

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**ANDRESSA BRAATZ PORT**

**DIAGNÓSTICO DE MASTITE BOVINA**

**PORTO ALEGRE**

**2023/2**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**DIAGNÓSTICO DE MASTITE BOVINA**

Autor: Andressa Braatz Port

Trabalho apresentado à Faculdade de Veterinária como  
requisito parcial para a obtenção da graduação em  
Medicina Veterinária

Orientador: André Gustavo Cabrera Dalto

**PORTO ALEGRE**

**2023/2**

#### CIP - Catalogação na Publicação

Port, Andressa Braatz  
DIAGNÓSTICO DE MASTITE BOVINA / Andressa Braatz  
Port. -- 2024.  
48 f.  
Orientador: André Gustavo Cabrera Dalto.

Coorientador: Gustavo Potrich Marchioretto.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade  
de Veterinária, Curso de Medicina Veterinária, Porto  
Alegre, BR-RS, 2024.

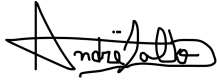
1. Mastite Subclínica. 2. California Mastitis Test.  
3. Cultivo microbiológico. 4. MALDI-TOF. 5.  
Estafilococos não aureus. I. Dalto, André Gustavo  
Cabrera, orient. II. Marchioretto, Gustavo Potrich,  
coorient. III. Título.

**ANDRESSA BRAATZ PORT**

**DIAGNÓSTICO DE MASTITE BOVINA**

Aprovado em 08/02/2024

APROVADO POR:



---

Prof. Dr. André Gustavo Cabrera Dalto  
Orientador e Presidente da Comissão

*Gustavo Marchioretto*

---

M.V. Gustavo Potrich Marchioretto  
Membro da Comissão

  
Mary Jane Tweedie de Mattos Gomes

---

Profª Drª Mary Jane Tweedie de Mattos Gomes  
Membro da Comissão



---

M.V. Aline Policarpo Baioco  
Membro da Comissão

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família por me fornecerem todo o suporte durante esses anos de graduação.

Sou grata a todos os amigos e aos colegas com quem dividi minha trajetória na Faculdade de Veterinária da UFRGS (FAVET). Vocês foram peça fundamental para que eu conseguisse superar as dificuldades e tornaram essa caminhada mais leve.

Agradeço a todos estagiários do Setor de Grandes Ruminantes que auxiliaram na execução deste trabalho, assim como meu orientador André Dalto, meu co-orientador Gustavo Marchioretto e a professora Monique Rovani pelos esforços dedicados.

Agradeço à fazenda que abriu as portas para eu pudesse realizar os experimentos que compõe este trabalho.

Agradeço também a todos os médicos veterinários e profissionais que conheci durante a graduação e aos professores por contribuírem imensamente para minha formação como médica veterinária e contribuírem para meu crescimento pessoal.

## RESUMO

A mastite bovina inflamação da glândula mamária de origem multifatorial causada mais frequentemente por agentes de origem bacteriana e é uma das doenças mais relevantes e desafiadoras que afeta rebanhos leiteiros no mundo, causando prejuízos econômicos e ao bem estar dos animais. O objetivo do trabalho foi realizar uma breve revisão bibliográfica sobre a mastite bovina e avaliar se existe correlação estatística entre a intensidade da reação do CMT (traço, uma, duas ou três cruces) em cada amostra, com o crescimento de colônias bacterianas em cultivo microbiológico de fazenda. Além disso, avaliar a concordância entre o resultado do diagnóstico obtido da cultura microbiológica em fazenda, da cultura microbiológica laboratorial e da espectrometria de massas, especialmente para agentes do grupo *Estafilococos não aureus*. No experimento um, foram selecionadas vacas com aumento abrupto da contagem de células somáticas (CCS) acima de 200.000 células/mL de leite e realizado o CMT, registrando a intensidade de reação (negativo, traço, uma, duas ou três cruces). Foram coletadas amostras dos quartos reagentes e realizado cultivo microbiológico em fazenda, avaliando o crescimento em 24h. No segundo experimento, foram selecionadas amostras negativas e positivas para agentes do grupo *Estafilococos não aureus* resultantes do experimento 1, e encaminhadas para cultivo microbiológico laboratorial e para espectrometria de massas (MALDI-TOF). Foi verificada diferença significativa ( $p < 0,01$ ) na intensidade do CMT uma cruz em obter cultura microbiológica positiva na fazenda. Das 34 culturas negativas, 38,24% foram concordantes entre laboratório e cultura em fazenda. Já das 18 culturas com crescimento de SNA, 88,89% foram concordantes. Das 14 amostras enviadas para o MALDI-TOF, 83,33% foram concordantes entre os três métodos de diagnóstico. Os métodos de diagnóstico da mastite subclínica testados apresentam resultados satisfatórios e, conforme suas particularidades, se adaptam a diferentes realidades.

Palavras-chave: mastite subclínica; *California Mastitis Test*; cultivo microbiológico; MALDI-TOF; *Estafilococos não aureus*

## **ABSTRACT**

*Bovine mastitis is an inflammation of the mammary gland of multifactorial origin, most frequently caused by agents of bacterial origin and is one of the most relevant and challenging diseases that affect dairy herds in the world, causing economic losses and losses to the animals' well-being. The objective of the work was to carry out a brief bibliographic review on bovine mastitis and evaluate whether there is a statistical correlation between the intensity of the CMT reaction (dash, one, two or three crosses) in each sample, with the growth of bacterial colonies in microbiological culture. of farm. Furthermore, evaluate the agreement between the diagnostic results obtained from microbiological culture on farm, laboratory microbiological culture and mass spectrometry, especially for agents from the non-aureus Staphylococci group. In experiment one, cows with an abrupt increase in somatic cell count (SCC) above 200,000 cells/mL of milk were selected and CMT was performed, recording the reaction intensity (negative, trace, one, two or three crosses). Samples were collected from the reagent rooms and microbiological cultivation was carried out on the farm, evaluating growth in 24 hours. In the second experiment, negative and positive samples for agents from the non-aureus Staphylococci group resulting from experiment 1 were selected and sent for laboratory microbiological cultivation and mass spectrometry (MALDI-TOF). A significant difference ( $p < 0.01$ ) was found in the intensity of CMT a cross in obtaining a positive microbiological culture on the farm. Of the 34 negative cultures, 38.24% were concordant between laboratory and farm culture. Of the 18 cultures with SNA growth, 88.89% were concordant. Of the 14 samples sent to MALDI-TOF, 83.33% were concordant between the three diagnostic methods. The tested methods for diagnosing subclinical mastitis present satisfactory results and, depending on their particularities, adapt to different realities.*

*Keywords: Subclinical mastitis; California Mastitis Test; microbiological culture; MALDI-TOF; Non-aureus Staphylococci*

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Prevalência da infecção e perdas de produção de leite estimadas, associadas à contagem de células somáticas no tanque de resfriamento. ....	22
Tabela 2 – Relação entre o resultado do <i>California Mastitis Test (CMT)</i> e valores aproximados de contagens de células somáticas correspondentes. ....	24



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>MASTITE BOVINA</b> .....	<b>10</b>
2.1	FATORES DE RISCO .....	10
2.2	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA .....	12
2.3	CLASSIFICAÇÃO DA MASTITE .....	13
<b>2.3.1</b>	<b>Origem do Agente</b> .....	<b>13</b>
2.3.1.1	<i>Origem Ambiental</i> .....	13
2.3.1.2	<i>Mastite Contagiosa</i> .....	14
<b>2.3.2</b>	<b>Características Clínicas</b> .....	<b>15</b>
2.3.2.1	<i>Mastite Clínica</i> .....	15
2.3.2.2	<i>Mastite Subclínica</i> .....	16
2.4	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO .....	20
<b>2.4.1</b>	<b>Teste da Caneca de Fundo Preto</b> .....	<b>21</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Contagem de Células Somáticas (CCS)</b> .....	<b>21</b>
<b>2.4.3</b>	<b>California Mastitis Test (CMT)</b> .....	<b>23</b>
<b>2.4.4</b>	<b>Condutividade Elétrica</b> .....	<b>24</b>
<b>2.4.5</b>	<b>Cultura Microbiológica</b> .....	<b>25</b>
<b>2.4.6</b>	<b>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</b> .....	<b>27</b>
<b>2.4.7</b>	<b>Espectrometria de Massa (MALDI-TOF)</b> .....	<b>28</b>
2.5	TRATAMENTO .....	29
<b>3</b>	<b>ARTIGO</b> .....	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>44</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>45</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina, entendida como a inflamação da glândula mamária, é uma das doenças mais relevantes e desafiadoras que afeta rebanhos leiteiros no mundo, causando prejuízos econômicos e ao bem estar dos animais. É uma doença conhecida há muito tempo, no entanto, sua complexa etiologia e natureza multifatorial dificultam as ações de controle. Há também uma preocupação em relação à saúde humana pela qualidade do leite produzido e pelo elevado uso de antimicrobianos, o que pode contribuir para o surgimento de patógenos resistentes (Ashraf; Imran, 2020; Tommasoni *et al.*, 2023).

A doença representa não só um desafio ao manejo da saúde dos animais, mas também representa um risco para a indústria de laticínios e uma séria ameaça econômica aos produtores de leite. Por isso, a mastite bovina é desafio mundial que reúne esforços de pesquisadores de diversas áreas para desenvolver métodos adequados de controle, diagnóstico e tratamento através de novos estudos e novas tecnologias (Ashraf; Imran, 2020).

O diagnóstico precoce da mastite é de extrema importância e visa minimizar perdas econômicas e atender a uma preocupação de saúde pública e de bem estar dos animais. Um diagnóstico rápido e preciso possibilita a detecção precoce da doença e a sua prevenção, além de auxiliar na tomada de decisão quanto ao manejo a ser realizado e as medidas terapêuticas mais adequadas (Sharun *et al.*, 2021).

O objetivo do trabalho foi realizar uma breve revisão bibliográfica sobre a mastite bovina e avaliar se existe correlação estatística entre a intensidade da reação do CMT (traço, uma, duas ou três cruzes) obtidos para cada quarto mamário reagente ao teste, com a ausência ou presença de crescimento de colônias bacterianas em cultivo microbiológico de fazenda. Além disso, avaliar a concordância entre o resultado do diagnóstico obtido da cultura microbiológica em fazenda, da cultura microbiológica laboratorial e da espectrometria de massas, especialmente para agentes do grupo *Estafilococos não aureus*. Dessa forma, se busca incentivar o diagnóstico do agente causador da mastite subclínica utilizando-se de um método barato e possível de ser feito dentro da propriedade, visando realizar um controle mais assertivo da doença.

## 2 MASTITE BOVINA

A mastite bovina é uma inflamação dos tecidos mamários de causa multifatorial e é uma das doenças mais comuns que afeta o setor leiteiro. Dentre as possíveis causas estão incluídos danos físicos, irritação química ou infecção, sendo que a mastite bacteriana é a mais significativa e que ocorre com maior frequência. Por isso, a doença é a razão mais frequente pela qual são utilizados antimicrobianos na fazenda (Ashraf; Imran, 2020).

Sendo uma das doenças mais disseminadas em rebanhos leiteiros, a mastite causa diminuição da saúde do úbere e, conseqüentemente, queda na produção e qualidade do leite resultando em perdas econômicas significativas ao produtor, independentemente de sua apresentação. Existem diversas maneiras de classificar a doença. Conforme a origem do agente, pode ser ambiental ou contagiosa. Já conforme a manifestação dos sinais clínicos, poderá se apresentar como mastite clínica ou subclínica (Cobirka; Tancin; Slama, 2020).

A ocorrência de mastite subclínica é bastante comum quando comparada à mastite clínica, o que resulta em grandes perdas econômicas (Sumon *et al.*, 2020). De acordo com Constable *et al.*, (2017), a mastite subclínica é responsável por cerca de dois terços do total das perdas econômicas causadas por mastite no rebanho e gera grande preocupação, uma vez que não apresenta sinais clínicos visíveis e é mais difícil de ser diagnosticada.

Estima-se que um quarto mamário acometido resulta em redução de 30% da produtividade e que a vaca acometida perde 15% de sua produção na lactação. Também há diminuição de 1% dos sólidos totais presentes no leite. Dessa forma, é possível observar que as perdas econômicas atribuídas às perdas de produção de leite são bastante consideráveis, podendo corresponder a 75% e demonstrado a importância dessa apresentação da doença (Constable *et al.*, 2017).

### 2.1 FATORES DE RISCO

Muitos fatores estão envolvidos na etiologia da mastite. Dentre eles, o agente causador, a vaca e o ambiente. Para infectar o animal, o agente precisa superar os mecanismos de defesa do hospedeiro. No caso da mastite, a maioria dos patógenos acessa a glândula mamária através do canal do teto, que é a barreira mecânica entre o meio externo e o interior do úbere. O local

de permanência das vacas é rico em microbiota e o leite é o substrato ideal para o crescimento de diversas espécies, tornando-se um ambiente favorável ao agente (Benić *et al.*, 2018)

O desenvolvimento da mastite pode ser explicado em três estágios. O primeiro deles é denominado invasão e compreende a fase em que os microrganismos passam do meio externo para as secreções ou o leite encontrado no canal lactífero. O segundo estágio é a infecção e compreende o momento em que os microrganismos adentram o teto e se fixam no tecido mamário iniciando a sua multiplicação e proliferação no parênquima mamário. Por último, o terceiro estágio é chamado de inflamação, e representa a fase em que podem ser notados sinais clínicos típicos de inflamação com graus variados, alterações sistêmicas e anormalidades subclínicas (Constable *et al.*, 2017).

Os fatores de risco associados à ocorrência da mastite podem ser observados a nível de quarto mamário, da vaca e do rebanho. Em relação ao quarto mamário, as características anatômicas dos tetos e do úbere como a integridade da extremidade do teto (barreira primária), danos na pele do úbere e distância da ponta do teto à superfície do chão tem relação com o aparecimento da mastite. Desse modo, vacas com hiperqueratose do orifício do teto e lesões de pele tem maior incidência da doença (Benić *et al.*, 2018).

Quanto aos fatores a nível da vaca, podem ser citados a idade, estágio de lactação, nível de higiene, produção e contagem de células somáticas na lactação anterior. O risco de ocorrência de mastite é maior em animais mantidos em ambientes sujos e em vacas com maior contagem de células somáticas (Benić *et al.*, 2018). A maior parte de novas infecções ocorre na fase inicial do período seco ou nos primeiros dois meses de lactação, principalmente quando se trata de patógenos ambientais (Constable *et al.*, 2017).

Conforme (Santos; Fonseca, 2019), o aparecimento de mastite clínica ambiental no período pós parto é maior em comparação com o restante da lactação devido à redução da capacidade de resposta do sistema imune neste período, demonstrando a importância do estágio da lactação. Quanto à idade, animais jovens tem mecanismos de resposta imune mais eficientes que animais mais velhos, podendo influenciar na ocorrência da mastite. Além disso, de acordo com Constable *et al.*, (2017) a prevalência de quartos infectados aumenta conforme a idade, atingindo o pico por volta dos sete anos.

Em nível de rebanho, destacam-se fatores como manejo nutricional e de ordenha, alojamento e condições de higiene das instalações. A nutrição é fator importante para a saúde da glândula mamária, especialmente os micronutrientes como vitamina E, selênio, cobre, vitamina A e zinco, pois melhoram a capacidade de resposta imune, diminuindo a incidência de mastite (Ladeira, 2023). Além disso, o canal do teto permanece aberto por algumas horas

logo após a ordenha, portanto, ações como fornecer alimento neste momento evitam a exposição direta do teto com o solo, prevenindo a entrada de patógenos pelo canal do teto (Santos; Fonseca, 2017).

A qualidade e o manejo das instalações exercem grande influência sobre os tipos de patógenos que podem afetar a glândula mamária e também sobre o grau da pressão de infecção. Os fatores determinantes nesse processo e que influenciam na qualidade do ambiente são a umidade, o calor, o sistema de alojamento, o tipo de material utilizado para a confecção das camas, higiene e manutenção das camas e instalações (Constable *et al.*, 2017).

O manejo de ordenha também é fator de influência na ocorrência de mastite. Envolve a eficiência dos ordenhadores, o funcionamento da ordenhadeira mecânica, a velocidade de esvaziamento da glândula mamária e, especialmente, a higiene na sala de ordenha (Constable *et al.*, 2017). Durante a ordenha, a ocorrência de inversão de fluxo de leite causada por flutuações de vácuo, queda ou deslizamento de teteiras e a má higiene destas pode predispor a mastite (Benić *et al.*, 2018).

## 2.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Conforme Constable *et al.*, (2017), o custo anual total com a mastite bovina é estimado em 10% do total do valor de venda do leite, sendo que dois terços dessa perda são causados pela redução da produção de leite por vacas afetadas com mastite subclínica. As perdas econômicas se dão pela diminuição acentuada da produção de leite devido à má saúde do úbere, custos com tratamento, descarte de leite e atendimento veterinário, além de descarte e morte precoce de animais. Também ocorrem prejuízos na indústria devido a redução da qualidade do leite e rendimento dos seus derivados (Santos; Fonseca, 2017).

De acordo com as pesquisas, na maioria dos países, a prevalência de patógenos causadores de mastite em rebanhos leiteiros é de 50% das vacas e varia de 10 a 25% dos quartos mamários. Se considerarmos a incidência média anual, calculada pelo número de casos clínicos a cada cem vacas em risco por ano, incluindo período seco, as porcentagens variam de 10 a 12% na maioria dos rebanhos. As taxas de letalidade variam amplamente, de acordo com o microrganismo causador da mastite e a gravidade da doença (Constable *et al.*, 2017).

## 2.3 CLASSIFICAÇÃO DA MASTITE

A mastite pode ser classificada de diversas maneiras, envolvendo diferentes critérios. De acordo com a origem do agente, pode ser classificada em mastite ambiental, causada por microrganismos do ambiente circundante, e em mastite contagiosa, causada pelo leite contagioso de vacas infectadas. Conforme os sinais clínicos, pode ser classificada como clínica ou subclínica (Cobirka; Tancin; Slama, 2020).

### 2.3.1 Origem do Agente

Técnicas microbiológicas permitiram isolar aproximadamente 140 espécies, subespécies e sorovares microbianos da glândula mamária permitindo a identificação de diversos patógenos causadores de mastite. Com base na sua epidemiologia e fisiopatologia, esses agentes têm sido classificados como causadores de mastite ambiental, mastite contagiosa ou ainda patógenos oportunistas da pele do teto (Constable *et al.*, 2017).

#### 2.3.1.1 Origem Ambiental

A mastite ambiental é causada por microrganismos do próprio ambiente em que o animal se encontra. A principal forma com que esses patógenos infectam o úbere é através do canal do teto. O canal do teto pode permanecer aberto por cerca de duas horas após a ordenha, favorecendo a entrada de microrganismos. Além disso, durante o período entre ordenhas, a extremidade do teto está constantemente exposta aos microrganismos do ambiente, especialmente onde há acúmulo de matéria orgânica (esterco, urina, lama) e umidade. Com isso, o desafio de novas infecções é constante (Cobirka; Tancin; Slama, 2020).

As condições do ambiente influenciam fortemente na transmissão desses patógenos para a vaca. Cama úmida, acúmulo de sujidades, ordenha de úberes sujos e molhados, manejo de pré-ordenha inadequado, sistema de alojamento que permitem lesões nos tetos e controle ineficiente de moscas são fatores que podem predispor a vaca ao contágio com agentes ambientais (Constable *et al.*, 2017).

De acordo com Santos; Fonseca, (2019), os agentes relacionados à mastite ambiental são considerados oportunistas, causando mastites transitórias. Apesar disso, possui maior frequência de casos de mastite clínica grave, levando a diminuição abrupta do leite e até a morte em alguns casos. Os principais agentes envolvidos são coliformes e estreptococos ambientais.

Os coliformes são bactérias Gram-negativas que se multiplicam naturalmente no trato gastrointestinal das vacas e na matéria orgânica do ambiente. Apresentam um complexo de lipopolissacarídeo (LPS) na camada externa da parede celular que atua como toxina bacteriana e está diretamente relacionada a patogenicidade e intensidade da resposta imune da vaca. As principais espécies envolvidas são *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.* e *Serratia spp.* Vacas em início de lactação e alta produção tem maior risco de infecções por coliformes (Santos; Fonseca, 2019).

Os estreptococos ambientais são uma das principais causas de mastites em bovinos leiteiros. Estão associados a diversas espécies como *Streptococcus canis*, *Enterococcus spp.*, *Lactococcus* e as mais comuns, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*. Estes microrganismos geralmente causam mastite clínica de natureza leve a moderada, mas também podem causar mastite subclínica crônica com aumento de contagem de células somáticas (CCS) no leite (Constable *et al.*, 2017).

#### 2.3.1.2 Mastite Contagiosa

A ocorrência da mastite contagiosa se dá através da transmissão de patógenos de uma vaca infectada para uma vaca saudável. Os principais agentes causadores da mastite contagiosa são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium spp.* e *Mycoplasma spp.* sendo que, geralmente, as infecções são persistentes e sem sinais clínicos graves. Estes patógenos são bastante adaptados à multiplicação na glândula mamária e, portanto, o seu principal reservatório é o úbere de vacas infectadas (Santos; Fonseca, 2019).

Os agentes contagiosos mais comuns são *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* que tem como principal fonte de infecção a glândula mamária de vacas infectadas, embora as mãos dos ordenhadores possam ser fonte de *S. aureus*. A infecção por *Mycoplasma bovis* é uma causa menos comum de mastite contagiosa. Pode provocar surtos de mastite clínica difíceis de controlar por não responderem à terapia e estão associados à introdução recente de novos animais no rebanho (Constable *et al.*, 2017).

Conforme Santos; Fonseca, (2019) o canal do teto é um dos principais locais de ocorrência de *Corynebacterium bovis*. É um agente de baixa patogenicidade e altamente contagioso que tem sido utilizado como indicador de higiene de ordenha. Quando não realizada desinfecção dos tetos após a ordenha o agente pode ser isolado de mais de 60% dos quartos amostrados.

A transmissão de agentes contagiosos ocorre principalmente no momento da ordenha, a partir de leite contaminado pelas mãos dos ordenhadores, através de toalhas de uso múltiplo para secagem dos tetos ou através da própria máquina de ordenha mal higienizada que atua como reservatório bacteriano ou mal regulada que favorece a entrada dos patógenos pelo canal do teto através de flutuações de vácuo e reversão de fluxo de leite (Sharun *et al.*, 2021).

### **2.3.2 Características Clínicas**

De acordo com a sua manifestação clínica, a mastite pode ser classificada em mastite clínica ou subclínica.

#### **2.3.2.1 Mastite Clínica**

A mastite clínica é caracterizada pela alteração visual do leite como presença de grumos, coágulos, sangue, pus ou leite aquoso e pode ou não estar associada a sinais visuais de inflamação no quarto mamário afetado tais como edema, aumento de temperatura, endurecimento e dor. O animal também pode apresentar sinais sistêmicos como aumento da temperatura retal, diminuição do consumo de alimento e desidratação (Cobirka; Tancin; Slama, 2020).

De acordo com Santos; Fonseca, (2019) a mastite clínica pode ser classificada em três escores quanto à gravidade dos sinais: leve, quando há alteração apenas do leite; moderada, quando apresenta alterações no leite e sinais clínicos no quarto mamário afetado e, por fim, grave, em que além de manifestar os sinais clínicos do escore dois, apresenta sinais clínicos sistêmicos como febre, prostração e desidratação.

Outra maneira de classificar a mastite clínica é em hiperaguda, aguda, subaguda, crônica e gangrenosa. Casos hiperagudos são caracterizados por inflamação intensa com presença de sinais sistêmicos como hipertermia, dispneia, prostração e anorexia, que geralmente estão



associados a infecções por agentes ambientais do grupo dos coliformes. Na forma aguda, há os mesmos sinais presentes na hiperaguda, mas de forma mais discreta e com evolução mais lenta (Ramos *et al.*, 2017).

Ainda conforme (Ramos *et al.*, 2017) a forma subaguda tem como características a presença de grumos e de sinais inflamatórios mais discretos. A forma crônica é caracterizada pela infecção persistente do úbere, perdurando por dias, meses ou anos, podendo causar fibrose e atrofia nos quartos acometidos. Na forma gangrenosa, o quarto mamário afetado encontra-se com a cor alterada, variando do escuro ao púrpura azulado, e sem sensibilidade.

A mastite clínica recorrente se refere a casos em que há cura clínica, mas há reaparecimento dos sinais no mesmo quarto mamário após 14 dias do início do episódio anterior. Os casos de mastite recorrente podem ocorrer por mastite persistente, ou seja, quando há falha no tratamento comprovada pelo isolamento da mesma cepa nas duas ocasiões, ou ainda, um caso novo que é considerado quando os sinais clínicos são causados pela mesma cepa (Alves; Santos, 2020).

#### 2.3.2.2 Mastite Subclínica

A manifestação da mastite na forma subclínica caracteriza-se pela ausência de alterações visíveis a olho nu no leite ou no úbere. Causa queda na produção de leite do quarto afetado, alterações na composição do leite como aumento das proteínas séricas, diminuição na porcentagem de caseína, lactose, cálcio e gordura do leite, além de aumento da contagem de células somáticas (CCS) para um valor superior a 200.000 células/mL de leite (Santos; Fonseca, 2019).

A anormalidade subclínica mais significativa do leite é o aumento da CCS. As células somáticas são compostas principalmente de células epiteliais do úbere e glóbulos brancos, especialmente neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Quando elevadas, podem indicar uma inflamação intramamária (Sumon *et al.*, 2020). De acordo com Constable *et al.*, (2017), em uma glândula mamária lactante saudável, a CCS deve ser inferior a 100.000 células/mL de leite.

A contagem de células somáticas é aumentada principalmente pela ocorrência de mastite subclínica associada a bactérias gram – positivas. Para realizar o monitoramento da prevalência de mastite subclínica no rebanho é possível utilizar a determinação da CCS de amostra de leite de tanque a granel. Além disso, para determinar os patógenos mais prevalentes, pode ser utilizada a cultura microbiológica dessas amostras. Existe uma boa correlação entre a CCS e o

número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Streptococcus* e uma correlação moderada com o número de UFC de *Staphylococcus aureus* (Constable *et al.*, 2017).

De acordo com Kumari; Bhakat; Choudhary, (2018), a maioria dos casos de mastite subclínica são causados por espécies dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* além de Coliformes e *Actinomyces pyogenes*. Corroborando com esta informação, Birhanu *et al.*, (2017), em seu estudo de prevalência e isolamento das principais causas da mastite subclínica na Etiópia, acabou isolando principalmente *Staphylococcus aureus*, bactérias do gênero *Streptococcus* e *Escherichia coli*.

No Brasil, uma revisão sistemática desenvolvida por (Ito Eleodoro; Fagnani, 2022) com a finalidade de investigar os agentes mais frequentemente associados à mastite subclínica em vacas leiteiras, elencou os três microrganismos que mais aparecem nesses casos. O patógeno mais frequentemente relatado, com prevalência combinada de 49%, foi Estafilococos. Os *Streptococcus* spp. aparecem como o segundo grupo mais importante, sendo que as espécies mais frequentemente isoladas são *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, e *Streptococcus dysgalactiae*. Em terceiro, aparece a *Corynebacterium* spp., sendo *C. bovis* a espécie mais isolada.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* spp., possuem grande importância na etiologia das infecções intramamárias. Para o diagnóstico da mastite, geralmente são diferenciadas as espécies de Estafilococos coagulase positiva e negativa de acordo com a capacidade de coagular o plasma de coelho. Nesse sentido, aquelas capazes de realizar a coagulação são consideradas coagulase positivas e tem como principal representante do grupo o *Staphylococcus aureus*. Já as bactérias com reação negativa na prova de coagulase, são identificadas como Estafilococos coagulase negativa (Silva; Rizzo, 2019).

O termo “coagulase negativa” também é utilizado para diferenciar as espécies de *Staphylococcus* em *Staphylococcus aureus* (coagulase positiva) e em bactérias Estafilococos não aureus (ENA), já que a maioria dos agentes desse grupo é coagulase negativa. Os ENA representam um dos grupos de bactérias com maior prevalência nos isolados de vacas com mastite e é considerado bastante heterogêneo, com espécies associadas às vacas, espécies oportunistas e outras ambientais (Santos; Fonseca, 2019).

Em estudos realizados por Tomazi *et al.* (2015), a principal espécie do grupo dos Estafilococos não aureus isolada em casos de mastite é *Staphylococcus chromogenes*, chegando a valores próximos de 75% dos isolamentos. A mastite subclínica causada por ENA não causa alteração da produção e nem na composição do leite, no entanto, a CCS dos quartos infectados é cinco vezes maior que a observada em quartos saudáveis. De acordo Santos; Fonseca, (2019),

a mastite causada por ENA tem altas taxas de cura espontânea e responde bem aos tratamentos antimicrobianos.

*Staphylococcus* coagulase negativa são parte da microbiota natural da pele dos bovinos, e são considerados de baixa patogenicidade podendo ser observados com certa frequência em casos de mastites subclínicas, resultando em aumento da CCS. São frequentemente isolados de casos de mastite em vacas no período pré-parto, mas também podem infectar novilhas, aumentando a ocorrência em primíparas (Silva; Rizzo, 2019).

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva formadora de aglomerados de pequenos cocos, catalase positiva e coagulase positiva. É um dos principais agentes causadores de mastite em vacas leiteiras no mundo, atingindo prevalências que variam de 5-18% entre vacas e 30-85% em rebanhos. Considerado um agente não obrigatório do úbere, pode colonizar o canal do teto, a glândula mamária ou a pele, sobretudo lesões de extremidade do teto (Santos; Fonseca, 2019).

O *S. aureus* é classificado como um patógeno contagioso de mastite bovina sendo transmitido através do contato de vacas sadias com teteiras contaminadas após a ordenha de vacas infectadas, toalhas de uso múltiplo, mãos dos ordenhadores e outras potenciais fontes como pele da vaca e dos ordenhadores, lesões de tetos e moscas (Santos; Fonseca, 2019).

Infecções por *Staphylococcus aureus* são, geralmente, persistentes e subclínicas, e são um grande desafio na produção leiteira. O patógeno possui a capacidade de criar micro abscessos que fazem com que os antimicrobianos tenham dificuldade de atingi-lo, levando a uma baixa taxa de cura por antimicrobianos durante a lactação e a tendência de se tornarem infecções crônicas. Além disso, o agente causa danos permanentes ao tecido secretor diminuindo a capacidade de produção da vaca. Com isso, é frequentemente necessário o descarte dos animais afetados (Cobirka; Tancin; Slama, 2020).

*S. aureus* é considerado um patógeno de difícil controle nas propriedades. Isso ocorre devido à dificuldade de diagnosticar todas as vacas infectadas do rebanho, a sua diversidade de reservatório, a sua característica de causar infecções de longa duração ou cronicidade aumentando a chance de contágio de novos animais e a sua alta resistência aos antimicrobianos e conseqüente baixa taxa de cura (Santos; Fonseca, 2019).

Os Estreptococos que causam a mastite bovina podem ser divididos em espécies contagiosas como é o caso do *S. agalactiae* e ambientais como *S. uberis*, e *S. dysgalactiae*, por exemplo, que possuem maior capacidade de sobreviver e se desenvolver em sítio extra mamário. Estes agentes contribuem de forma significativa para as altas contagens totais de bactérias no leite do rebanho (Santos *et al.*, 2018).

*Streptococcus agalactiae* é uma bactéria Gram-positiva formadora de cadeias de cocos, catalase negativa e reação positiva ao teste CAMP. A identificação de animais infectados pode ser feita através de cultura microbiológica de uma única amostra apresentando alta sensibilidade e especificidade. Como o principal reservatório desse patógenos é o próprio úbere da vaca infectada é possível erradicar o agente do rebanho por meio de identificação, tratamento ou descarte de vacas infectadas. A taxa de cura com uso de antimicrobianos a base de beta-lactâmicos é elevada (Santos; Fonseca, 2019).

A transmissão se dá através do contato de quartos mamários saudáveis com fômites contendo leite infectado, portanto, o momento da ordenha é um dos fatores de risco. Altas prevalências desse agente no rebanho indicam falhas no manejo e higiene da ordenha. A infecção causada por *S. agalactiae* também está relacionada com a elevada contagem de células somáticas no leite das vacas e do rebanho, conseqüentemente. Contagens superiores a 1.000.000 de células/mL podem ser registradas (Cobirka; Tancin; Slama, 2020; Santos *et al.*, 2018).

*S. uberis* é uma bactéria aeróbia, Gram-positiva e formadora de cadeias de cocos, catalase negativa e reação ao teste CAMP variável. Esse agente ambiental que possui alta variabilidade genética, com algumas cepas adaptadas à glândula mamária e outras não. O ideal é realizar cultura microbiológica através da seleção de vacas com alta CCS para identificação da presença do agente (Santos; Fonseca, 2019).

De acordo com Cobirka; Tancin; Slama, (2020), a maioria das infecções por *S. uberis* ocorre durante o período seco e são subclínicas, podendo evoluir para casos agudos na lactação subsequente. Santos; Fonseca, (2019) afirmam que a taxa de infecções é maior durante as duas primeiras semanas após a secagem e nas duas semanas pré-parto. Já durante a lactação, os primeiros 75 dias pós parto são os mais críticos para a infecção.

Acredita-se que a eliminação fecal do *S. uberis* tenha um papel importante na manutenção do agente nas fazendas, podendo tornar camas mal manejadas e até a própria pastagem uma fonte de contaminação persistente. A infecção ocorre geralmente no período entre as ordenhas, por isso, a desinfecção, a limpeza, a renovação do material da cama e a remoção do esterco auxiliam no controle desse patógeno (Cobirka; Tancin; Slama, 2020; Constable *et al.*, 2017).

O *S. dysgalactiae* é uma bactéria aeróbia e Gram-positiva formadora de cadeias de cocos, catalase negativa e CAMP negativo. Pode causar tanto a manifestação clínica da doença quanto a subclínica, sendo que vacas infectadas apresentam elevada CCS. Pode ser encontrada no ambiente da vaca e também em amígdalas, vagina, boca e glândulas mamárias. A

manutenção do agente pode estar envolvida também com o seu isolamento de moscas como da espécie *Hydrotoea irritans* (Constable *et al.*, 2017; Santos; Fonseca, 2019).

A *Corynebacterium bovis* é uma bactéria Gram-positiva com a forma de bacilo, catalase positiva não formadora de esporos e de crescimento lento. É uma das causas mais frequentes de mastite podendo chegar de 20-30% dos casos, o que pode ser explicado pelo fato de ter baixa patogenicidade e ser altamente contagiosa. É detectada principalmente na forma subclínica da doença sendo que taxas elevadas de isolamento dessa bactéria são relacionadas à limpeza dos tetos, principalmente ao *pós dipping*, uma vez que o canal do teto é um dos principais locais de ocorrência desse agente (Ito Eleodoro; Fagnani, 2022; Santos; Fonseca, 2019).

## 2.4 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Uma vez que é definida como a inflamação da glândula mamária, a mastite é diagnosticada com base na medição da resposta inflamatória. Já a infecção intramamária, causa mais comum de mastite, é diagnosticada com base na identificação do agente infeccioso que desencadeou a doença. Não há um método diagnóstico capaz de definir ambas, embora os métodos usados para definir inflamação da glândula mamária sejam utilizados como método indireto para identificar vacas com infecção intramamária (Adkins; Middleton, 2018).

Um programa de diagnóstico eficiente requer a detecção precoce da infecção seguida da identificação do agente. Assim, podem ser introduzidas medidas de prevenção e controle eficientes visando reduzir os custos, as perdas na produção e qualidade do leite e aumentar a taxa de cura dos animais infectados. Além disso, o consequente tratamento precoce pode diminuir a gravidade da doença contribuindo para melhorar o bem estar dos animais e minimizando perdas (Tommasoni *et al.*, 2023).

O produtor geralmente tem facilidade em detectar casos de mastite clínica, pois as alterações clínicas tanto da vaca quanto do leite são evidentes. Já no caso da mastite subclínica, que ocorre mais frequentemente em relação à mastite clínica, a detecção torna-se um desafio, pois na maioria dos casos não apresenta qualquer sinal clínico visível. Para o monitoramento e diagnóstico da mastite no rebanho, foram adaptados vários métodos para uso tanto no campo, quanto em laboratório (Benic *et al.*, 2018).

### 2.4.1 Teste da Caneca de Fundo Preto

A mastite clínica manifesta-se pela presença de alterações no leite tais como grumos ou coágulos, pus, sangue ou leite aquoso. Essas características podem ser observadas ao realizar o teste da caneca de fundo preto ou telado. Esse teste deve ser realizado na rotina de ordenha imediatamente antes da colocação das teteiras e consiste na retirada dos primeiros jatos de leite em uma superfície escura ou telada de uma caneca, ou ainda, diretamente no piso da sala de ordenha, desde que haja boa iluminação e condições de visualização (Santos; Fonseca, 2019).

Além do teste da caneca, para detectar a mastite clínica no momento da ordenha, é possível fazer o exame da vaca e do úbere buscando sinais como dor, endurecimento do quarto mamário, edema ou inchaço, hipertermia, redução de consumo, atitude alterada ou desidratação. A partir disso, é possível inferir sobre a gravidade do caso de mastite, classificando em escore leve, moderado ou grave e tomar a decisão sobre a melhor forma de tratamento (Maiochi; Rodrigues; Wosiacki, 2019).

### 2.4.2 Contagem de Células Somáticas (CCS)

A contagem de células somáticas tem sido aceita e utilizada como forma de identificar inflamação da glândula mamária lactante, especialmente quando se trata de mastite subclínica. Amostras de quartos mamários com até 100.000 células/mL, das quais não seja isolado nenhum microrganismo e que não tenha histórico de infecções recentes são considerados saudáveis. Já amostras com mais de 200.000 células/mL podem indicar uma resposta inflamatória e provavelmente estão infectadas (Petzer *et al.*, 2017).

Para realizar o acompanhamento da saúde geral do rebanho, é possível fazer o monitoramento da contagem de células somáticas de tanque (CCST). Geralmente, os produtores possuem acesso facilitado a essa informação, pois a maioria dos laticínios tem como rotina coletar amostras mensais de leite para determinação da CCS, variando de uma a quatro amostras (Santos; Fonseca, 2019).

Esse processo é feito com a finalidade de cumprimento da INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 77, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018 - Imprensa Nacional, que, no caso da contagem de células somáticas de leite refrigerado cru, exige média aritmética máxima de

500.000 células/mL de leite no período de três meses ininterruptos e com no mínimo uma amostra mensal de cada tanque (Nacional, 2018).

A CCST é um método indireto de estimar a prevalência de mastite no rebanho leiteiro. Normalmente, a CCS é aumentada pela existência de casos de mastite subclínica associados a infecções intramamárias causadas por bactérias gram positivas. Apesar de não ser possível definir o número de vacas com mastite, o número de quartos afetados e as perdas de produção conforme o valor da CCST podem ser estimadas e são descritas na tabela 1 (Constable *et al.*, 2017). De acordo com Santos; Fonseca, (2019), o valor de CCST acima de 200.000 células/mL indica alta prevalência de mastite subclínica no rebanho.

A CCST representa a estimativa da média ponderada da CCS individual das vacas. Ela irá apresentar uma correlação não linear com a prevalência de mastite subclínica no rebanho, no entanto, pode subestimar a sua real prevalência quando vacas em tratamento de mastite clínica e com mastite crônicas são ordenhadas separadamente e este leite não é enviado para o mesmo tanque. Um valor de CCST acima de 200.000 células/mL indica alta prevalência de mastite subclínica no rebanho e as perdas de produção estimadas, associadas a CCST podem ser vistas na tabela 1 (Santos; Fonseca, 2019).

Tabela 1 – Prevalência da infecção e perdas de produção de leite estimadas, associadas à contagem de células somáticas no tanque de resfriamento.

<b>Contagem das Células somáticas do leite no tanque de resfriamento (células/mL)</b>	<b>Quartos infectados no rebanho (%)</b>	<b>Perda de Produção (%)</b>
200.000	6	0
500.000	16	6
1.000.000	32	18
1.500.000	48	29

Fonte: Adaptado de Constable, 2017.

A prevalência da mastite subclínica varia de acordo com a incidência e duração das infecções. Por isso, é essencial implementar uma rotina de controle mensal da CCS individual de todas as vacas. Existem diversas formas de estimar a contagem de células somáticas de cada indivíduo, com métodos a nível laboratorial ou que podem ser realizados na fazenda e com diferentes níveis confiabilidade e custo (Santos; Fonseca, 2019).

Em ambiente laboratorial, a CCS pode ser medida utilizando microscopia direta ou com uso de contadores eletrônicos de células automatizados. Na microscopia direta, um volume de

leite específico é alocado em uma área calibrada de uma lâmina microscópica. Após a secagem do leite, a lâmina é corada e as células visíveis são contadas dentro da área definida. Já os contadores eletrônicos automatizados são frequentemente baseados em sistemas de citometria de fluxo, realizando a contagem de forma rápida e fácil. Alguns tipos de contadores portáteis também estão disponíveis e podem ser usados tanto em laboratório quanto a campo (Adkins; Middleton, 2018).

A nível de fazenda, são estudados e avaliados outros métodos de contar ou de se aproximar do valor de CCS individual da vaca ou quartos mamários. O *California Mastitis Test* (CMT) por exemplo, é um teste qualitativo que se baseia na alteração da viscosidade da reação do leite quando adicionado o reagente. Já o *Wisconsin Mastitis Test* (WMT) é uma modificação do CMT feita para aumentar a objetividade da medição da viscosidade e tem uma versão adaptada para realização em fazenda que fornece uma medição semiquantitativa da CCS (Adkins; Middleton, 2018).

### **2.4.3 *California Mastitis Test* (CMT)**

O *California Mastitis Test* (CMT) é um método rápido, prático e barato para diagnosticar a mastite subclínica na fazenda. É um método de fácil execução e avaliação que permite realizar, de forma indireta, a contagem de células somáticas através da viscosidade da reação entre a amostra de leite e o reagente. O reagente é um detergente aniônico que rompe o citoplasma e o núcleo das células, liberando o material genético no meio. Os ácidos nucleicos, ao interagirem com o detergente, formam um gel que modifica a viscosidade da mistura. Portanto, quanto mais significativa a viscosidade, maior a contagem de células somáticas (Maiochi; Rodrigues; Wosiacki, 2019).

Geralmente, o CMT é realizado após o teste da caneca de fundo escuro e a retirada dos primeiros jatos de leite na ordenha. O recomendado é que a amostra contida na raquete de teste tenha partes iguais de leite e de reagente, ou seja, aproximadamente 2mL de cada. Em seguida deve ser agitada em movimentos circulares e observada a viscosidade da reação. De acordo com o grau de gelatinização, a viscosidade pode ser classificada em uma escala de cinco níveis que irão corresponder a um valor aproximado de CCS, como pode ser observado no tabela 2 (Maiochi; Rodrigues; Wosiacki, 2019).



Tabela 2 – Relação entre os resultados do *California Mastitis Test* (CMT) e valores aproximados de contagens de células somáticas correspondentes.

<b>Escore</b>	<b>Reação/Viscosidade</b>	<b>Células Somáticas por mL</b>
0	Ausente	0 a 200.000
Traços	Leve	150.000 a 500.000
+	Leve/Moderada	400.000 a 1.500.000
++	Moderada	800.000 a 5.000.000
+++	Intensa	>5.000.000

Fonte: Adaptado de Santos e Fonseca, 2019.

A característica da reação observada no escore “zero” é a permanência da mistura líquida, sem espessamento ou formação de gel. Já no escore “traços” observa-se ligeira formação de gel, mais perceptível quando a raquete é balançada de um lado para o outro. No escore “+” uma substância viscosa distinta é observada imediatamente após a mistura das soluções, e pode se dissipar com o tempo. Quando feitos movimentos de rotação com o suporte, o fluido não forma uma massa periférica e a superfície da solução não se torna convexa. O escore “++” há formação de uma substância viscosa imediatamente após a mistura das soluções e quando feitos movimentos de rotação com o suporte, a substância forma uma massa periférica e o topo do recipiente fica exposto. No escore “+++” é semelhante, no entanto, quando feitos movimentos de rotação com o suporte, a superfície da solução torna-se convexa (Constable *et al.*, 2017).

#### 2.4.4 Condutividade Elétrica

A mastite é caracterizada pela inflamação da glândula mamária, logo, gera diversas alterações na composição e nas características físico químicas do leite. Essas mudanças são atribuídas a mudança de permeabilidade vascular causada pelo processo inflamatório, lesões no epitélio responsável pela síntese de componentes do leite e microrganismos presentes na glândula mamária (Maiochi; Rodrigues; Wosiacki, 2019).

A lactose é um dos componentes do leite que pode reduzir em aproximadamente 10% quando comparado ao leite de uma vaca saudável. Essa redução gera um desequilíbrio osmótico do leite em relação ao sangue que resulta em uma tentativa de compensação que permite a passagem de íons de sódio e cloreto do sangue para o leite (Maiochi; Rodrigues; Wosiacki, 2019).

De acordo com a sua natureza, as substâncias favorecem ou não a passagem da corrente elétrica. Os íons são os principais componentes condutores de eletricidade, logo, a corrente elétrica flui mais facilmente em um leite com mastite quando comparado a um leite saudável, devido ao aumento das concentrações dos íons sódio e cloreto e à redução de potássio e lactose. Dessa forma, a medição da condutividade elétrica pode auxiliar na identificação precoce da mastite (Ferrero; Valledor; Campo, 2014; Maiochi; Rodrigues; Wosiacki, 2019).

O leite saudável possui uma condutividade elétrica de 4,0 e 6,0 mS/cm, já a condutividade medida está com valor extremo de 6,5-13,00 mS/cm a uma temperatura de 18 °C, é um indicativo de leite mastítico. Doenças não relacionadas ao úbere como problemas do metabolismo, mudanças na dieta e a raça do animal podem influenciar na condutividade elétrica, no entanto, tem menor influência. Desse modo, a condutividade elétrica pode ser usada para combater a mastite subclínica e otimizar a produção (Ferrero; Valledor; Campo, 2014).

Existem vários instrumentos portáteis que se baseiam na medição da condutividade elétrica para a detecção da mastite subclínica, como por exemplo o MASTITRON LF 3000, detector de mastite DRAMINSK ou Milk Checker N-4L. Robôs de ordenha para monitoramento também aumentaram significativamente nos últimos anos (Ferrero; Valledor; Campo, 2014).

#### **2.4.5 Cultura Microbiológica**

A cultura microbiológica de amostras de leite é considerada padrão ouro para diagnóstico de infecções intramamárias e é vista como uma etapa indispensável na identificação dos agentes causadores da mastite. As metodologias de cultura microbiológicas geralmente são de baixo custo e fácil de serem executadas, desde que sejam realizadas por profissionais capacitados e com procedimentos microbiológicos padronizados (Santos; Fonseca, 2019).

A acurácia dos resultados da cultura microbiológica é altamente dependente de uma boa coleta de amostras de leite. As amostras devem coletadas, manuseadas e transportadas de forma correta, para que seja evitada a contaminação das amostras e um posterior falso-positivo no resultado. Os pelos e a pele do teto, as mãos do indivíduo que realiza a coleta e o ambiente em que a coleta é realizada são potenciais fontes de contaminação que devem receber devida atenção (Santos; Fonseca, 2019).

O procedimento de coleta deve ser iniciado pelo uso de luvas e identificação do tubo de coleta, seguido da higienização dos tetos, retirada e descarte dos primeiros jatos de leite e

observação de possíveis sinais de mastite clínica. Após isso, é feito uso do *pré-dipping*, realizada a secagem do teto e higienizada a sua extremidade com algodão ou gaze contendo álcool 70%. Em seguida é realizada a coleta dos jatos de leite da amostra, evitando sempre que a extremidade do teto toque o tubo (National Mastitis Concil, 2017).

As amostras devem ser armazenadas imediatamente em recipiente refrigerado e aquelas que serão cultivadas em mais de 24 a 48h devem ser congeladas (-20°C). As amostras devem ser enviadas envoltas em um saco plástico e em recipiente refrigerado. Para cultivo de rotina, as amostras geralmente são inoculadas em placas de ágar sangue e incubadas em posição invertida a 37°C durante 24 a 48h. Em seguida, é realizada coloração de Gram de colônias isoladas e demais protocolos bioquímicos para interpretação do resultado (National Mastitis Concil, 2017).

Há certas limitações quanto ao uso da cultura microbiológica laboratorial como a logística, o custo de envio das amostras ao laboratório, e o tempo para que as análises sejam feitas e se obtenha um resultando, dificultando a tomada de decisão quanto ao tratamento. Por isso, foram desenvolvidos programas de cultura microbiológica na fazenda (*Onfarm Culture*) que possibilitam o resultado em 18 a 24 horas (Santos; Fonseca, 2019).

Embora não tenha capacidade de substituir o diagnóstico laboratorial, quando realizados de maneira correta, os programas de cultura microbiológica na fazenda possuem uma precisão de aproximadamente 80% para identificação dos agentes patogênicos causadores de mastite. A maioria dos programas *Onfarm Culture* utiliza um ou mais meio seletivos para promover o crescimento de certas classes de microrganismos (National Mastitis Concil, 2017).

Segundo Santos; Fonseca, (2019), os meios de cultura mais utilizados nos programas de cultura na fazenda são: meio de cultura não seletivo (Ágar sangue), que permite o crescimento de qualquer microrganismo aeróbio presente no leite e é útil para identificar a presença ou não de agentes da mastite; as biplacas (Ágar sangue e MacConkey), que contém um meio não seletivo e um meio seletivo para bactérias Gram-negativas, e por fim, os meios cromogênicos seletivos que possibilitam a identificação rápida de patógenos obtido a partir da ausência ou presença de crescimento em determinada seção da placa e a coloração das colônias, de acordo com as instruções de cada fabricante.

#### 2.4.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As técnicas de diagnóstico baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) identificam os agentes causadores de mastite por meio da amplificação de sequências de DNA específicas desses patógenos (Santos; Fonseca, 2019). É um método que tem sido eficaz na identificação da grande variedade dos causadores tanto da mastite clínica quanto da mastite subclínica (Chakraborty *et al.*, 2019).

A PCR é considerada um método diagnóstico de alta sensibilidade, já que é capaz de detectar uma única molécula de DNA até mesmo de amostras que possuem crescimento bacteriano em cultura inibido ou insuficiente (Duarte *et al.*, 2015). A PCR pode ser aplicada em amostras de leite trimestrais, agrupadas e do granel, mas a sensibilidade e especificidade é maior quando utilizada em amostras de leite do quarto mamário individualmente (El-Sayed *et al.*, 2017).

Inicialmente, essa técnica consiste na extração de DNA das amostras de modo que haja simultânea eliminação de inibidores de reação, como células somáticas. Em seguida, são adicionadas enzimas termoestáveis e oligonucleotídeos iniciadores, também denominados de *primers*, que são exclusivos e que se ligam de modo específico a uma sequência alvo de DNA previamente definida. Os *primers* permitem a amplificação e quantificação de certas sequências e, de acordo com a escolha, eles podem diferenciar membros da mesma espécie ou a nível de subespécie (El-Sayed *et al.*, 2017).

Algumas melhorias na PCR tradicional foram desenvolvidas ao longo do tempo como, por exemplo, a PCR multiplex que é um sistema em que muitos pares de *primers* são adicionados na reação, permitindo a detecção simultânea de genes diferentes. Essa técnica reduz o custo por amostra quando há diferentes patógenos ou para pesquisa de diferentes genes de virulência na mesma amostra. No entanto, há limitações no número de amostras que podem ser amplificadas e pode haver aumento de custos diretos dependendo da necessidade de métodos secundários nesse processo (Duarte; Freitas; Bexiga, 2015; El-Sayed *et al.*, 2017).

Outra variação da técnica é a PCR em tempo real (RT-PCR) que possui outras vantagens em relação à PCR convencional e a cultura bacteriana. É mais rápido e mais seguro para os trabalhadores e para o meio ambiente, possui melhor visualização e digitalização dos resultados e tem sensibilidade e especificidade muito próximos a 100%. Além disso, é um método que pode ser utilizado para a quantificação dos patógenos do leite infectado por meio da medição da intensidade da fluorescência produzida pela reação (El-Sayed *et al.*, 2017).

A utilização do método de PCR tem sido voltada, principalmente, para o diagnóstico de patógenos com limitações de identificação pelos métodos convencionais e pela maior rapidez do diagnóstico. Após cerca de quatro horas da chegada das amostras ao laboratório, é possível obter um resultado de diagnóstico altamente sensível e específico. No entanto, se destaca o cuidado na interpretação, pois o método identifica o DNA tanto de bactérias vivas quanto mortas, e a presença do DNA não é garantia da ocorrência de infecção intramamária (Santos; Fonseca, 2019).

#### **2.4.7 Espectrometria de Massa (MALDI-TOF)**

A espectrometria de massas é uma técnica de diagnóstico que se baseia na identificação de compostos químicos através da determinação de suas massas moleculares na forma iônica. Uma fonte de íons ioniza as moléculas, enquanto que analisadores de massa separam os íons de acordo com a relação massa/carga através de campos elétricos e magnéticos (Santos; Fonseca, 2019).

Dependendo da sua massa e carga, cada partícula leva um determinado tempo para chegar ao detector. Após todas as proteínas da amostra serem detectadas pelo espectrômetro de massa, uma impressão digital única de cada organismo é produzida. A identificação do microrganismo é feita por um *software* que compara o perfil espectral da amostra pesquisada com o banco de dados de referência (Dingle; Butler-Wu, 2013).

A espectrometria de massas com fonte de ionização a laser (MALDI-TOF) é a técnica mais utilizada na detecção de microrganismos. Ela permite diferenciá-los de acordo com seu perfil ribossomal. Esse método é baseado na ionização branda que possibilita a dessorção branda de peptídeos e proteínas ribossomais a partir de colônias bacterianas. Os íons são separados e detectados conforme a sua massa e carga sendo, posteriormente, identificados comparando o espectro de massas obtido com o banco de dados de programas computacionais (Santos; Fonseca, 2019).

Para uso no diagnóstico de agentes causadores de mastite, inicialmente é preciso realizar a cultura microbiológica das amostras de leite em meios de cultura convencionais e incubar por vinte e quatro horas. Em seguida, as colônias bacterianas que cresceram podem ser transferidas para o equipamento de MALDI-TOF que irá realizar a identificação tanto do gênero, quanto da espécie em aproximadamente 60 segundos (Santos; Fonseca, 2019).

Os métodos moleculares tradicionais, assim como o MALDI-TOF, necessitam de uma cultura microbiológica para identificação dos microrganismos, o que pode levar de 24 a 48h. No entanto, enquanto os métodos tradicionais requerem inúmeros testes bioquímicos e reincubação para obter a identificação, o MALDI-TOF identifica os agentes em uma única análise de forma mais rápida e precisa a nível de gênero e espécie demonstrando vantagem quanto a isso (Hulland; Dufour; Munoz, 2018).

Microrganismos que não crescem em meios de cultura comuns não podem ser identificados pelo MALDI-TOF, limitando o teste nesse sentido. Além disso, esse método depende fortemente das informações adicionadas às bases de dados. A base de dados para utilização desse método diagnóstico ainda tem potencial de expansão e é favorecido pela capacidade de compartilhamento que possui (Hulland; Dufour; Munoz, 2018).

## 2.5 TRATAMENTO

O controle da mastite é baseado na prevenção de casos novos e na identificação e eliminação de casos já existentes da doença. A mastite clínica é facilmente detectada por meio da observação dos sinais da resposta inflamatória causada pela infecção intramamária. Sua apresentação e gravidade variam de acordo com as características dos patógenos e com a capacidade de resposta inflamatória da vaca. Já a mastite subclínica necessita de métodos mais elaborados de diagnóstico e seu tratamento ocorre, geralmente, no período seco (Ruegg, 2018; Santos; Fonseca, 2019).

Em rebanhos leiteiros bem manejados e com mastite contagiosa bem controlada, a mastite clínica é causada principalmente por patógenos oportunistas ambientais. As culturas bacterianas demonstram que a ausência de crescimento é o resultado mais comumente encontrado (44%), seguido de estreptococos ambientais (25%) e coliformes (12%) Santos; Fonseca, 2019). De acordo com (Ruegg, 2018), cerca de 85% das mastites clínicas apresentam sinais leves e moderados, sendo classificadas como mastites não graves. Casos graves com sinais sistêmicos são menos comuns, mas são considerados emergências médicas.

Após a identificação da mastite clínica e a classificação em leve, moderada ou grave é possível dar início a um protocolo de tratamento. Em casos graves, o tratamento deve ser iniciado imediatamente com uso de antibioticoterapia, de acordo com os sinais clínicos. Já casos leves e moderados não necessitam de tratamento imediato com antimicrobianos, podendo ser

avaliada a necessidade de seu uso dependendo do histórico do animal e agente causador (Santos; Fonseca, 2019).

Ainda de acordo com Santos; Fonseca, (2019), as mastites graves são causadas principalmente por bactérias Gram-negativas e os sinais clínicos estão associados com os efeitos da endotoxina lipopolissacarídica que é liberada da parede bacteriana após sua morte. A mastite clínica grave deve ser tratada com fluidoterapia priorizando a reidratação da vaca, anti-inflamatórios não esteroidais buscando aliviar os sinais de inflamação exacerbados como dor, febre e desconforto e antimicrobianos injetáveis com espectro para Gram-negativas por 3-5 dias, pois nesses casos, 40% dos animais apresentam bacteremia.

Em casos de mastite com grau leve a moderado, deve-se avaliar a necessidade do tratamento com uso de antibiótico de acordo com a idade, o período de lactação, o histórico de casos, a CCS e o isolamento dos agentes, principalmente não curáveis. Vacas com baixas chances de cura podem ser ordenhadas separadamente, destinadas à secagem do quarto afetado ou descartadas. Nos casos em que há indicação de tratamento com antibiótico, o protocolo recomendado é o tratamento seletivo baseado na cultura microbiológica (Santos; Fonseca, 2019).

É recomendado o uso de antimicrobianos durante a lactação apenas em casos clínicos da doença provocados por agentes que possuem boa resposta à terapia com antimicrobianos. Quando há isolamento de bactérias Gram-positivas, por exemplo, o uso de antimicrobianos é recomendado. No entanto, para resultados de isolamento negativos ou de bactérias Gram-negativas, o tratamento poderá ser realizado apenas com anti-inflamatório não esteroidal e observação. Quando não há possibilidade de realização de cultura é recomendado uso de antimicrobianos logo após o diagnóstico através do teste da caneca de fundo escuro (Santos; Fonseca, 2019).

Sabe-se que alguns patógenos são altamente resistentes aos antimicrobianos e possuem baixas chances de cura como leveduras, *Prototheca spp.*, *Nocardia spp.*, *Serratia spp.* e *Mycoplasma spp.* Já a mastite leve causada por *E. coli* possui cura bacteriológica espontânea alta (85%) e casos com crescimento negativo em cultura apresentam alta taxa de cura espontânea (75-85%). Portanto, nesses casos, o uso de antimicrobianos é dispensável. No entanto, há bactérias como *S. agalactiae* que possui uma taxa de cura próxima de 100% com uso de antimicrobianos sendo, nesse caso, recomendado o uso (Ruegg, 2018).

Conforme estudo realizado por Vasquez *et al.*, (2017) caso fosse realizado uso de tratamento seletivo, mais de 65% das vacas com mastite clínica leve e moderadas não precisariam ter sido tratadas com uso de antibiótico. O tratamento seletivo da mastite clínica

pode representar uma oportunidade para reduzir o uso de antimicrobianos em fazendas leiteiras sem prejudicar a eficácia do tratamento ou a saúde e produção da vaca. Além disso, reduz gastos com a compra de medicamentos e garante melhorias no âmbito de saúde pública.

Ao contrário da mastite clínica, o leite de vacas com mastite subclínica (acima de 200.000 células/mL de leite) pode ser comercializado, apesar de ter menor volume, menor valor e representar possíveis perdas para a indústria. Com isso, para o produtor, o tratamento de todos os casos de mastite subclínica durante a lactação se torna economicamente inviável. Após a realização de CCS individual e cultura microbiológica, a principal recomendação para o tratamento de mastites subclínicas durante a lactação são as mastites causadas por *S. agalactiae*, buscando reduzir a CCS de tanque (Santos; Fonseca, 2019).

O tratamento de vaca seca é a infusão intramamária de antimicrobianos de longa ação em cada quarto mamário após a última ordenha e é uma ferramenta importante na eliminação de infecções já existentes e na prevenção de novas infecções durante o período seco. O uso de antimicrobianos de longa ação em vacas com alto CCS na secagem promovem maior cura de infecções subclínicas, melhorando a saúde do úbere dessas vacas. Em vacas com baixo CCS o uso de selantes deve ser considerado, visando o controle de mastites ambientais (Bradley; Green, 2004).



### 3 ARTIGO

**Correlação entre a intensidade de reação do *California Mastitis Test* (CMT) e o crescimento em cultura microbiológica e avaliação da concordância entre diferentes métodos de diagnóstico em culturas negativas e positivas e para *Estafilococos não aureus***

**Correlation between the Intensity of California Mastitis Test (CMT) Reaction and Growth in Microbiological Culture, and Agreement Between Different Diagnostic Methods in Negative and Positive Cultures for Non-aureus Staphylococci**

**Andressa Braatz Port<sup>1</sup>, Gustavo Potrich Marchioretto<sup>2</sup>, Monique Tomazele Rovani<sup>3</sup>,  
André Gustavo Cabrera Dalto<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Graduanda em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre- RS Brasil.

<sup>2</sup> Pós-Graduando em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre- RS Brasil.

<sup>3</sup> Professor Departamento de Medicina Animal, Setor de Grandes Ruminantes, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre- RS Brasil.

#### RESUMO

A mastite é uma inflamação de origem multifatorial causada mais frequentemente por agentes de origem bacteriana. Quando comparada à mastite clínica, a mastite subclínica é mais comum, gerando altas perdas econômicas e na qualidade do leite. O objetivo deste trabalho foi avaliar a correlação estatística entre a intensidade da reação do *California Mastitis Test* (CMT) em cada quarto mamário reagente ao teste, com o resultado do cultivo microbiológico de fazenda. Além disso, avaliar a concordância entre o resultado da cultura microbiológica em fazenda, da cultura microbiológica laboratorial e da espectrometria de massas. No experimento um, foram selecionadas vacas com aumento abrupto da contagem de células somáticas (CCS) acima de 200.000 células/mL de leite e realizado o CMT, registrando a intensidade de reação (negativo, traço, uma, duas ou três cruces). Foram coletadas amostras dos quartos reagentes e realizado cultivo microbiológico em fazenda, avaliando o crescimento em 24h. No segundo experimento, amostras negativas e positivas para agentes do grupo *Estafilococos não aureus* foram encaminhadas para cultivo microbiológico laboratorial e para espectrometria de massas (MALDI-TOF). Foi verificada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na intensidade do CMT, sendo que uma cruz demonstrou mais crescimento em placas de cultivo em fazenda. Das 34 culturas negativas, 38,24% foram concordantes entre laboratório e *Onfarm*. Já das 18 culturas com crescimento de SNA, 88,89% foram concordantes. Das 14 amostras enviadas para o MALDI-TOF, 83,33% foram concordantes entre os três métodos de diagnóstico. Os métodos de

diagnóstico da mastite subclínica testados apresentam resultados satisfatórios e contribuem para melhor entendimento da doença.

Palavras-chave: mastite subclínica; *California Mastitis Test*; cultivo microbiológico; MALDI-TOF; *Estafilococos não aureus*

## ABSTRACT

*Mastitis is a multifactorial inflammation, most commonly caused by bacterial agents. When compared to clinical mastitis, subclinical mastitis is more prevalent, leading to significant economic losses and a decline in milk quality. The objective of this study was to assess the statistical correlation between the intensity of the California Mastitis Test (CMT) reaction in each reactive mammary quarter and the results of on-farm microbiological culture. Additionally, the study aimed to evaluate the agreement between on-farm microbiological culture results, laboratory microbiological culture, and mass spectrometry. In the first experiment, cows exhibiting a sudden increase in somatic cell count (SCC) above 200,000 cells/m of milk were selected. The CMT was conducted, recording reaction intensity (negative, trace, one, two, or three crosses). Samples from reactive quarters were collected, and on-farm microbiological cultures were performed, assessing growth within 24 hours. In the second experiment, both negative and positive samples for non-aureus Staphylococci were sent for laboratory microbiological culture and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. A significant difference ( $p < 0.01$ ) in CMT intensity was observed, with one cross demonstrating more growth on on-farm culture plates. Out of 34 negative cultures, 38.24% showed concordance between the laboratory and on-farm results. Conversely, 88.89% of the 18 cultures with non-aureus Staphylococci growth were concordant. Of the 14 samples sent for MALDI-TOF, 83.33% exhibited concordance among the three diagnostic methods. The tested subclinical mastitis diagnostic methods yielded satisfactory results, contributing to a better understanding of the disease.*

*Keywords: Subclinical mastitis; California Mastitis Test; microbiological culture; MALDI-TOF; Non-aureus Staphylococci*

## Introdução

A mastite é uma inflamação da glândula mamária de origem multifatorial. A causa mais frequente é a infecção resultante de microrganismos de origem bacteriana (Ashraf; Imran, 2020). A apresentação da doença varia de acordo com as características do patógeno e a capacidade de resposta imunológica da vaca. Quando a inflamação leva a alterações visíveis do leite é considerada mastite clínica, por outro lado, quando o leite aparenta ser normal e há alterações apenas na contagem de células somáticas (CCS), é considerada subclínica (Ruegg, 2018).

O custo anual total com a doença é estimado em 10% do valor total da venda do leite, sendo que dois terços dessa perda são causados pela redução da produção de leite por vacas

afetadas com mastite subclínica (Constable *et al.*, 2017). Uma vez que possui relevante impacto econômico e gera prejuízos na qualidade do leite, métodos eficazes de diagnóstico precoce de mastite subclínica são essenciais (Bach; Sipka; McArt, 2019).

Embora o fornecimento de resultados de CCS possam estar prontamente disponíveis em algumas fazendas, para outras esta prática ainda não é rotineira (Sumon; Parvin; Ehsan; Islam, 2020). Mesmo em fazendas com mais alta tecnificação, o *California Mastitis Test (CMT)* é utilizado com frequência para detectar mastite subclínica em razão da sua praticidade, rapidez de resultado e custo baixo. O teste possui uma sensibilidade (80%) e especificidade (90%) adequada para detectar quartos mamários com mastite subclínica quando consideradas CCS acima de 200.000 células/mL de leite (Brito *et al.*, 1997).

A cultura microbiológica de amostras de leite é considerada padrão ouro para diagnóstico de infecções intramamárias (Santos; Fonseca, 2019). A cultura laboratorial pode ser muito útil para o diagnóstico mais preciso da mastite subclínica (Constable *et al.*, 2017), no entanto, possui algumas limitações de custo e logística, fazendo crescer o uso de programas *Onfarm Culture* (Santos; Fonseca, 2019). Embora não possam substituir o diagnóstico laboratorial, esses programas possuem uma precisão de aproximadamente 80% para identificação dos agentes causadores de mastite (Adkins; Middleton, 2018).

Um método de diagnóstico que tem sido utilizado com maior frequência tanto na medicina humana, quanto na medicina veterinária é a espectrometria de massas. A técnica é baseada na identificação de compostos químicos através da determinação de suas massas moleculares na forma iônica e pode identificar microrganismos a nível de gênero e espécie, a partir de colônias bacterianas (Santos; Fonseca, 2019).

O presente trabalho tem como objetivo avaliar se existe correlação estatística entre a intensidade da reação do CMT (traço, uma, duas ou três cruzes) obtidos para cada quarto mamário reagente ao teste, com a ausência ou presença de crescimento de colônias bacterianas em cultivo microbiológico de fazenda. Além disso, avaliar a concordância entre o resultado do diagnóstico obtido da cultura microbiológica em fazenda, da cultura microbiológica laboratorial e da espectrometria de massas especialmente para agentes do grupo *Staphylococcus aureus*.

## **Materiais e Métodos**

### **A fazenda**

O estudo foi desenvolvido em uma propriedade localizada na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. A fazenda possui aproximadamente 700 vacas da raça holandesa em lactação, com média de 42 litros de leite por vaca. As vacas em lactação permanecem em

sistema de criação *free stall* e são ordenhadas três vezes ao dia em sistema de ordenha carrossel. Mensalmente é realizada a avaliação individual da contagem de células somáticas desses animais.

#### Seleção das Vacas

Foram incluídas no experimento as vacas que apresentaram aumento abrupto de CCS acima de 200.000 células/mL de leite e que não demonstraram sinais de mastite clínica no momento da realização dos experimentos. No momento da ordenha, foi realizado o *California Mastitis Test* (CMT) nesses animais e registrado o resultado para cada quarto mamário, em uma escala de grau subjetiva, que variou de zero (sem alterações) a traços, uma, duas ou três cruces, de acordo com a intensidade da formação do gel, conforme descrito por Constable *et al.*, (2017).

Vacas não reagentes no CMT foram excluídas do experimento no momento do teste. As vacas que reagiram ao CMT em pelo menos um dos quartos mamários permaneceram no estudo, totalizando 59 animais. 82 quartos mamários demonstraram reação ao teste CMT, e desses foram coletadas amostras de leite com a finalidade de realizar cultivo microbiológico.

#### Coleta de Amostras

Após o *pré-dipping*, a retirada dos primeiros jatos de leite e a secagem dos tetos, foi realizada a desinfecção da extremidade do teto utilizando algodão embebido em álcool 70% e realizada a coleta de aproximadamente 10mL de leite em tubos Falcon estéreis. Os tubos foram identificados com o número do animal e quarto mamário amostrado e, em seguida, refrigerados.

#### Análise Microbiológica

As 82 amostras foram inoculadas em placas de Petri contendo meios cromogênicos e mantidas em estufa a uma temperatura de 37°C. Após 24h foi realizada a leitura das placas incubadas e avaliada a presença ou ausência de crescimento de colônias bacterianas, além da identificação do patógeno causador de acordo com o crescimento ou não nos meios seletivos e a coloração da colônia.

As amostras também foram encaminhadas para o laboratório (Scire Análises Microbiológicas) para realização de cultivo microbiológico. Além disso, 18 amostras que obtiveram crescimento microbiano na cultura microbiológica no laboratório foram encaminhadas para confirmação de diagnóstico utilizando o método de espectrometria de massas (MALDI-TOF).

#### Experimento 1

Em vacas com aumento abrupto de CCS acima de 200.000 células/mL, foi realizado o diagnóstico de mastite subclínica através do CMT e registrado os graus de reação (zero, traço, uma, duas, ou três cruces) dos quartos mamários. No total, 59 vacas foram reagentes ao teste foram incluídas no experimento. Foram coletadas amostras de leite dos 82 quartos mamários que apresentaram reação e realizado o cultivo microbiológico em fazenda. A leitura das placas foi realizada 24h após a inoculação. Os dados foram compilados e posteriormente avaliados quanto à correlação estatística entre o resultado dos graus do CMT (traço, uma, duas, ou três cruces) dos quartos mamários amostrados e a presença ou ausência de crescimento de colônias na cultura microbiológica em fazenda.

## Experimento 2

No segundo experimento, além da cultura microbiológica já realizada na fazenda, as 82 amostras foram enviadas para cultivo microbiológico laboratorial e por questões de logística, apenas 18 dessas amostras também foram enviadas para realização do teste de espectrometria de massas.

Após a obtenção dos resultados, os dados foram compilados e permaneceram nesse segundo experimento apenas as amostras com cultivo negativo ou que resultaram em agentes pertencentes ao grupo dos estafilococos não aureus (SNA). Foi avaliada a concordância estatística entre o resultado do diagnóstico obtido da cultura microbiológica em fazenda, da cultura microbiológica laboratorial e do MALDI.

## Estatística

As análises foram realizadas com o software estatístico JMP® (JMP Statistical Discovery LLC) e consideradas a um nível de significância mínimo de 5% para as comparações estabelecidas.

## Resultados

### Experimento 1

Os resultados das culturas microbiológicas em fazenda e os respectivos escores de CMT dos 82 quartos mamários amostrados podem ser vistos na tabela 1. No total, foram 41 amostras positivas no CMT e com cultura negativa em fazenda e 41 amostras positivas no mesmo teste e positivas na cultura em fazenda.

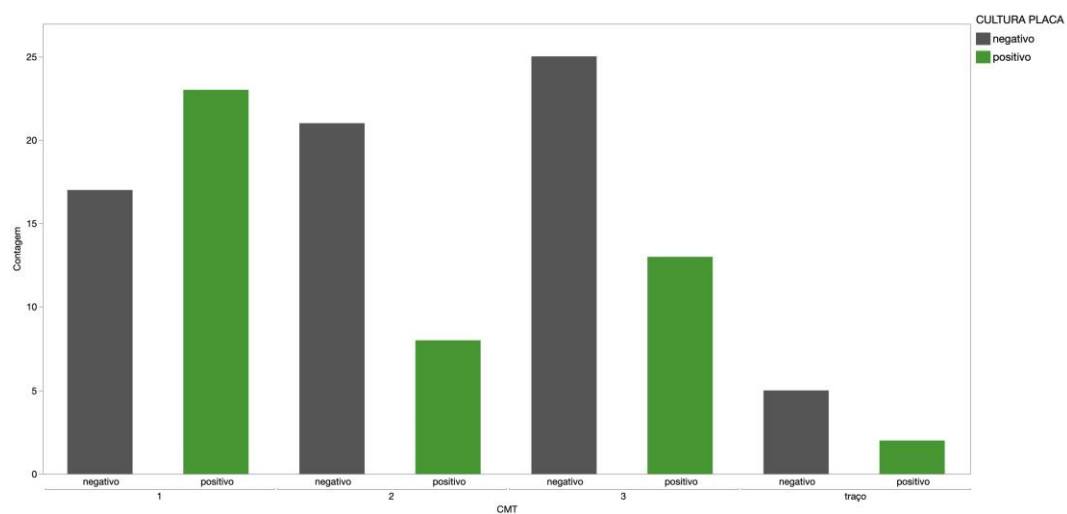
Tabela 1 – Resultado da cultura microbiológica em fazenda de acordo com o escore do *California Mastitis Test* (CMT) de 82 quarto mamários amostrados de vacas holandesas, na região noroeste do Rio Grande do Sul no ano de 2023/24.

Cultura Microbiológica em Fazenda	Escore do CMT				Total
	Traços	+	++	+++	
Positiva	2	21	7	11	41
Negativa	5	10	12	14	41
<b>Total</b>	7	31	19	25	82

Fonte: O próprio autor (2024).

Como pode ser observado na figura 1, o escore de CMT uma cruz obteve maior número de culturas positivas na fazenda, quando comparado aos demais escores. Por meio da análise estatística, foi possível concluir que o grau de classificação do CMT tem uma tendência de efeito sobre o resultado da cultura microbiológica em fazenda ( $p=0,07$ ). Foi verificada diferença significativa na intensidade do CMT uma cruz ( $p<0,01$ ) em obter cultura positiva.

Figura 1 – Número de amostras de quartos mamários com presença ou ausência de crescimento de culturas bacterianas em placa de cultivo microbiológico em fazenda, de acordo com o escore do *California Mastitis Test* (CMT), coletadas de vacas holandesas no noroeste do Rio Grande do Sul, no ano de 2023/24.

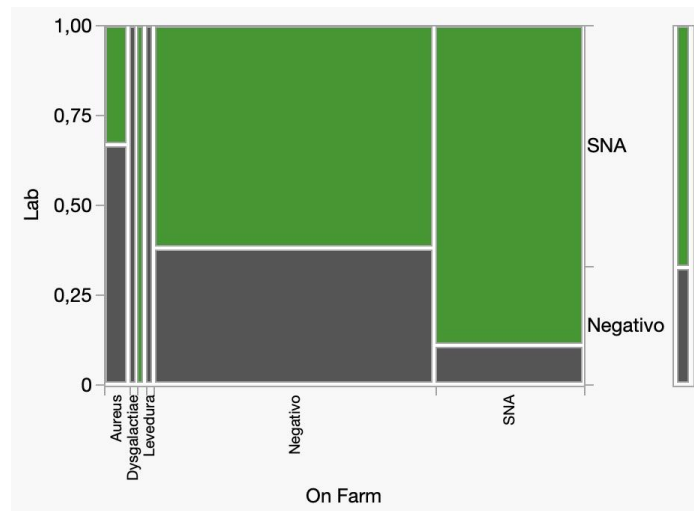


Fonte: O próprio autor (2024).

## Experimento 2

Quando avaliada a concordância entre as culturas microbiológicas em fazenda e as culturas microbiológicas em laboratório que obtiveram resultados negativos e resultados positivos para SNA, obteve-se que das 34 culturas negativas, 38,24% foram concordantes entre laboratório e *Onfarm*. Já das 18 culturas com crescimento de SNA, 88,89% foram concordantes. Esse dado pode ser visualizado na Figura 2.

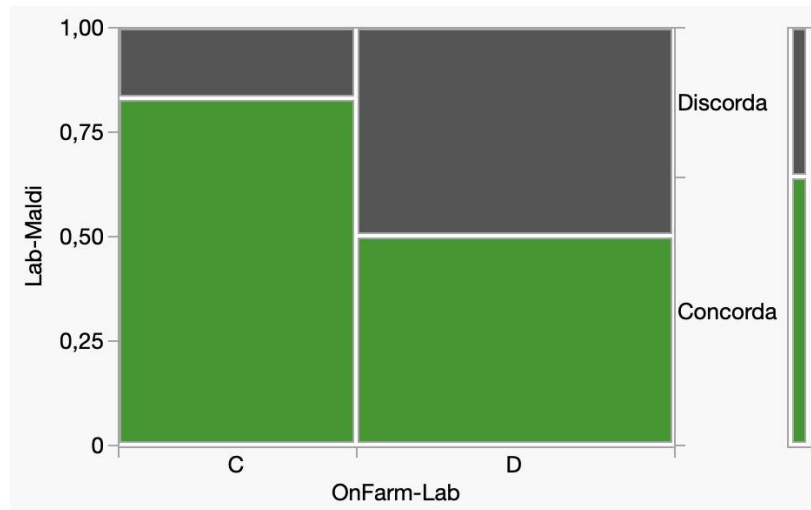
Figura 2 – Concordância entre culturas negativas e culturas positivas para *Staphylococcus aureus* (SNA) em cultura microbiológica em fazenda (*Onfarm*), e cultura microbiológica laboratorial.



Fonte: O próprio autor (2024).

Quando realizada a comparação de culturas positivas para SNA que concordaram entre os resultados de fazenda e de laboratório com os resultados obtidos no MALDI obteve-se que, das 14 amostras que foram enviadas, 83,33% foram concordantes entre os três métodos de diagnóstico do agente (Figura 3).

Figura 3 – Concordância de culturas positivas para *Staphylococcus aureus* (SNA) entre cultura microbiológica em fazenda (*Onfarm*), cultura microbiológica laboratorial e MALDI.



Fonte: O próprio autor (2024).

## Discussão

Considerando os resultados do CMT de uma, duas ou três cruzes, Ribeiro *et al.*, (2003) observaram o crescimento bacteriano em 64,56% das 3035 amostras positivas para o CMT. Ainda, constataram que quanto maior a intensidade da reação do CMT, maior o número de amostras com isolamento de microrganismos. Beloti *et al.*, (1997) aponta que dos 295 quartos positivos para o CMT, em 223 (75,59%) obteve crescimento bacteriano.

O presente encontrou números diferentes dos citados visto que obteve um número mais baixo (50%) de amostras positivas para o CMT que isolaram culturas bacterianas na fazenda. Além disso, neste caso, foi notada diferença estatística entre a intensidade das reações ao CMT, sendo que amostras com uma cruz resultaram em maior número de amostras com isolamento bacteriano em cultivos microbiológicos na fazenda do que amostras com traço, duas ou três cruzes, diferindo dos estudos anteriormente mencionados.

Quando comparado ao Somaticell®, método que estima a contagem de células somáticas, o CMT apresentou alta sensibilidade (99,51%) e especificidade de 3,8% (Medeiros, 2008). Barbosa *et al.*, (2002) compararam a relação entre a CCS resultante de contagem em microscopia e do CMT e também observaram alta correlação (91,87%) entre ambas. Corroborando com esses estudos Bhutto; Murray; Woldehiwet, (2012), consideraram que tanto os escores de CMT quanto à CSS tem boa sensibilidade para identificar infecções intramamárias, no entanto, possuem baixa especificidade e valor preditivo positivo, o que pode levar a falsos positivos.



Vários estudos apontam para alta sensibilidade entre o teste CMT e os valores de CCS, mas a baixa especificidade pode gerar falsos positivos e pode ser uma hipótese pela qual foram encontrados, neste estudo, um número mais baixo de culturas bacterianas com crescimento positivo. Conforme Middleton *et al.*, (2004), baixas especificidades em testes de triagem não é algo tão preocupante visto que há a possibilidade de realizar a verificação dos resultados através de testes confirmatórios. No entanto, se sabe que não é o ideal, já que seria realizada uma cultura bacteriana desnecessária de uma amostra negativa.

Ribeiro *et al.*, (2003) sugerem que as culturas negativas provenientes de amostras com CMT positivo também podem estar associadas à mastite não infecciosa. Além disso, essas diferenças entre sensibilidade podem estar relacionadas com às características individuais de cada patógeno e a sua prevalência no rebanho em estudo (Middleton *et al.*, 2004).

Vacas com CCS alta e culturas bacterianas negativas podem ser justificadas também pelo fato de que, no momento da coleta, a vaca já tenha conseguido realizar a cura espontânea da infecção através da ação de seu sistema imune, mas ainda esteja indicando valor de CCS aumentado, uma vez que não há momento específico para que esse padrão volte à normalidade (Rodrigues, 2023).

Ainda que não tenha capacidade de substituir o diagnóstico laboratorial, quando realizados de maneira correta, os programas de cultura microbiológica na fazenda possuem uma precisão de aproximadamente 80% para identificação dos agentes patogênicos causadores de mastite (National Mastitis Concil, 2017). O uso de meios cromogênicos pode ser uma ferramenta útil para realizar uma tomada de decisão mais rápida quanto ao tratamento e prevenção de novas infecções. A acurácia diagnóstica varia conforme cada microrganismo (Granja *et al.*, 2021).

Placas de cultura em fazenda (Accumast®) foram comparadas a cultivos microbiológicos laboratoriais por Ganda *et al.*, (2016), resultando em 78,4% de sensibilidade, 94,9% de especificidade e 93,8% de acurácia para culturas de *Staphylococcus* spp. No caso deste estudo, obteve-se que das 34 culturas negativas, 38,24% foram concordantes entre laboratório e *Onfarm*. Já das 18 culturas com crescimento de SNA, 88,89% foram concordantes.

Em sua pesquisa, Seng *et al.*, (2009) constatou que, dos 1.660 isolados bacterianos analisados, 95,4% foram corretamente identificados pela espectrometria de massa. De forma semelhante, estudos realizados por Eigner *et al.*, (2009) destacaram que, das 108 cepas testadas, 93% foram identificadas corretamente pelo MALDI-TOF a nível de espécie. O experimento dois do presente estudo segue a mesma linha de achados, obtendo 83,33% de concordância

entre os resultados do MALDI-TOF e culturas positivas de *Estafilococos* não aureus em laboratório.

### **Conclusão**

O CMT é um teste indireto bastante utilizado para avaliar a contagem de células somáticas e a presença de mastite subclínica, em função do seu baixo custo e praticidade. Ele possui alta correlação com o valor de CCS, embora algumas divergências quanto aos cultivos de amostras positivas para o teste possam ocorrer em razão de características individuais dos patógenos e de sua prevalência na fazenda.

O cultivo microbiológico em fazenda é uma ferramenta que auxilia na tomada de decisão frente à mastite bovina, possibilitando resultados mais rápidos e com uma acurácia adequada, especialmente para os agentes *Staphylococcus* spp., como visto neste trabalho. Levando em consideração o cultivo microbiológico laboratorial como padrão ouro na identificação dos agentes causadores da mastite, o MALDI-TOF se mostra uma ferramenta também bastante eficiente e precisa no diagnóstico, vista sua alta concordância com a cultura laboratorial.

## Referências

- ADKINS, P. R. F.; MIDDLETON, J. R. Methods for Diagnosing Mastitis. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 479–491, 2018. Disponível em: [https://www.vetfood.theclinics.com/article/S0749-0720\(18\)30036-7/fulltext](https://www.vetfood.theclinics.com/article/S0749-0720(18)30036-7/fulltext). Acesso em: 26 jan. 2024.
- ASHRAF, A.; IMRAN, M. Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. **Animal Health Research Reviews**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 36–49, 2020.
- BACH, K. D.; SIPKA, A.; MCART, J. a. A. Case study: Evaluating quarter and composite milk sampling for detection of subclinical intramammary infections in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, [s. l.], v. 163, p. 51–57, 2019.
- BARBOSA, C. P. *et al.* Relacao entre contagem de celulas somaticas (CCS) e os resultados do "California Mastitis Test" (CMT), no diagnostico de mastite bovina. **Bioscience Journal**, [s. l.], v. 18, n. 1, 2002. Disponível em: <https://seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/6401>. Acesso em: 4 fev. 2024.
- BELOTI, V. *et al.* Estudo da mastite subclínica em rebanhos leiteiros no norte do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 45–53, 1997. Disponível em: <https://ojs.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/4984>. Acesso em: 3 fev. 2024.
- BHUTTO, A. L.; MURRAY, R. D.; WOLDEHIWET, Z. California mastitis test scores as indicators of subclinical intra-mammary infections at the end of lactation in dairy cows. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 92, n. 1, p. 13–17, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528810003383>. Acesso em: 4 fev. 2024.
- BRITO, J. R. F. *et al.* Sensibilidade e especificidade do “California Mastitis Test” como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 17, p. 49–53, 1997. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/zPPwXyTsPnKMSjMcmWpSBgw/?lang=pt&format=html>. Acesso em: 26 jan. 2024.
- CONSTABLE, P. D. *et al.* **Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. St. Louis, Missouri: Elsevier Ltd. All Rights Reserved, 2017. v. 1
- EIGNER, U. *et al.* Performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory. **Clinical Laboratory**, [s. l.], v. 55, n. 7–8, p. 289–296, 2009.
- GANDA, E. K. *et al.* Evaluation of an On-Farm Culture System (Accumast) for Fast Identification of Milk Pathogens Associated with Clinical Mastitis in Dairy Cows. **PloS One**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. e0155314, 2016.
- GRANJA, B. M. *et al.* Evaluation of chromogenic culture media for rapid identification of microorganisms isolated from cows with clinical and subclinical mastitis. **Journal of Dairy**

**Science**, [s. l.], v. 104, n. 8, p. 9115–9129, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030221005580>. Acesso em: 4 fev. 2024.

MEDEIROS, E. S. Avaliação do exame microbiológico, California Mastitis Test e Somaticell® no diagnóstico da mastite subclínica em bovinos leiteiros. **Medicina Veterinária**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 16–22, 2008. Disponível em: <https://www.journals.ufrpe.br/index.php/medicinaveterinaria/article/view/695>. Acesso em: 4 fev. 2024.

MIDDLETON, J. R. *et al.* Use of somatic cell counts and California mastitis test results from individual quarter milk samples to detect subclinical intramammary infection in dairy cattle from a herd with a high bulk tank somatic cell count. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [s. l.], v. 224, n. 3, p. 419–423, 2004. Disponível em: <https://avmajournals.avma.org/view/journals/javma/224/3/javma.2004.224.419.xml>. Acesso em: 4 fev. 2024.

NATIONAL MASTITIS CONCIL. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. **National Mastitis Council (NMC)**, [s. l.], 2017. Disponível em: [https://www.academia.edu/50651208/Laboratory\\_Handbook\\_on\\_Bovine\\_Mastitis](https://www.academia.edu/50651208/Laboratory_Handbook_on_Bovine_Mastitis). Acesso em: 25 jan. 2024

RIBEIRO, M. *et al.* Relação Entre mastite clínica, subclínica indecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. **Current Agricultural Science and Technology**, [s. l.], v. 9, n. 3, 2003. Disponível em: <https://periodicos.ufpel.edu.br/index.php/CAST/article/view/606>. Acesso em: 3 fev. 2024.

RODRIGUES, R. M. C. Vaca com CCS alta e cultura microbiológica do leite negativa: tem caroço nesse angu – Onfarm. *In*: ONFARM. 2023. Disponível em: <https://onfarm.com.br/vaca-com-ccs-alta-e-cultura-microbiologica-do-leite-negativa-tem-caroco-nesse-angu/>. Acesso em: 4 fev. 2024.

RUEGG, P. L. Making Antibiotic Treatment Decisions for Clinical Mastitis. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 413–425, 2018.

SANTOS, M. V. dos; FONSECA, L. F. da. **Controle da Mastite e Qualidade do Leite: Desafios e Soluções**. 1. ed. Pirassununga: Edição dos Autores, 2019.

SUMON, S. M. M. R. *et al.* Relationship between somatic cell counts and subclinical mastitis in lactating dairy cows. **Veterinary World**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 1709–1713, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7522932/>. Acesso em: 26 jan. 2024.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diagnóstico precoce e assertivo dos agentes causadores da mastite subclínica é fundamental para orientar a tomada de decisão, o tratamento e medidas de prevenção, visto que é uma doença de grande importância econômica na cadeia leiteira. Por se tratar de uma doença multifatorial, existem diversas particularidades acerca da sua classificação, dos agentes causadores e dos fatores de risco. Por consequência, são estudados e aprimorados diversos métodos de diagnóstico para mastite subclínica.

Neste trabalho foi possível aprofundar informações acerca de métodos diagnósticos já conhecidos e compará-los com outros estudos, contribuindo para ampliar os conhecimentos em relação ao diagnóstico da mastite subclínica. O *California Mastitis Test*, os cultivos microbiológicos em fazenda e em laboratório e o MALDI-TOF representam métodos satisfatórios de diagnóstico e, conforme suas particularidades, se adaptam a diferentes realidades.

## REFERÊNCIAS

- ADKINS, P. R. F.; MIDDLETON, J. R. Methods for Diagnosing Mastitis. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 479–491, 2018. Disponível em: [https://www.vetfood.theclinics.com/article/S0749-0720\(18\)30036-7/fulltext](https://www.vetfood.theclinics.com/article/S0749-0720(18)30036-7/fulltext). Acesso em: 26 jan. 2024.
- ASHRAF, A.; IMRAN, M. Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. **Animal Health Research Reviews**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 36–49, 2020.
- BACH, K. D.; SIPKA, A.; MCART, J. a. A. Case study: Evaluating quarter and composite milk sampling for detection of subclinical intramammary infections in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, [s. l.], v. 163, p. 51–57, 2019.
- BARBOSA, C. P. *et al.* Relacao entre contagem de celulas somaticas (CCS) e os resultados do "California Mastitis Test" (CMT), no diagnostico de mastite bovina. **Bioscience Journal**, [s. l.], v. 18, n. 1, 2002. Disponível em: <https://seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/6401>. Acesso em: 4 fev. 2024.
- BELOTI, V. *et al.* Estudo da mastite subclínica em rebanhos leiteiros no norte do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 45–53, 1997. Disponível em: <https://ojs.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/4984>. Acesso em: 3 fev. 2024.
- BENIĆ, M. *et al.* Bovine mastitis: a persistent and evolving problem requiring novel approaches for its control - a review. **Veterinarski arhiv**, [s. l.], v. 88, n. 4, p. 535–557, 2018. Disponível em: <https://hrcak.srce.hr/clanak/300244>. Acesso em: 25 jan. 2024.
- BHUTTO, A. L.; MURRAY, R. D.; WOLDEHIWET, Z. California mastitis test scores as indicators of subclinical intra-mammary infections at the end of lactation in dairy cows. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 92, n. 1, p. 13–17, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528810003383>. Acesso em: 4 fev. 2024.
- BIRHANU, M. *et al.* Prevalence of bovine subclinical mastitis and isolation of its major causes in Bishoftu Town, Ethiopia. **BMC research notes**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 767, 2017.
- BRADLEY, A. J.; GREEN, M. J. The importance of the nonlactating period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 547–568, 2004.
- BRITO, J. R. F. *et al.* Sensibilidade e especificidade do “California Mastitis Test” como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 17, p. 49–53, 1997. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/zPPwXyTsPnKMSjMcmWpSBgw/?lang=pt&format=html>. Acesso em: 26 jan. 2024.

CHAKRABORTY, S. *et al.* Technological interventions and advances in the diagnosis of intramammary infections in animals with emphasis on bovine population-a review. **The Veterinary Quarterly**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 76–94, 2019.

COBIRKA, M.; TANCIN, V.; SLAMA, P. Epidemiology and Classification of Mastitis. **Animals : an Open Access Journal from MDPI**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 2212, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7760962/>. Acesso em: 26 jan. 2024.

CONSTABLE, P. D. *et al.* **Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. St. Louis, Missouri: Elsevier Ltd. All Rights Reserved, 2017. v. 1

DINGLE, T. C.; BUTLER-WU, S. M. Maldi-tof mass spectrometry for microorganism identification. **Clinics in Laboratory Medicine**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 589–609, 2013.

DUARTE, C. M.; FREITAS, P. P.; BEXIGA, R. Technological advances in bovine mastitis diagnosis: an overview. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 665–672, 2015.

EL-SAYED, A. *et al.* Molecular biological tools applied for identification of mastitis causing pathogens. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 89–97, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6137832/>. Acesso em: 26 jan. 2024.

FERRERO, F. J.; VALLEDOR, M.; CAMPO, J. C. Screening method for early detection of mastitis in cows. **Measurement**, [s. l.], v. 47, p. 855–860, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263224113005149>. Acesso em: 26 jan. 2024.

GANDA, E. K. *et al.* Evaluation of an On-Farm Culture System (Accumast) for Fast Identification of Milk Pathogens Associated with Clinical Mastitis in Dairy Cows. **PloS One**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. e0155314, 2016.

GRANJA, B. M. *et al.* Evaluation of chromogenic culture media for rapid identification of microorganisms isolated from cows with clinical and subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 104, n. 8, p. 9115–9129, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030221005580>. Acesso em: 4 fev. 2024.

HULLAND, C.; DUFOUR, S.; MUNOZ, M. Milk Bacteriological Analysis Using MALDI-TOF Technology. *In: NATIONAL MASTITIS COUCIL*. 13 abr. 2018. Disponível em: [https://www.nmconline.org/wp-content/uploads/2018/04/4.20-p.m.-04.17.18-Edited-MALDI\\_ToF-Factsheet-13-04-2018.pdf](https://www.nmconline.org/wp-content/uploads/2018/04/4.20-p.m.-04.17.18-Edited-MALDI_ToF-Factsheet-13-04-2018.pdf). Acesso em: 11 jan. 2024.

ITO ELEODORO, J.; FAGNANI, R. Etiological agents and bacterial sensitivity in subclinical mastitis in Brazil: a ten-year systematic review. **Veterinaria Italiana**, [s. l.], v. 58, n. 4, 2022.

KUMARI, T.; BHAKAT, C.; CHOUDHARY, R. **A Review on Sub Clinical Mastitis in Dairy Cattle**. [S. l.: s. n.], 2018.

MAIOCHI, R.; RODRIGUES, R.; WOSIACKI, S. PRINCIPAIS MÉTODOS DE DETECÇÃO DE MASTITES CLÍNICAS E SUBCLÍNICAS DE BOVINOS. **Enciclopédia Biosfera**, [s. l.], v. 16, n. 29, p. 1237–1251, 2019. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2019a/agrar/principais.pdf>. Acesso em: 26 jan. 2024.

MEDEIROS, E. S. Avaliação do exame microbiológico, California Mastitis Test e Somaticell® no diagnóstico da mastite subclínica em bovinos leiteiros. **Medicina Veterinária**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 16–22, 2008. Disponível em: <https://www.journals.ufrpe.br/index.php/medicinaveterinaria/article/view/695>. Acesso em: 4 fev. 2024.

MIDDLETON, J. R. *et al.* Use of somatic cell counts and California mastitis test results from individual quarter milk samples to detect subclinical intramammary infection in dairy cattle from a herd with a high bulk tank somatic cell count. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [s. l.], v. 224, n. 3, p. 419–423, 2004. Disponível em: <https://avmajournals.avma.org/view/journals/javma/224/3/javma.2004.224.419.xml>. Acesso em: 4 fev. 2024.

NACIONAL, I. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 77, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018 - **Imprensa Nacional**. [S. l.], 2018. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia>. Acesso em: 26 jan. 2024.

NATIONAL MASTITIS CONCIL. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. **National Mastitis Council (NMC)**, [s. l.], 2017. Disponível em: [https://www.academia.edu/50651208/Laboratory\\_Handbook\\_on\\_Bovine\\_Mastitis](https://www.academia.edu/50651208/Laboratory_Handbook_on_Bovine_Mastitis). Acesso em: 25 jan. 2024.

PETZER, I.-M. *et al.* Somatic cell count thresholds in composite and quarter milk samples as indicator of bovine intramammary infection status. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, [s. l.], v. 84, n. 1, p. e1–e10, 2017.

RAMOS, F. S. *et al.* Importância do diagnóstico de mastite subclínica e seus impactos econômicos nas propriedades leiteiras - revisão da literatura. **Revista Coleta Científica**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 17–27, 2017. Disponível em: <https://portalcoleta.com.br/index.php/rcc/article/view/30>. Acesso em: 26 jan. 2024.

RIBEIRO, M. *et al.* Relação Entre mastite clínica, subclínica indecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. **Current Agricultural Science and Technology**, [s. l.], v. 9, n. 3, 2003. Disponível em: <https://periodicos.ufpel.edu.br/index.php/CAST/article/view/606>. Acesso em: 3 fev. 2024.

RODRIGUES, R. M. C. Vaca com CCS alta e cultura microbiológica do leite negativa: tem caroço nesse angu – Onfarm. *In*: ONFARM. 2023. Disponível em: <https://onfarm.com.br/vaca-com-ccs-alta-e-cultura-microbiologica-do-leite-negativa-tem-caroco-nesse-angu/>. Acesso em: 4 fev. 2024.

RUEGG, P. L. Making Antibiotic Treatment Decisions for Clinical Mastitis. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 413–425, 2018.

SANTOS, E. M. P. dos *et al.* Streptococcus e gêneros relacionados como agentes etiológicos de mastite bovina. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 17–27, 2018. Disponível



em: <https://seer.ufrgs.br/index.php/ActaScientiaeVeterinariae/article/view/15805>. Acesso em: 26 jan. 2024.

SANTOS, M. V. dos; FONSECA, L. F. da. **Controle da Mastite e Qualidade do Leite: Desafios e Soluções**. 1. ed. Pirassununga: Edição dos Autores, 2019.

SENG, P. *et al.* Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, [s. l.], v. 49, n. 4, p. 543–551, 2009.

SHARUN, K. *et al.* Advances in therapeutic and managerial approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. **The Veterinary Quarterly**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 107–136, 2021.

SILVA, A. T. F.; RIZZO, H. Efeitos da mastite por *Staphylococcus coagulase negativa* sobre a qualidade do leite: uma revisão. **Rev. cient. eletrônica med. vet**, [s. l.], 2019. Disponível em: [http://faef.revista.inf.br/imagens\\_arquivos/arquivos\\_destaque/LSH15j5duGogHs3\\_2019-4-4-19-11-31.pdf](http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/LSH15j5duGogHs3_2019-4-4-19-11-31.pdf). Acesso em: 26 jan. 2024.

SUMON, S. M. M. R. *et al.* Relationship between somatic cell counts and subclinical mastitis in lactating dairy cows. **Veterinary World**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 1709–1713, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7522932/>. Acesso em: 26 jan. 2024.

TOMMASONI, C. *et al.* Mastitis in Dairy Cattle: On-Farm Diagnostics and Future Perspectives. **Animals**, [s. l.], v. 13, n. 15, p. 2538, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/13/15/2538>. Acesso em: 25 jan. 2024.

VASQUEZ, A. K. *et al.* Clinical outcome comparison of immediate blanket treatment versus a delayed pathogen-based treatment protocol for clinical mastitis in a New York dairy herd. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 100, n. 4, p. 2992–3003, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030217300905>. Acesso em: 26 jan. 2024.