causa uma infecção crônica que se inicia quando o patógeno invade o canal do teto, se multiplica, invade os ductos e chega até os nódulos linfáticos supramamários. Então, ocorre o aumento de neutrófilos e uma reação sistêmica, em que o animal pode apresentar hipertermia por alguns dias, mas os sinais no úbere de inchaço, presença de coágulos no leite e um aumento na CCS de 10 a 100 vezes ocorrem quando a capacidade de produção do

quarto mamário está comprometida devido à fibrose e atrofia dos ductos (QUINN *et al.*, 2007; CONSTABLE *et al.*, 2017).

Os animais infectados por *S. agalactiae* demonstram altos valores de CCS e CBT refletindo em um aumento nos valores de tanque. A taxa de cura após o tratamento é de aproximadamente 90% a 95% e o diagnóstico pode ser realizado através do cultivo microbiológico, que possui 95% de sensibilidade e 100% de especificidade (CONSTABLE *et al.* 2017; SANTOS; FONSECA, 2019).

O *Mycoplasma* spp. não responde à coloração de Gram, é anaeróbio facultativo e as colônias tem aparência de ovo frito. O *Mycoplasma* spp pode estar alojado no sistema respiratório e reprodutivo dos animais e contaminar a glândula mamária (JASPER; AL-AUBAIDI; FABRICANT, 1974). O *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma californicum* e *Mycoplasma bovingenitalum* são as principais espécies causadoras de mastite (QUINN *et al.*, 2007; SANTOS; FONSECA, 2019). Por ser um patógeno com alto potencial de contágio dissemina-se rápido entre os animais do plantel, essa transmissão ocorre principalmente no momento da ordenha (QUINN *et al* 2007; CONSTABLE *et al.*, 2017).

A infecção começa com a redução na produção de leite, mas sem alterações visíveis no leite, conforme ocorre a evolução desta infecção o leite passa a ter consistência aquosa e coloração rósea ou cinza, até chegar na eliminação de secreção purulenta pela glândula. Os animais acometidos podem desenvolver problemas locomotores devido à capacidade do *Mycoplasma* spp. se disseminar pelo organismo dos animais (CONSTABLE *et al.* 2017; SANTOS; FONSECA, 2019). Ocorre a formação de biofilme que dificulta a sua eliminação e devido ao grande número de infecções subclínicas, esses animais iram continuar infectando os demais (DUDEK *et al*, 2020)

O diagnóstico pode ser feito por cultivo microbiológico através de uma amostra de leite do tanque para verificar se a propriedade possui animais positivos para *Mycoplasma* spp.; porém a sensibilidade do teste é de 33% a 59%. A dificuldade de conservação da amostra, o método de coleta, as exigências nutricionais específicas e a quantidade de patógenos viáveis que chegam no laboratório dificultam o sucesso do cultivo. A técnica de PCR possui alta sensibilidade para diagnosticar a presença de *Mycoplasma* spp. sendo o método mais utilizado. (BUZINHANI; METIFFOGO, TIMENETSKY, 2007; CONSTABLE *et al.*, 2017). A taxa de descarte nos animais positivos é alta, de aproximadamente 75%, refletindo em um grande prejuízo econômico (CONSTABLE *et al.*, 2017). O *C. bovis* é gram-positiva, anaeróbia facultativo, oxidase negativa e catalase positiva, as colônias são brancas, pequenas, secas e não-hemolíticas (QUINN *et al.*, 2007). Está localizado no canal do teto e ali causa uma competição

pelos nutrientes presentes com os demais patógenos que forem infectar essa glândula. É considerado um patógeno menor da glândula mamária, mas possui alta taxa de contágio das vacas durante a ordenha. (PANKEY *et al.*, 1984; CONSTABLE *et al.*, 2017).

A infecção pelo patógeno pode ser longa causando uma mastite subclínica, com um moderado aumento de CCS e CBT, ou clínica leve. Não se indica o tratamento de animais subclínicos, devendo ser realizado no momento da secagem dos animais e manejos como *pré-dipping* e *pós-dipping* implantados para o controle do patógeno na propriedade (CONSTABLE *et al.*, 2017; SANTOS; FONSECA, 2019).

4.2 Caracterização dos agentes bacterianos causadores de mastite ambiental

Os patógenos classificados como ambientais são os que habitam no ambiente, como por exemplo lama, cama e fezes, tendem a desenvolver mastite clínica, diferente do observado em patógenos contagiosos que desencadeavam em sua maioria mastite subclínica. *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. e *Citrobacter* spp. são classificados como coliformes e *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus canis*, *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp. e *Serratia* spp. não possuem classificação específica (CONSTABLE *et al.*, 2017).

Os coliformes são bacilos gram-negativos considerados patógenos primários no desenvolvimento de mastite. A mastite causada por coliformes possui prognóstico menos favorável nos animais no pós-parto, devido a diminuição da atividade do sistema imune. Após ocorrer a contaminação da glândula mamária ocorre a multiplicação e liberação de endotoxinas, causando sinais de inflamação local e sistêmicos como febre, diarreia e fraqueza. A taxa de letalidade nesses animais é alta assim como a perda de função da glândula afetada. Os casos de mastite subclínica por coliformes o sistema imune consegue combater o patógeno, impedindo a liberação de endotoxinas. (SMITH; TODHUNTER; SCHOENBERGER, 1984; CONSTABLE *et al.*, 2017).

A *E. coli* é anaeróbia facultativa, móvel e cresce em meio ágar *MacConkey* e sua colônia apresenta coloração rosa clara (QUINN *et al.*, 2007). Na maioria das infecções, manifesta sinais brandos causando sintomatologia grave em 5-10% dos casos. Em alguns casos, também pode desenvolver mastite crônicas, mas a incidência é baixa desses casos, causa um padrão necrosupurativo na glândula mamária (BIANCHI *et al.*, 2019; SANTOS; FONSECA, 2019).

A *Klebsiela* spp. é um agente não-móvel e cresce em meio de ágar *MacConkey*. As duas espécies mais frequentes em bovinos são *Klebsiela pneumoniae*, que está presente no rúmen e a contaminação da glândula mamária ocorre quando os animais se deitam em camas sujas de fezes. A *Klebsiela oxytoca*, presente no campo e talos de planta, onde os animais podem se contaminar ao deitar em camas de serragem contaminadas (GAO *et al.*, 2019). A mastite causada por *Klebsiela* spp. é identificada com mais frequência no período de transição e causa consequências sistêmicas graves aos animais, e queda abrupta na produção de leite (SANTOS; FONSECA, 2019).

O *Streptococcus uberis* e o *Streptococcus dysgalactiae* são os *Streptococcus* mais comuns encontrados em mastites clínicas e subclínica. Eles contaminam os animais no período em que estão secas e durante a lactação. Estudos apontam que a infecção por *C. bovis* é um facilitador para ocorrer a contaminação por *Streptococcus* spp. (CONSTABLE *et al.*, 2017).

O *S. uberis* foi encontrado nos lábios, amígdalas e pele de bovinos. Nos rebanhos, observa-se grande variedade de cepas, o que é um indicador de sua característica ambiental alta e baixa capacidade contagiosa, embora muitos animais tenham infecções crônicas e eliminação contínua do patógeno. *S. dysgalactiae* foi encontrado nas amígdalas, boca, vagina, e glândula mamária de bovinos, sendo que a forma de transmissão pode ser contagiosa ou ambiental (CONSTABLE *et al.*, 2017; SANTOS; FONSECA, 2019).

Trueperella pyogenes é uma bactéria gram-positiva, anaeróbica facultativa e comensal do trato reprodutivo de bovinos, mas em alguns casos pode causar problemas reprodutivos como metrite, endometrites e abortos e outras doenças como pneumonia, peritonite e casos graves de mastite (ROSENBERG *et al.*, 2006; CONSTABLE *et al.*, 2017). A mastite tem caráter hiperagudo, o animal apresenta sinais sistêmicos, altos valores de CCS e secreções purulentas da glândula mamária, sendo a taxa de letalidade e descarte dos animais acometidos alta (CONSTABLE *et al.*, 2017). A resistência da bactéria a princípios ativos usados em demasia na clínica veterinária como oxitetraciclina e tetraciclina são fatores preocupantes para o controle deste patógeno (ZHANG *et al.*, 2017).

Serratia marcescens é gram-negativa, com baixa incidência na casuística de mastites pode estar presente na serragem das camas, desencadeando uma mastite crônica branda, que pode levar a edema da glândula mamária e coágulos no leite. As contaminações são esporádicas, mas podem ocorrer surtos associados à contaminação do do aplicador de *pré-dipping* e a formação de biofilme, transmitindo o patógeno para vários animais. Geralmente são utilizados compostos de amônio quaternário, clorexidine alquilamina terciária, *n, n*-bis (3-aminopropil) dodecilamina conhecido também como laurilamina dipropilenodiamina. Os animais

acometidos são descartados devido a dificuldades no tratamento (CONSTABLE *et al.*, 2017; FRIMAN *et al.*, 2019).

O *Bacillus cereus* é uma bactéria gram-positiva, pouco observada em mastites, sendo componente da microflora do teto de bovinos, que esporadicamente pode causar mastites agudas hemorrágica (QUINN *et al.*, 2007; CONSTABLE *et al.*, 2017). *Nocardia* spp. é gram-positiva e causa mastite esporádica quando é introduzida de forma acidental na glândula mamária (CONSTABLE *et al.*, 2017). *Pasteurella* spp., *Mycobacterium bovis*, *Pseudomonas* spp, *Citrobacter* spp., *Fusobacterium necrophorum* e *Clostridium perfringens* tipo A também podem causar mastite mas sua incidência é baixa (CONSTABLE *et al.*, 2017).

4.3 Caracterização dos agentes bacterianos causadores de mastite oportunista

Os *Staphylococcus coagulase-negativo* (SCN) são agentes secundários no desenvolvimento da mastite e compõem a classe dos oportunistas, sendo na maioria das vezes parte da microbiota da pele dos animais. Os SCN englobam os *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus sciuri*. Auxiliam na proteção da glândula mamária contra microrganismos externos, mas em alguns casos, podem causar mastite subclínica. Isso promove um aumento da CCS em relação a animais saudáveis, porém não ocorrem alterações na composição do leite. O tratamento nesses casos é dispensável devido a taxas satisfatórias de auto cura. No caso do desenvolvimento de mastite clínica, a taxa de resposta ao tratamento é satisfatória (TOMAZI *et al.*, 2015; CONSTABLE *et al.*, 2017).

5 MANEJO DO AMBIENTE

O ambiente em que as vacas estão alojadas possui papel importante no desenvolvimento da mastite. Independente do sistema escolhido: confinamento, semi-confinamento ou extensivo. O ambiente deve que ser limpo, seco e possibilitar a vaca o máximo de conforto possível (SANTOS; FONSECA, 2019).

O sistema de confinamento aumenta a lotação de animais gerando mais dejetos e necessidade de desenvolver manejos adequados para manter o ambiente limpo e seco (SANTOS; FONSECA, 2019). O ambiente deve proporcionar conforto aos animais, através de camas e temperatura adequadas, as vacas passam a maioria do dia deitadas se estiverem a sua disposição camas confortáveis, (HULSEN; AERDEN, 2016) a garantia de higiene dessa cama é fundamental para que não ocorra novas contaminações, devido ao tempo que os tetos ficam em contato com a cama (CONSTABLE *et al*, 2017).

O sistema *free-stall* se caracteriza pela presença de camas individuais, corredores, tanques de água e local para alimentação. Essas camas quando compostas de maravalha, serragem e palhas formam um ambiente propício para a multiplicação bacteriana, por isso alguns manejos diários no *free-stall* são aconselhados como: revirar as camas diariamente e introduzir aditivos como cal hidratada a cada 48 horas para elevar o pH e diminuir a umidade da cama, o que causa uma diminuição na carga bacteriana e aumenta a vida útil da cama ocorrendo menor contaminação dos tetos. As camas de areia são muito confortáveis e higiênicas mas possui um custo de implementação e manutenção mais alto o que muitas vezes desanima o produtor. Os colchões são higiênicos porém menos confortável principalmente quando não ocorre a troca das camas nos períodos necessários (SANTOS; FONSECA, 2019).

O sistema de confinamento *compost-barn* é composto por uma única cama de serragem ou maravalha que é utilizada por todos os animais, tanque de água e local de alimentação. Na cama ocorre um processo de compostagem, que é potencializada com o processo de aeração utilizando um trator com rotativa duas vezes ao dia. A aeração permite a oxigenação da cama tornando-a seca diminuindo a contaminação dos úberes dos animais (SANTOS; FONSECA, 2019).

Nas criações extensivas deve ser observado áreas propensas a acumular animais como sombras e arredores de cochos da água, buscando evitar formação de barro, com excesso de umidade e pisoteio. Independente do sistema escolhido para a produção, os tetos no momento da ordenha devem ter baixa contaminação da sua extremidade para evitar que novos patógenos colonizem a glândula mamária (CONSTABLE *et al* 2017).

6 MÉTODOS DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE MASTITE BOVINA

Para proporcionar melhorias na qualidade do leite produzido, alguns fatores são fundamentais para o controle de mastite contagiosa e ambiental, como o programa indicado pelo *National Mastitis Council* (EUA), conhecido como programa dos 10 pontos:

- 1) Estabelecimento de metas para a saúde do úbere;
- 2) Manutenção de um ambiente limpo, seco e confortável;
- 3) Procedimentos de ordenha adequados;
- 4) Manutenção e uso adequado do equipamento de ordenha;
- 5) Registrar os animais que desenvolverem mastite, e os protocolos de tratamento utilizados;
- 6) Manejo adequado de mastite clínica durante a lactação;
- 7) Controle de mastite da vaca seca;
- 8) Manutenção da biossegurança para patógenos contagiosos e comercialização de vacas cronicamente infectadas;
- 9) Monitoramento regular do estado de saúde do úbere;
- 10) Avaliação periódica das medidas de controle de mastite (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2001).

A conscientização do produtor sobre a importância de melhorar a qualidade do leite é fundamental para que se obtenha sucesso na implementação do programa (BARKEM *et al.*, 2013).

6.1 Manejo de ordenha

O momento da ordenha é fundamental para a saúde da glândula mamária, pois ocorre o aumento do diâmetro e da permeabilidade do canal do teto e o relaxamento do esfíncter, diminuindo o potencial de defesa do organismo e aumentando a exposição de patógenos (ZECCONI *et al.*, 2002). Para facilitar a implementação de técnicas higiênicas e eficientes durante a ordenha, podemos dividi-la em 4 momentos: a entrada dos animais na sala de ordenha, a pré-ordena, a ordenha propriamente dita e o pós-ordena (SANTOS; FONSECA, 2019).

Na condução das vacas à sala de espera deve-se evitar o estresse dos animais para que a produção de adrenalina não prejudique o reflexo da ejeção do leite. Os animais não devem permanecer mais que 1 hora na sala de espera e devem ter uma dimensão mínima de 1,4m²/vaca

(SANTOS; FONSECA, 2019). A realização de uma linha de ordenha, processo onde se busca evitar o contágio das vacas por patógenos, realizando uma ordem dos animais menos sujeitos a ter algum patógeno até os que possivelmente tenham, este manejo é fundamental para que se tenha menores valores de CCS (SOUZA et al., 2005; PEREIRA; MACHADO; TEODORO, 2012).

Antes de realizar a ordenha, algumas medidas devem ser implementadas. A realização do teste da caneca do fundo preto com os primeiros jatos de leite dos tetos é importante para a visualização de alterações no leite. O *pré-dipping* com soluções desinfetantes, para evitar a contaminação do teto no momento da ordenha (OLIVER; GILLESPIE; LEWIS, 2001) e diminuir os valores de CBT do leite (GALTON; PETERSSON; MERRILL, 1986) e após 30 segundos do composto no teto deve ser realizado a secagem dos tetos com papel toalha descartável (CONSTABLE et al., 2017).

No momento de colocar o conjunto de teteiras deve-se evitar a entrada de ar, que causa flutuação de vácuo no sistema. A retirada do conjunto manual ou automática deve ser realizada quando o fluxo de leite for menor que 400 gramas por minuto (CONSTABLE et al., 2017; SANTOS; FONSECA, 2019). Após a ordenha deve ser aplicado uma solução desinfetante *pós-dipping* para que além de eliminar patógenos presentes no teto, também formam uma barreira física para evitar a entrada de outros patógenos. Os animais são liberados da sala de ordenha, e devem ir para o cocho de alimentação por um tempo mínimo de 90 minutos, para que o canal do teto se feche (MARTINS et al., 2017; SANTOS; FONSECA, 2019).

A manutenção de higiene do ordenhador é muito importante para que ele não se torne um carreador de bactérias entre os animais, o uso de luvas limpas em todo o processo de ordenha trocando-as quando for necessário é um cuidado fundamental para o controle de mastite no rebanho (SILVA; PORTELLA; VERAS, 2002). Coletas mensais de CCS individuais das vacas, auxiliam para detectar vacas com mastite crônica, e avaliar a necessidade de segregar animais e reorganizar os lotes que são ordenhados juntos (BARKEMA et al, 2013).

7 DIAGNÓSTICO

A identificação dos agentes responsáveis por desenvolver mastite é muito importante para que se tenha menores perdas econômicas, realizando o tratamento apenas nos animais que necessitam e com os fármacos mais indicados (SANTOS *et al.*, 2019). O diagnóstico é realizado através da coleta de amostras de leite, que podem ser do tanque, composta ou simples (CONSTABLE *et al.*, 2017). Para realizar a coleta, deve-se utilizar luvas, descartar os primeiros jatos de leite, realizar o *pré-dipping*, a secagem dos tetos, realizar antisepsia com álcool 70°, coletar em tubo estéril, identificar e armazenar sobre refrigeração em temperaturas entre 4° e 5°C (SANTOS *et al.*, 2019).

7.1 Cultivo microbiológico no laboratório

Corriqueiramente os cultivos são realizados inoculando amostras de leite em placas de Ágar Sangue e Ágar MacConkey, em ambientes de aerofilia. Após a inoculação do patógeno, a placa permanece na estufa a 37°C por 18-24 horas, momento em que se avalia a presença de crescimento bacteriano e pureza (cultura pura, mista ou contaminada). Após a identificação primária das colônias, realiza-se testes complementares para identificar a espécie e os grupos dos agentes (SANTOS *et al.*, 2019). O *Mycoplasma* spp. deve ser cultivado em meios e condições específicas para incubação como 37°C e 10% de CO₂, muitos laboratórios não estão preparados para realizar o seu cultivo microbiológico, indicando a utilização de técnicas moleculares como por exemplo a reação em cadeia polimerase (PCR) (SANTOS; FONSECA, 2019; DUDEK *et al.*, 2020).

7.2 Métodos moleculares para diagnóstico

A utilização de métodos moleculares para diagnóstico dos patógenos causadores de mastite está sendo cada vez mais utilizado, principalmente para a identificação de *M. bovis*, *S. aureus* e *S. agalactiae* (SANTOS; FONSECA, 2019). A utilização do PCR permite um diagnóstico mais rápido e preciso dos patógenos do que o observado no cultivo microbiológico, mas como o diagnóstico é realizado através da análise de DNA as bactérias vivas e mortas são identificadas, a identificação dos patógenos varia de acordo com o kit utilizado para o exame. A realização do PCR em tempo real aumenta os custos do diagnóstico, mas devido à alta sensibilidade e especificidade e ao menor tempo para se dispor do resultado, a implementação

dessa técnica deve ser considerada (KOSKINEN *et al.* 2009; SANTOS; FONSECA, 2019). A técnica de espectrometria de massa (MALDI-TOF) realiza uma análise dos patógenos através das massas moleculares na forma iônica e requer o cultivo microbiológico previamente. Com essa técnica se identifica os patógenos e os diferencia em espécies (SANTOS; FONSECA, 2019).

7.3 Cultivo microbiológico na fazenda

A implementação do cultivo na propriedade permite identificar os patógenos de maneira rápida e desta forma realizar o tratamento antimicrobiano somente quando for necessário. (MELO *et al.*, 2020). O cultivo deve ser realizado em um espaço específico, composto de geladeira com congelador e estufa. Existem vários métodos de cultivo na fazenda que diferem entre a composição dos meios utilizados nas placas. O crescimento nas placas para a grande maioria dos patógenos ocorre entre 12 e 24 horas, mas no caso do *Corynebacterium bovis* e *Trueperella pyogenes*, o crescimento ocorre entre 40 e 48 horas (SANTOS; FONSECA, 2019). A qualificação do profissional que irá avaliar o crescimento na placa é muito importante para precisão do diagnóstico, e a presença de um fluxograma para identificar os microrganismos pode limitar aos patógenos presentes ali o diagnóstico (LAGO; GODDEN, 2018).

8 TRATAMENTO

O uso consciente de antimicrobianos é um fator de importância mundial. Praticamente todas as mastites são tratadas com antimicrobianos, o que causa descarte de leite e gastos com medicamentos muitas vezes desnecessários. A escolha pelo tratamento dos animais deve ser baseada no animal no seu sistema imunológico, período de lactação, históricos de mastite naquele teto e idade do animal, e patogenicidade do microrganismo e eficácia dos antimicrobianos sobre o mesmo. A taxa de cura durante a lactação varia conforme o patógeno como *S. agalactiae* possui alta taxa de cura entre 80-100%, enquanto *S. aureus* apresenta taxa de cura de apenas 25-30%, o tratamento também não é indicado em patógenos gram negativos. A cura espontânea da mastite ocorre mais frequentemente em patógenos ambientais como *E. coli* pode ser de até 90%, mas os contagiosos como por exemplo *S. aureus* é praticamente nula. O tratamento dos animais no momento da secagem é uma técnica muito eficaz para o controle de mastite e também muito utilizada através da infusão de antimicrobiano local com longo período de ação acompanhado ou não de selantes nos tetos (PINZÓN-SÁNCHEZ; CABRERA; RUEGG, 2011; SANTOS; FONSECA, 2019).

9 CONCLUSÕES

A produção de leite de qualidade está associada a muitos fatores como o ambiente que esse animal se encontra, os patógenos aos quais são expostos e à capacidade do animal em reagir a essa infecção. Medidas de manejo do ambiente e da ordenha são fundamentais para garantir o máximo de conforto para esses animais e a menor exposição aos patógenos. A realização do diagnóstico permite identificar os patógenos causadores de mastite e avaliar a necessidade do tratamento com antimicrobianos e, quando este for necessário, escolher os mais adequados.

REFERÊNCIAS

- AITKEN, S. L.; CORL, C. M.; SORDILLO, L. M. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, New York, v.16, n.4, p.291-304, sep.2011.
- BANDEIRA, F. S.; PICOLI, T.; ZANI, J. L.; DA SILVA, W. P.; FISCHER, G. Frequência de *Staphylococcus aureus* em casos de mastite bovina subclínica, na região Sul do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, vol.80, n.1, p1808-1657, jan. 2013.
- BARHEMA, H. W.; DE VliegHER, S.; PIEPERS, S.; ZADOKS, R. N. Herd level approach to high bulk milk somatic cell count problems in dairy cattle. **The veterinary quarterly**, Boston, v.33, p.82-93, may. 2013.
- BIANCHI, R. M; SCHWERTZ, C. I.; DE CECCO, B. S.; PANZIERA, W.; DE LORENZO, C.; HECK, L.C; SNEL, G. G. M.; DA SILVA, F.S.; PAVARANI, S. P.; DRIEMEIER, D. Pathological and microbiological characterization of mastitis in dairy cows. **Tropical Animal Health and Production**, Heidelberg, v.51, p. 2057-2066, april, 2019.
- BOTARO,B.G; CORTINHAS, C. S.; DIBBERN, A. G.; E SILVA, L. F. P.; BENITES, N. R.; SANTOS, M. V. Staphylococcus aureus intramammary infection affects milk yield and SCC of dairy cows, **Tropical Animal Health and Production**, Heidelberg, v.47, p.61-66, jan. 2015.
- BUZINHANI, M.; METIFFOGO, E.; TIMENETSKY, J. Detecção de *Mycoplasma spp.* e *Ureaplasma diversum* em vacas com distúrbios reprodutivos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.59, p. 1368-1375, 2007.
- CARDOSO, H. F. T.; CARMO,L.S.;SILVA,N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.52, n.1, p.61-66, jan.2015.
- CHANETON, L.; TIRANTE, L.; MAITO, J.; CHAVES, J.; BUSSMAM, L. E. Relationship Between Milk Lactoferrin and Etiological Agent in the Mastitic Bovine Mammary Gland, **Journal Dairy Science**, Champaign , v. 91, p.1865-1873, 2008.
- CONSTABLE, P.D.;HINCHCLIFF. K.W; DONE, S.H.; GRUNBERG, W. **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats - two-volume**. 11ed. Missouri, EUA: Elsevier Ltda., 2017. 2v. p.1904-2001
- CUNNINGHAM, J.G., **Tratado de fisiologia veterinária**. 3ªed. Rio de janeiro: editora Guanabara Koogan S.A., 2004. p.417-429.
- DUDEK, K.; NICHOLAS, R. A. J.; SZACAWA, E.; BEDNAREK, D. *Mycoplasma bovis* Infections—Occurrence, Diagnosis and Control. **Pathogens**, Switzerland, v.9, n.8 p. 1-21, aug. 2020.

FRANK, M. M.; FRIES L. F. The Role of Complement in inflammation and phagocytosis. **Immunology Today**, Amsterdam, v.12, n.9, p.322-326,1991.

FRIMAN, M. J.; EKLUND, M. H.; PITKALA, A. H.; RAJALA-SCHULTZ, P. J.; RANTALA, M. H. J. Description of two *Serratia marcescens* associated mastitis outbreaks in Finnish dairy farms and a review of literature. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 61, p. 1-11, 2019.

GALTON, D.M.; PETERSSON, L.G.; MERRILL, W.G. Effects of Premilking Udder Preparation Practices on Bacterial Counts in Milk and on Teats. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 69, p. 260-266, jan.1986.

GAO, J.; LI, S.; ZHANG, J.; ZHOU, Y.; XU, S.; BARKEMA, H. W.; NOBREGA, D. B.; ZHU, C.; HAN, B. Prevalence of Potential Virulence Genes in *Klebsiella* spp. Isolated from Cows with Clinical Mastitis on Large Chinese Dairy Farms. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v.17, n.12, p.852-863, 2019.

HULSEN, J., AERDEN, D. **Feeding Signals**. Um guia prático para alimentação de vacas leiteiras, visando saúde e produção. Belo Horizonte:O2, 2016.p. 21

JASPER. D. E.; AL-AUBAIDI. J. M.; FABRICANT.J. Epidemiologic observations on *Mycoplasma Mastitis*. **Cornell Veterinarian**, New York, v.64, p.407–415, 1974.

JOAQUIM, S. F.; GUIMARÃES, F.F.; SALINA, A.; JUNQUEIRA, N. B.; GOMES, E. N.; LANGONI, H. Identification of subclinical mastitis caused by *Mycoplasmas* spp. from screenings of bulk tanks **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.70, n.6, p.1793-1797, 2018

KOSKINEN, M. T.; HOLOPAINEN, J.; PYORALA, P.; BREDBACKA, P.; PITKALA, A.; BARKEMA, H. W.; BEXIGA, R.; ROBERSON, J.; SOLVEROD, L.; PICCININI, R.; KELTON, D.; LEHMUSTO, H.; NISKALA, S.; SALMIKIVI. Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.92, p.952-959, 2009

KUSSENDRAGER, K. D.; HOOIJIDONK, A. C. M. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.84, p.19-25, nov. 2000.

LAGO, A.; GODDEN, S.M. Use of Rapid Culture Systems to Guide Clinical Mastitis Treatment Decisions. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, Philadelphia, v.34, n. 3, p.389-412, 2018.

LEGRAND, D.; ELASS, E.; PIERCE, A.; MAZURIER, J. Lactoferrin and host defence: an overview of its immuno-modulating and anti-inflammatory properties. **Biology of metals**, Oxford, v.17, p.225-229, june, 2004.

LEITCH, E. C.; WILLCOX, D. P. Elucidation of the Antistaphylococcal action of lactoferrin and lysozyme. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 48, p.867-871, sep..1999.

MARTINS, C.M.M.R.; PINHEIRO, E. S. C.; GENTILINI, M.; BENAVIDES, M.L.; SANTOS, M.V. Efficacy of a high free iodine barrier teat disinfectant for the prevention of naturally occurring new intramammary infections and clinical mastitis in dairy cows, **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 100, p 3930-3939, 2017.

MELO, A. P.; OLIVEIRA, A. M.; RABELO, M.S.; DE SOUZA, F. A.; RIBEIRO, L. F. Isolamento e identificação de microrganismos causadores de mastite clínica utilizando a placa AccuMast®. **Pubvet**, Maringá, v. 14, n.10, p148, 2020.

MOLENAAR, A. J.; KUYS, Y. M.; WILKINS, R. J.; MEAD, P. E.; TWEEDIE, J.W. Elevation of lactoferrin gene expression in developing, ductal, resting, and regressing parenchymal epithelium of the ruminant mammary gland. **Journal of dairy science**, Champaign, v.79, p.1198-1208, july 1996.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2001, National Mastitis Council Recommended Mastitis Control Program. Disponível em: <http://www.nmconline.org/docs/NMC10steps.pdf>. Acesso em 20 out. 2020.

OLIVER, H. D.; GILLESPIE, B.E.; LEWIS, M. J. Efficacy of a New Premilking Teat Disinfectant Containing a Phenolic Combination for the Prevention of Mastitis, **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, p.1545-1549, june,2001.

PANKEY, J.W.; NICKERSON, S. C.; BODDIE, R. L.; HOGAN, J.S. Effects of *Corynebacterium bovis* Infection on Susceptibility to Major Mastitis Pathogens. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 68, n.10, p. 2684-2693, oct. 1985.

PEDREIRA, D. A.; MACHADO, G. M.; TEODORO, V. A. M. Cartilha do Produtor de Leite, Boas Práticas de Ordenha, **Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais**, MG, ab.2012

PETROVSKI, K. R.; TRAJCEV. M.; BUNESKI. G. A review of the factors affecting the costs of bovine mastitis. **Journal of the South African Veterinary Association**, Pretoria., v.77, n.2, p.52-60, jun.2006.

PINZÓN-SÁNCHEZ, C.; CABRERA, V. E.; RUEGG, P. L. Decision tree analysis of treatment strategies for mild and moderate cases of clinical mastitis occurring in early lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, p.1872-1892, abr.2011.

QUINN, P. J. ; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e doenças infecciosas**, 1 ed. Porto Alegre: Artmed ,2007. 521 p.

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

REECE, Dukes- Fisiologia dos animais domésticos. 12º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2006. p. 670-690.

ROSENBERG, E; DELONG, E.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. **The Prokaryotes: Actinobacteria**. 4th, ed. Nova York: Springer Heidelberg, 2014. 1061p.

- RUEGG, P. L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.100, p. 10381-10397, 2017.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Controle da Mastite e Qualidade do Leite-Desafios e Soluções**. 1 ed. Pirassununga-SP, 2019. 301 p.
- SILVA, R. W. S. M.; PORTELLA, J. S.; VERAS, M. M. Circular técnico 27: Manejo Correto de Ordenha e Qualidade do leite. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA, 2002.
- SMITH, K. L.; TODHUNTER, D. A.; SCHOENBERGER, P. S. Environmental Mastitis: Cause, Prevalence, prevention., **Journal of Dairy Science**, Champaign v. 68 p.1531-1553, June, 1984.
- SORDILLO, M. L. Factors Affecting Mammary Gland Immunity and Mastitis Susceptibility. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 98, p. 89-99, May, 2005.
- SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F.; MOREIRA, E. C.; BRITO, M. A. V. P.; BASTOS, R. R. Fatores de risco associados à alta contagem de células somáticas do leite do tanque em rebanhos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.57, Sept. 2005.
- TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária uma introdução**. 6 ed. São Paulo: Roca, 2002. 532p.
- TOMAZI, T.; GONÇALVES, J. L.; BARREIRO, J. R.; ARCARI, M. A.; SANTOS, M. V. Bovine subclinical intramammary infection caused by coagulase-negative staphylococci increases somatic cell count but has no effect on milk yield or composition. **Journal of dairy science**, Champaign v.98, p.3071-3078, 2015.
- ZACHARY, J.F.; MCGAVIN, D.M. **Bases da Patologia em Veterinária**. 5ed. São Paulo: Elsevier, 2013. p. 618- 731.
- ZECCONI A., HAMANNO J., BRONZO V., MORONI P., GIOVANNINI G., PICCININI R. Relationship Between Teat Tissue Immune Defences and Intramammary Infections. **Biology of the Mammary Gland. Advances in Experimental Medicine and Biology**, Boston, v.480, p. 287-293, 2002
- ZHANG, D.; ZHAO, J.; WANG, Q.; LIU, Y.; TIAN, C.; ZHAO, Y.; YU, L.; LIU, M. *Trueperella pyogenes* isolated from dairy cows with endometritis in Inner Mongolia, China: tetracycline susceptibility and tetracycline-resistance gene distribution. **Microbial Pathogenesis**, London, v.105, p.51-56, 2017

10 ARTIGO

Neste item é apresentado o artigo “Identificação de agentes causadores de mastite subclínica e suas consequências”.

Identificação de agentes causadores de mastite subclínica e suas consequências

Identification of agents causing subclinical mastitis and its consequences

Andressa Soares Zanette¹, Monique Tomazele Rovani¹, André Gustavo Cabrera Dalto¹

¹Setor de Grandes Ruminantes (SGR) - Faculdade de Veterinária/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul – FAVET/UFRGS, Porto Alegre, RS

RESUMO

A mastite bovina é uma reação inflamatória causada pela tentativa do organismo de combater a invasão tecidual ou trauma. Devido aos prejuízos causados ao longo dos anos, acredita-se ser a enfermidade com maior importância na produção leiteira. O objetivo do trabalho foi identificar os patógenos presentes no leite em uma propriedade no município de Condor e correlacionar os patógenos presentes com o valor de CCS e número de lactações dos animais. Foram coletadas 465 amostras compostas por um pool de todos os tetos funcionais dos animais para a realização do cultivo bacteriológico. Foram observados 26% de agentes ambientais, 25% de agentes oportunistas, 20% não tiveram crescimento, 16% estavam contaminadas, 9% de agentes mistos (ambientais, contagiosos e oportunista) e 3% de agentes contagiosos, demonstrando uma alta prevalência de mastite subclínica neste rebanho. Também, observou-se uma diferença significativa entre os números de lactação e os valores de CCS e a categoria do patógeno e o valor de CCS. A utilização do cultivo microbiológico é fundamental para a identificação dos patógenos, e assim tomar as medidas necessárias para o controle da mastite.

Palavras-chave: CCS. Mastite. Ambientais. Oportunistas. Contagiosas

ABSTRACT

Bovine mastitis is an inflammatory reaction caused by the body's attempt to combat tissue invasion or trauma. Due to the damage caused over the years, it is believed to be the most important disease in dairy production. The objective of the work was to identify the pathogens present in milk on a farm in the municipality of Condor and to correlate the pathogens present with the SCC value and number of lactations of the animals. 465 samples were collected, composed of a pool of all functional ceilings of the animals for bacteriological cultivation. 26%

of environmental agents were observed, 25% of opportunistic agents, 20% had no growth, 16% were contaminated, 9% of mixed agents (environmental, contagious and opportunistic) and 3% of contagious agents, showing a high prevalence of subclinical mastitis in this herd. Also, there was a significant difference between the lactation numbers and the SCC values and the category of the pathogen and the SCC value. The use of microbiological culture is essential for the identification of pathogens, and thus take the necessary measures to control mastitis.

Keywords: SCC. Mastitis. Environmental. Opportunistic. Contagious

Introdução

A mastite é a principal enfermidade que afeta a produção leiteira, caracterizando-se por uma inflamação que atinge o parênquima da glândula mamária, com o objetivo de combater problemas de origem tóxica, traumática, alérgica, metabólica, fisiológica e infecciosa (CONSTABLE *et al.*, 2017; SANTOS; FONSECA, 2019). A reação inflamatória visa eliminar os patógenos, neutralizar as toxinas e regenerar os tecidos danificados. No entanto, tem como consequência a alteração nas características físicas, químicas e organolépticas do leite, e alterações no tecido glandular do úbere (RIET-CORREA *et al.*, 2007; SANTOS; FONSECA, 2019).

A mastite causa grandes problemas econômicos nas propriedades ou no processamento e armazenamento do leite (SANTOS; FONSECA, 2019). Os prejuízos econômicos geralmente são subestimados pela maioria dos produtores, podendo ser relacionados à produção de leite ou à vida produtiva dos animais (HUIJPS; LAM; HOGVEEN, 2008; SEEGERS, FOURICHON, BEAUDEAU, 2003). Os agentes causadores de mastite podem ser de origem ambiental, contagiosa e oportunistas (CONSTABLE *et al.*, 2017). A mastite ambiental causada por patógenos que estão presentes no ambiente (BRITO, 2007) já a mastite contagiosa tem como fonte de contaminação a região do úbere do animal contaminado, por sua vez as bactérias oportunistas estão presentes na pele do teto do animal e quando tem a possibilidade de adentrá-lo podem causar a inflamação da glândula mamária (CONSTABLE *et al.*, 2017).

A mastite pode ser classificada em clínica e subclínica. O exame clínico do animal e a inspeção do úbere são fundamentais para identificar a mastite clínica. Por outro lado, a mastite subclínica é estimada pela Contagem de Células Somáticas (CCS) e o *California Mastitis Test* (CMT). O resultado positivo do microbiológico para agentes patológicos e ausência de sinais clínicos indica mastite subclínica (SANTOS; FONSECA, 2019).

O objetivo deste estudo foi identificar os agentes presentes no leite de uma propriedade com 680 vacas em lactação, sem sinais clínicos ou aumento de CCS. Com base nos resultados obtidos, manejos de prevenção e controle serão sugeridos conforme a categoria de agente predominante.

Material e métodos

Georreferenciamento e caracterização da propriedade

As coletas foram realizadas em uma fazenda de produção de leite, de animais da raça Holandesa no Município de Condor no Rio Grande do Sul. A propriedade se destinava à criação de bovinos de leite em sistema de confinamento do tipo *compost barn* para as vacas no pós-parto, *free-stall* para vacas primíparas e de alta produção e extensivo para as vacas com mastite clínica, positivas para *S. aureus*, e de baixa produção e no período da secagem das vacas se realizava o tratamento com antimicrobianos locais e aplicação de selante e todos os animais eram destinados ao campo. O material da cama utilizado nos dois confinamentos era serragem tratada com cal antes de ser utilizada. No sistema *free-stall*, as camas eram refeitas no momento das ordenhas e era feita a aplicação de cal 3 vezes na semana. No *compost barn*, as camas eram revolvidas 3 vezes ao dia. A propriedade possuía 680 animais em lactação ordenhados em sistema de carrossel 3 vezes ao dia.

A propriedade realizava linha de ordenha, que seguia a seguinte ordem: vacas no pós-parto, primíparas, alta produção, baixa produção, positivas para *S. aureus* e por último animais com mastite clínica. O lote de *S. aureus* possuía 30 animais diagnosticado previamente na fazenda pelo método *Accumast™*, esses animais ficavam alojados em um lote separado dos outros animais para evitar a disseminação de *S. aureus* no rebanho.

Questionamentos epidemiológicos

Em dezembro de 2019 foram coletadas 465 amostras de leite de animais clinicamente saudáveis, do lote de primíparas, recém paridas e de alta produção, para realização de cultivo bacteriológico, com o objetivo de realizar o mapeamento dos agentes microbiológicos presentes. Os animais coletados tinham média de produção de 37,42 litros/dia. Dos 465 animais: 231 estavam na primeira lactação, 81 na segunda, 46 na terceira, 25 na quarta, 7 na quinta e apenas 1 na sexta lactação e 74 animais não tinham essa informação.

Amostra

As amostras de leite foram obtidas através de *pool* de todos os quartos mamários funcionais dos animais. A escolha por amostras compostas foi devido ao relato de alta incidência de patógenos contagiosos na propriedade e ao desejo de realizar um levantamento do índice de mastite subclínica, e os patógenos envolvidos na infecção para tomar as medidas de prevenção e controle necessárias (SANTOS; FONSECA, 2019). Para a coleta realizou-se antissepsia das mãos previamente às coletas e utilizou-se luvas de procedimentos sanitizadas com álcool 70°. No momento da coleta das amostras, foi realizado o *pré-dipping* com solução à base de clorexidine, secagem com papel toalha individual, descarte dos primeiros jatos e em seguida, realizada antissepsia com algodão imersos em álcool 70°. A amostra foi coletada em tubo estéril, identificada e refrigerada a 7°C. Após o término das coletas, a amostra era congelada e mantida a -20°C e enviada ao laboratório.

Exame bacteriológico

O cultivo bacteriano foi realizado no laboratório VIDAVET, Botucatu, SP. Foi utilizado para isolamento dos microrganismos o meio não seletivo Ágar Sangue e o meio seletivo Ágar MacConkey, após o período de incubação realizou-se a avaliação das características morfológicas das colônias, a coloração de gram e testes bioquímicos.

Contagem de Células Somáticas (CCS)

A CCS foi realizada através da coleta de amostras de leite utilizando amostradores, que permitem uma coleta mais fidedigna das amostras. Após a coleta, os tubos eram homogeneizados para misturar o leite ao conservante e refrigerado a temperatura inferior a 7°C. As amostras coletadas foram enviadas ao Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros do Paraná (PARLPR), um laboratório cadastrado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e integrante da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL). A CCS foi obtida por meio da técnica automatizada de citometria de fluxo.

Análise estatística

Os dados obtidos no trabalho dos cultivos bacterianos e os dados de produção dos animais da fazenda foram tabulados em planilhas eletrônica através do programa *Microsoft Excel*® para melhor visualização do padrão produtivo do rebanho e seus respectivos resultados de cultivo bacteriano. Posteriormente, foram realizadas análises de teste de homogeneidade amostral, ANOVA e Teste T com auxílio do programa SPSS v. 20.0® e considerado um nível de significância de 5% para as comparações estabelecidas.

Resultados

A partir do cultivo microbiológico de 465 amostras analisadas foram observados: 26% (120) de agentes ambientais, 25% (115) de agentes oportunistas, 20% (93) não tiveram crescimento (negativo), 16% (77) estavam contaminadas, 3% (16) de agentes contagiosos e 9% (44) de agentes mistos (ambientais, contagiosos e oportunista). A Tabela 1 demonstra os patógenos encontrados na propriedade, a classe ao qual eles pertencem e se é uma infecção simples, que ocorreu o crescimento de apenas um patógeno, ou se possui mais patógenos envolvidos.

Tabela 1- Categorias e quantidade dos patógenos encontrados na cultura microbiológica da propriedade.

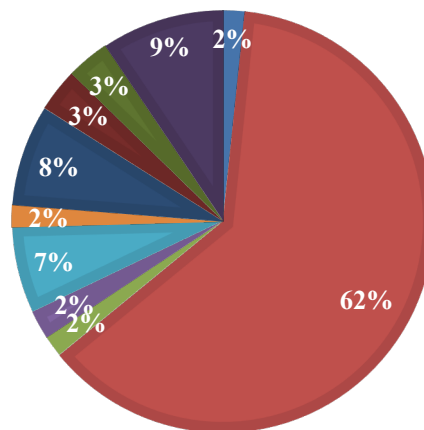
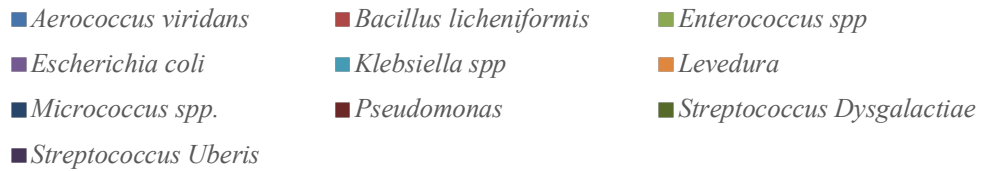
Categoria	Agente	Simple	Mais de um agente	Total
Ambiental	<i>Aerococcus viridans</i>		3	3
	<i>Bacillus licheniformis</i>	74	39	113
	<i>Enterococcus spp</i>		3	3
	<i>Escherichia coli</i>		4	4
	<i>Klebsiella spp</i>	7	5	12
	<i>Levedura</i>	3		3
	<i>Micrococcus spp</i>	13	1	14
	<i>Pseudomonas</i>		6	6
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	6		6
	<i>Streptococcus uberis</i>	7	10	17
Contagiosa	<i>Corynebacterium bovis</i>	15	5	20
	<i>Streptococcus agalactiae</i>		1	1
	<i>Staphylococcus aureus</i>		1	1
Oportunista	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	65	20	85
	<i>Staphylococcus epidermis</i>		2	2
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	14	12	26
	<i>Staphylococcus warneri</i>	31	3	34

Fonte: Do próprio autor.

Na categoria dos ambientais ocorreu uma incidência de *B. licheniformis* presente em 62% das amostras, *S. uberis* esteve presente em 9%, *Micrococcus spp* em 8% e os demais agentes microbianos totalizou 21% das amostras, como pode ser observado na figura 1. Na categoria de contagiosos ocorreu uma incidência de 91% de *C. bovis*, *S. uberis* e *S. aureus* estiveram presentes em apenas uma amostra como pode ser visto na figura 2. Na categoria de

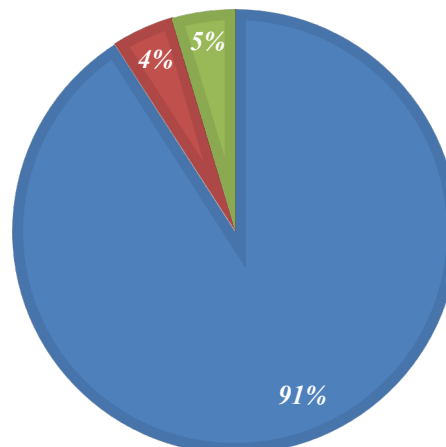
oportunistas *S. chromogenes* esteve presente em 58% das amostras, *S. haemolyticus* presente em 18% das amostras, o *S. warneri* em 23% das amostras e *S. epidermis* em 1% das amostras, como pode ser observado na figura 3.

Figura 1 Microrganismos ambientais presentes nas amostras de leite



Fonte: Do próprio autor.

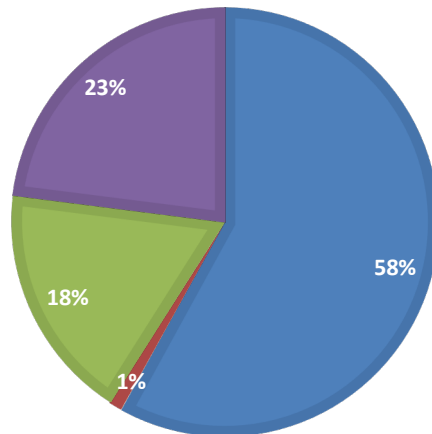
Figura 2 Microrganismos contagiosos presentes nas amostras de leite



Fonte: Do próprio autor.

Figura 3 Microrganismos oportunistas presentes nas amostras de leite

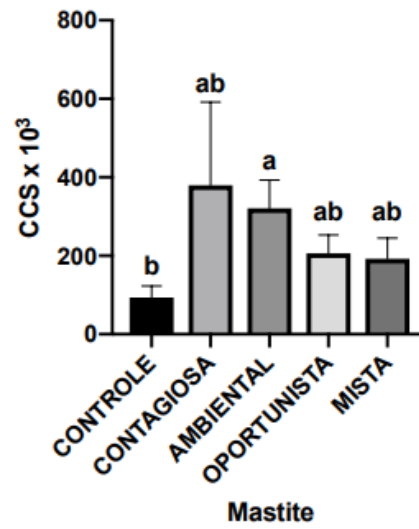
■ *Staphylococcus chromogenes* ■ *Staphylococcus epidermis*
■ *Staphylococcus haemolyticus* ■ *Staphylococcus warneri*



Fonte: Do próprio autor.

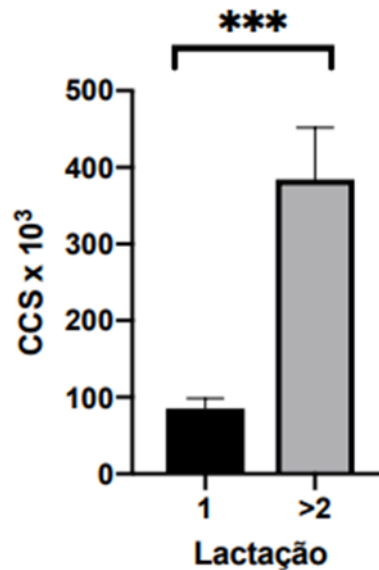
Observou-se maiores valores de CCS nas amostras em que foram isolados patógenos ambientais em relação ao grupo controle ($p < 0,01$) como pode ser visualizado na figura 4. Além disso, as vacas primíparas apresentavam média de CCS inferior as vacas múltiparas ($p < 0,01$) conforme figura 5.

Figura 4 Contagem de Células Somáticas de vacas Holandesas sem sinais clínicos de mastite (n =354), de acordo com o tipo de mastite, determinado pelo agente isolado: Controle, não foram isolados agentes (n = 82); Contagiosa (n = 15); Ambiental (n = 111); Oportunista (n = 105); Mista (n = 41).



Fonte: próprio autor

Figura 5. Contagem de Células Somáticas de vacas Holandesas nas diferentes ordens de lactação: 1= primíparas (n =176); 2=múltíparas (n=124).



Fonte: próprio autor

Discussão

Em relação ao cultivo microbiológico das amostras de leite, foi identificada a presença de três categorias de patógenos: ambiental, contagiosa e oportunista. A categoria de agentes ambientais foi a mais prevalente no cultivo bacteriológico, mas deve-se levar em consideração que a propriedade possuía um lote com 30 animais separados dos demais que eram positivos para *S. aureus*, que não foram coletados. O valor de 16 % das amostras contaminadas pode estar associado ao método de coleta utilizado a amostra composta que se caracteriza por ser um pool de vários tetos, o que aumenta o tempo de exposição do frasco ao ambiente e também a possibilidade do animal ter microrganismos diferentes causando infecções em diferentes tetos, esses fatores podem levar um crescimento bacteriano de 4 patógenos ou mais na mesma amostra.

Os patógenos mais prevalentes nas infecções ambientais foram: *B. licheniformis*, *S. uberis* e *Micrococcus* spp. O *B. licheniformis* são bacilos gram-positivos que estão presente na terra e em matérias em decomposição (QUINN *et al.*, 2007). Em infecções experimentais, foi responsável por causar abortos e partos prematuros em bovinos (AGERHOLM *et al.*, 1999). A alta percentagem de cultivo bacteriológico positivo para esse patógeno pode estar relacionada à grande prevalência do patógeno no ambiente. O *S. uberis* cocos gram-positivo que está

presente no ambiente, como por exemplo no material que compõe a cama. Também pode ser comensal da pele dos bovinos, podendo ser transmitido de vaca para vaca no momento da ordenha, ou do ambiente para a vaca em outros momentos, inclusive durante o período seco, o que aumenta o risco da contaminação da glândula mamária (ZADOKS, *et al.*, 2001; QUINN, *et al.*, 2007). Os animais acometidos por este patógeno podem desenvolver mastite clínica ou subclínica (CONSTABLE *et al.*, 2017). As camas da propriedade em questão eram compostas de serragem, o que pode favorecer a multiplicação do *S. uberis*, aumentando o risco de contaminação destes animais.

O *Micrococcus* spp são bactérias gram-positivas, que podem ser isoladas do solo ou na flora natural da pele dos animais. A espécie *Micrococcus luteus* pode causar problemas graves em humanos, como meningites e septicemias (ROSENBERG *et al.*, 2014). A presença de *Micrococcus* spp nas amostras de leite pode indicar uma contaminação da amostra por bactérias presentes no ambiente e na pele dos animais. As vacas secas eram alojadas em áreas de campo e mata nativa, o que favorecia a contaminação por patógenos ambientais, e assim aumentaria o risco de mastites clínicas ou subclínicas no início da lactação (CONSTABLE *et al.*, 2017).

Os agentes contagiosos presentes nas amostras coletadas foram: *C. bovis*, *S. agalactiae* e *S. aureus*. *C. bovis* bacilo gram-positivo, altamente contagioso que coloniza o canal do teto dos animais, desencadeando a mastite subclínica de curso longo (CONSTABLE, *et al.*, 2017). O fato do patógeno estar presente em apenas 20 amostras coletadas pode estar relacionado à eficácia da realização do *pós-dipping* no controle deste patógeno, pois propriedades que não utilizam a aplicação do *pós-dipping* corretamente podem ter até 60% do rebanho positivo para *C. bovis* (SANTOS; FONSECA, 2019).

S. agalactiae cocos, gram-positivo, que possui alta taxa de contágio, sendo patógeno obrigatório da glândula mamária de bovinos com a capacidade de formar biofilmes, o que dificulta a sua eliminação (SANTOS; FONSECA, 2019; SHANG; WANG; XUE, 2020). Durante a infecção, ocorre o aumento de CCS e de CBT no leite. A eliminação desse patógeno é possível através de identificação dos animais acometidos e implementação do tratamento que possui bons índices de cura (KEEFE, 2016). A propriedade realizava o *pré-dipping* e o *pós-dipping* no momento da ordenha o que dificulta o contágio, e também realizavam o cultivo na fazenda, o que permitia a identificação da maioria dos patógenos. (SANTOS; FONSECA, 2019).

S. aureus é uma bactéria gram-positiva, coagulase positiva, um dos principais patógenos responsáveis pelo desenvolvimento de mastite, principalmente subclínica (SANTOS; FONSECA, 2019). Nas coletas realizadas, apenas 1 amostra foi positiva para *S. aureus*, mas a

propriedade possuía um lote de 30 vacas positivas no teste *Accumast* para *Staphylococcus aureus*, que ficavam em um grupo isolado das demais e não foram coletadas. O fato de ter sido realizado uma única coleta de um pool de todos os tetos diminuiu a sensibilidade do teste para 53%, enquanto a realização de 3 coletas seriadas de um único quarto mamário possui sensibilidade de 95% (CONSTABLE *et al.*, 2017; SANTOS; FONSECA, 2019). Em rebanhos com altos valores de CCS, a prevalência da infecção pode ser alta, como observado num estudo que realizou a coleta de quartos mamários que apresentavam aumento de CCS, das 194 amostras de leite coletadas 92 foram positivas para *S. aureus* (GUZMÁN-RODRIGUES, 2020).

Os patógenos oportunistas são patógenos com menor importância no desenvolvimento de mastite; porém causam aumento significativo dos valores de CCS, mas sem consequência para a composição e produção de leite (SANTOS; FONSECA, 2019). Em propriedades que controlaram os patógenos mais importantes no desenvolvimento de mastite, essa categoria tende a aumentar (CONSTABLE *et al.*, 2019). A principal fonte destes patógenos é a pele dos tetos e, no caso de *S. epidermis*, a pele do ordenhador (VANDERHAEGHEN *et al.*, 2015). No presente estudo, os patógenos mais frequentes foram *S. chromogenes*, *S. warnei*, *S. haemolyticus*, parcialmente diferente do que o encontrado em outros estudos que sugerem *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. simulans* como os *Staphylococcus* coagulase negativa de maior relevância (VANDERHAEGHEN *et al.*, 2015).

No presente estudo, foi observado valor de CCS superior nos animais acometidos por mastite ambiental. O aumento da CCS ocorre devido à sinalização dos mediadores inflamatórios após a exposição ao patógeno, causando um aumento de neutrófilos na corrente sanguínea. Esta resposta é maior em bactérias gram-negativas, devido ao complexo de lipopolissacarídeo presentes na parede celular (RIOLLET; RAINARD; POUTREL, 2000; SANTOS; FONSECA, 2019). Como pode ser observado na resposta inflamatória para infecções de *Escherichia coli*, em que ocorre o recrutamento rápido e potente de neutrófilos, diferente do que observado em infecções por *S. aureus* (RIOLETT; RAINARD; POUTREL, 2000).

Em relação aos números de lactações, observou-se um aumento de CCS da primeira lactação para as demais. Como já havia sido descrito em trabalhos anteriores, o aumento de CCS ocorre devido à maior exposição a infecções destes animais conforme o aumento do número de lactações (CUNHA, 2008; CONSTABLE, 2017).

As amostras dos animais que estavam contaminadas ou não possuíam valores de CCS foram excluídos do estudo estatístico. Não foi possível correlacionar os valores de CCS com os dias em leite dos animais devido à ausência dessa informação.

Conclusão

Os dados apresentados neste estudo apontam uma alta prevalência de infecções ambientais em animais que não apresentavam sinais clínicos de mastite. A variabilidade de agentes identificados relata a importância da realização de cultivo bacteriológico para a utilização correta e prudente de tratamentos com antimicrobianos. Também se observou o aumento do valor CCS em infecções causadas por patógenos ambientais quando comparado ao grupo controle, assim como foi observado o aumento de CCS relacionado ao aumento do número de lactações.

REFERÊNCIAS

- AGERHOLM, J. S.; JENSEN, N. E.; DANTZER, V.; JENSEN, H. E.; AARESTRUP, F. M. Experimental Infection of Pregnant Cows with *Bacillus licheniformis* Bacteria. **Veterinary Pathology**, New York, v. 36, n. 3, p.1991-201, 1999
- BRITO, M. A. V. P. Diagnóstico Microbiológico da Mastite Bovina. **Embrapa gado de leite, Juiz de Fora**, 2007.
- CONSTABLE, P. D.; HINCHCLIFF, K.W; DONE, S. H.; GRUNBERG, W. **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats - two-volume**. 11ed. Missouri, EUA: Elsevier Ltda., 2017. 2v. p.1904-2001.
- CUNHA, R. P. L.; MOLINA, L. R.; CARVALHO, A. U.; FACURY FILHO, E. J.; FERREIRA, P. M.; GENTILINI, M.B. Mastite Subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. **Arquivo Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.60, n.1, feb.2008.
- GANDA, E. K.; BISINOTTO, R. S.; DECTER, D. H.; BICALHO, R. C. Evaluation of an On-Farm Culture System (Accumast) for Fast Identification of Milk Pathogens Associated with Clinical Mastitis in Dairy Cows, **Plos One**, San Francisco, v.11, n.5, may, 2016.
- GUZMÁN-RODRIGUES, J. J.; LÉON-GALVÁN, M.F.; BARBOZA-CORONA, J. E.; VALENCIA-POSADAS, M.; LOEZA-LARA, P. D.; SÁNCHEZ-CEJA, M.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-MEZA, J. E.; GUTIÉRREZ-CHÁVES, A. J. Analysis of virulence traits of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastites in semi-intensive and Family dairy farms. **Journal of veterinary Science**, Seoul, v.21, n.5, p. 1-14, set. 2020.
- KEEFE, G. Update on Control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for Management of Mastitis. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, Philadelphia, v.28, p.203-216, jul. 2012.

- QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e doenças infecciosas**, 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 521 p.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Controle da Mastite e Qualidade do Leite-Desafios e Soluções**. 1 ed. Pirassununga-SP, 2019. Edição dos autores. 301 p.
- SHANG, F.; WANG, H.; XUE, T. Anti-Biofilm Effect of Tes Saponin on a *Streptococcus agalactiae* Strain Isolated from Bovine Mastitis. **Animals: an open access journal from MDPI**, Switzerland, v.10, n.9, p.1713, sep. 2020.
- RAINARD, C.; RAINARD, P.; POTREL, B.; Differential Induction on Complement Fragment C5a and Inflammatory Cytokines during Intramammary Infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, Washington, v.7, n.2, p.161-167, mar. 2000.
- RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. Doenças bacterianas – III. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3. ed. São Paulo: Livraria, 2007. 1 v. p. 199-443.
- ROSENBERG, E.; DELONG, E.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. **The Prokaryotes: Actinobacteria**. 4th, ed. Nova York: Springer Heidelberg, 2014. 1061p.
- SEEGERS, H., FOURICHON, C., BEAUDEAU, F., Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. **Veterinary Research**, Paris, v.34, n.5, p. 475–491, 2003
- UIJPS, K.; LAM, T. J.; HOGVEEN, H. Costs of mastitis: facts and perception, **Journal of Dairy Research**, Londres, v.75, n.1, p 113-120, 2008.
- VANDERHAEGHEN, W.; PIEPERS, S.; LEROY, F.; COILLIE, E. V.; HAESBROUCK, F.; VLIEGHER, S. Identification, typing, ecology and epidemiology of coagulase negative staphylococci associated with ruminants. **Veterinary journal**, London, v.203, n.1, p.44-51, jan. 2015.
- ZADOKS, R. N.; ALLORE, H. G.; BARKEMA, H. W.; SAMPIMON, O. C.; GROHN, Y. T.; SCHUKKEN, Y. H. Analysis of an Outbreak of *Streptococcus uberis* Mastitis. **American Dairy Science Association**, Indianapolis, v. 84, p. 590-599, 2001