

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO E TECNOLOGIA INTEGRADA
À MEDICINA VETERINÁRIA

RAFAELLE SANTOS SANTANA

Mastite subclínica em vacas com diferentes proporções genótípicas Holandês-Gir

Viçosa-AL

2018

RAFAELLE SANTOS SANTANA

Mastite subclínica em vacas com diferentes proporções genóticas Holandês-Gir

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação e Tecnologia Integrada à Medicina Veterinária da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Chiara Rodrigues de Amorim Lopes

Viçosa-AL

2018

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Polo Viçosa, AL

Bibliotecária Responsável: Edvânia Cosmo da S. Gonçalves

S232m Santana, Rafaelle Santos
Mastite subclínica em vacas com diferentes proporções
genotípicas Holandês-Gir / Rafaelle Santos Santana – 2018.
43 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade
Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias. Viçosa,AL, 2018.
Orientação: Prof^a. Dr^a. Chiara Rodrigues de Amorim Lopes

Inclui bibliografia

1. Mastite 2. Bovinos 3. Bovinos - doenças I. Título

CDU:636.2

Folha de Aprovação

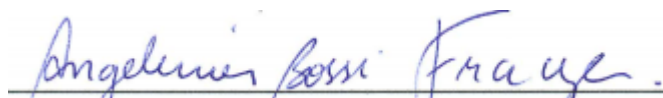
RAFAELLE SANTOS SANTANA

Mastite subclínica em vacas com diferentes proporções genóticas Holandês-Gir

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Inovação e Tecnologia Integrada à Medicina Veterinária da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 27 de Setembro de 2018.

Prof^a Dra Chiara Rodrigues de Amorim Lopes – UFAL - Orientadora

Banca Examinadora:



Prof^a Dra Angelina Bossi Fraga- UFAL – Examinadora Externa



Prof^a Dra Chiara Rodrigues de Amorim Lopes – UFAL – Examinadora Interna



Prof^a Dra^a Karla Patrícia Chaves da Silva – UFAL – Examinadora Interna

A minha mãe, Marilene Santana, pelo seu amor.

Ao meu pai, José Rinaldo Santana (in memoriam), meu anjo.

Meus filhos, Valentina, Luís e Raul, minha força.

Minha eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida pela perseverança, estímulo e força de continuar, apesar das dificuldades enfrentadas, sou abençoada. À minha mãe, Marilene Santana pelo amor, dedicação, paciência, incentivo, exemplo de pessoa, sempre disposta a ajudar e a cuidar dos meus tesouros (Valentina, Luís e Raul). Ao Tilgathpilnezer Fernandes, meu esposo, pelo amor, companheirismo e paciência nas horas de estresse, tornando meus dias mais felizes, mesmo a distância, e ensinando-me a ser uma pessoa melhor. Ao meu irmão Rafael Santana, pelo seu amor e pelo exemplo de dedicação, meu espelho. A toda a minha família pelo apoio e incentivo. À Professora Dra Chiara Rodrigues, minha gratidão pela oportunidade de desenvolver esse trabalho sob sua valiosa orientação, atenção e confiança. A professora Dra Angelina Bossi Fraga, que foi minha orientadora na graduação, hoje nessa nova etapa da minha vida, meu exemplo no campo da docência e pesquisa. À Fundação de Amparo à Pesquisa de Alagoas (FAPEAL) pela concessão da Bolsa de Mestrado. À professora Dra Karla Chaves pela atenção e contribuição na área de doenças infecciosas. À toda equipe do laboratório de doenças infecciosas da UFAL, Campus Viçosa, em especial aos queridos Arthur, Rayanne, Gustavo, Claudjane e Elísia pela ajuda e contribuição. À EMATER – AL pela oportunidade de exercer a função de extensionista rural, durante o curso de mestrado, possibilitando uma experiência imensurável na bacia leiteira do Estado de Alagoas. Aos meus amigos queridos, Mariana Accioly, Sinara Prócopio, Verdiana Cavalcante, Guilherme Antonio, simplesmente por serem especiais em minha vida. Ao Sr Paulo Amaral e Sr Rogério Armstrong, pelo apoio e fornecimento dos dados, base para execução do presente estudo. À Rafaele Miguel (PLANTEL), pela contribuição valiosa, sempre atenciosa e disposta a ajudar. Aos funcionários das fazendas Jurema e São Luiz, pela ajuda no desenvolvimento da pesquisa. Aos amigos e companheiros da primeira turma de mestrado em Medicina Veterinária pela troca de experiências. Ao Programa de Pós-Graduação Medicina Veterinária da UFAL, Campus de Viçosa, seu corpo docente e de técnicos pelo ensino e conhecimentos proporcionados.

“Se você quer transformar o mundo, experimente primeiro promover o seu aperfeiçoamento pessoal e realizar inovações no seu próprio interior.”

Dalai Lama

RESUMO

A mastite é a alteração patológica que mais ocasiona perdas econômicas na produção leiteira no país e no mundo, além de ocasionar riscos à saúde pública. A identificação dos principais agentes etiológicos causadores de mastite e a associação destes com a contagem de células somáticas (CCS) são ferramentas imprescindíveis para prevenir e controlar a doença nos rebanhos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência da mastite subclínica e a associação entre os microrganismos isolados e a CCS obtida em rebanhos de bovinos leiteiros mestiços Holandês-Gir. Para tal, foram obtidos dados do teste CMT (California Mastitis Test) mensal, da realização dos exames bacteriológicos e da CCS de dois rebanhos leiteiros (rebanho A: predominância de 1/2 H 1/2 Gir; rebanho B: predominância de 3/4 H 1/4 Gir e de 5/8 H 3/8 Gir), localizadas na região semiárida do Estado de Alagoas, Brasil. O rebanho A foi o mais afetado pela mastite subclínica. Os principais agentes etiológicos isolados foram *Staphylococcus* sp. (37%), *Streptococcus* sp. (25%), *Enterobacteriaceae* (16%) e *Corynebacterium* sp. (11%). A CCS foi significativamente maior para as vacas que apresentaram os quatro quartos mamários infectados e para as vacas com dois ou acima de dois microrganismos isolados, em relação às sadias. Maiores valores de CCS (>1 000 000) foram encontrados na presença de infecção mista (associações) por *Staphylococcus* sp., com um ou mais microrganismos dos gêneros *Micrococcus* sp., *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* sp. e *Corynebacterium* sp.; na infecção mista por *Streptococcus* sp. e *Corynebacterium* sp. e por *Enterobacteriaceae* e *Bacillus* sp.

Palavras-chave: California mastitis test. Células somáticas. Epidemiologia. Gir. Holandês. Infecção intramamária.

ABSTRACT

Mastitis is the pathological alteration that most causes economic losses in milk production in country and world, besides causing risks to public health. Identification of the main etiological agents, which cause mastitis and their association with somatic cell counts (SCC) are essential tools to prevent and control disease in herds. The objective of the present study was to evaluate the occurrence of subclinical mastitis and association between isolated microorganisms and SCC in crossbreed dairy cattle. Information monthly of California Mastitis Test (CMT), bacteriological tests and the SCC from two dairy herds were obtained (herd A: genotype of cows was predominance 1/2 H 1/2 Gyr; herd B: genotype of cows was predominance 3/4 H 1/4 Gyr and 5/8 H 3/8 Gyr), located in the semi-arid region of the State of Alagoas, Brazil. Herd A was the most affected by subclinical mastitis. The main etiologic agents isolated were *Staphylococcus* sp. (37%), *Streptococcus* sp. (25%), *Enterobacteriaceae* (16%) and *Corynebacterium* sp. (11%). SCC was significantly higher for cows presenting the four quarters infected and for cows with two or more than two microorganisms isolated from healthy ones. Higher SCC values (> 1.000.000) were found in the presence of mixed infection (associations) by *Staphylococcus* sp., with one or more microorganisms of *Micrococcus* sp., *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* sp. and *Corynebacterium* sp. genera; in mixed infection with *Streptococcus* sp. and *Corynebacterium* sp. and by *Enterobacteriaceae* and *Bacillus* sp.

Key Words: California mastitis test. Somatic cells. Epidemiology. Gyr. Holstein. Intramammary infection.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Frequência relativa e acumulada dos agentes etiológicos isolados.....	30
--	-----------

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELA 1. Agentes etiológicos contagiosos e ambientais causadores de mastites.....	15
TABELA 2. Relação entre o escore pelo California Mastitis Test (CMT) e a contagem de células somáticas (CCS).....	18
QUADRO 1. Frequência de quartos mamários infectados e do número de microrganismos isolados, por animal, segundo o rebanho.....	25
QUADRO 2. Contagem de células somáticas (CCS) e escore de células somáticas (ECS), de acordo com o rebanho, com o número de quartos infectados por animal e com o número de microrganismos isolados por animal.....	26
QUADRO 3. Contagem de células somáticas (CCS), número de vacas positivas no exame bacteriológico (N) e respectivo(s) microrganismo(s) isolado(s) por animal.....	27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Produção de Leite no Brasil.....	13
2.2 Gado Holandês-Gir.....	14
2.3 Mastite.....	14
2.4 Etiologia e patogenia da mastite.....	15
2.5 Diagnóstico da mastite subclínica.....	17
2.6 Contagem de células somáticas (CCS) <i>versus</i> a produção e a qualidade do leite.....	18
2.7 Principais fatores de risco para ocorrência da mastite.....	19
2.7.1 Estado fisiológico.....	19
2.7.2 Genética e idade.....	19
3 Considerações Finais.....	20
4. ARTIGO CIENTÍFICO (Mastite subclínica em vacas com diferentes proporções genotípicas Holandês-Gir).....	21
4.1 Abstract.....	21
4.2 Resumo.....	21
4.3 Introdução.....	22
4.4 Material e Métodos.....	23
4.5 Resultados e Discussão.....	24
4.6 Conclusões.....	27

4.7. Referências.....	28
4.8. Legenda das Figuras.....	29
REFERÊNCIAS.....	31
ANEXO I.....	36
ANEXO II.....	42

1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa posição de destaque no cenário mundial, em produção de leite. Tal fato decorre principalmente do numeroso rebanho leiteiro que detém, visto que, em termos de produtividade, o valor médio da produção de leite/vaca/dia ainda fica muito aquém dos valores obtidos por seus principais concorrentes.

Cerca de 70 % da produção de leite do País, provém de mestiços Holandês-Zebu, sobretudo de mestiços Holandês-Gir, (MADALENA et al., 2012). Essa predominância genética, mais especificadamente em regiões semiáridas, está relacionada às qualidades de ambas as raças para produção de leite, bem como à capacidade de tolerância ao calor e rusticidade da raça Gir.

O objetivo principal da bovinocultura leiteira é a geração de lucro, propiciando assim a manutenção do produtor na atividade. O lucro na produção de leite, assim como em qualquer outra atividade, decorre principalmente da produtividade, dos custos da produção e do preço do leite pago ao produtor. Diminuir as perdas econômicas advindas da ocorrência de doenças é uma das formas de aumentar o lucro.

A mastite é uma doença plurietiológica e multifatorial, caracterizada pela inflamação da glândula mamária, podendo se manifestar de forma clínica ou subclínica. A forma subclínica de manifestação é a mais frequente e de grande relevância, sobretudo, em função das perdas econômicas que gera, tanto pela diminuição da produção e da qualidade físico química do leite, quanto pela baixa qualidade higiênico-sanitária da matéria-prima para a industrialização, a comercialização e o consumo do leite e de seus derivados.

Os impactos gerados pela mastite subclínica estão diretamente relacionados à prevalência da doença e ao negligenciamento de medidas de controle e preventivas, baseadas na identificação dos principais fatores e dos agentes etiológicos envolvidos na causa do problema. Desse modo, faz-se necessária a realização de pesquisas voltadas à determinação da frequência e das principais causas da mastite subclínica nas diferentes regiões e condições de manejo, sistemas de produção, raças etc.

A presente revisão tem como objetivos fornecer informações sobre a mastite subclínica e seus impactos sobre a produção e sobre a qualidade do leite, o uso da contagem

de células somáticas (CCS) como parâmetro de detecção da doença, os principais microrganismos causadores da enfermidade e a utilização de animais mestiços Holandês-Gir.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de Leite no Brasil

A produção de leite no Brasil, nos últimos anos, vem crescendo em sintonia com o desenvolvimento econômico do país. Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura – FAO, através do relatório de perspectivas agrícolas OCDE/FAO 2017-2026, o crescimento das exportações de leite no país, através da depreciação da moeda em relação ao dólar, resultará no aumento da produção (FAO, 2017).

Aproximadamente cerca de 3,6 milhões de trabalhadores, em 1,3 milhões de propriedades, com uma produção em torno de 35,17 bilhões de litros, estão inseridos na cadeia do leite, que gera uma movimentação em torno de R\$ 64 bilhões/ano (IBGE, 2014). Mesmo apresentando o maior rebanho leiteiro do mundo, o Brasil ainda apresenta uma das piores produtividades médias entre os melhores países produtores. Hoje a média de produção é de 4,88 Kg de leite/vaca/dia, valor muito abaixo quando comparados a outros países produtores de leite, como os Estados Unidos, que apresenta média de 25,72 Kg de leite/vaca/dia (VILELA, 2013).

O aumento da produtividade e a melhoria da qualidade do leite constituem as principais metas da cadeia leiteira e possibilitam a manutenção dos produtores no mercado competitivo do agronegócio. Esse aumento, em termos de quantidade e qualidade do leite produzido, está diretamente relacionado às boas práticas de produção durante a coleta, ao armazenamento e transporte do leite, aos fatores zootécnicos como manejo, alimentação, potencial genético dos rebanhos, e principalmente, aos fatores sanitários da glândula mamária e do animal. O manejo adequado e o uso de animais adaptados aos diversos sistemas produtivos com diferentes níveis tecnológicos resultam em melhorias nos índices de produção.

2.2 Gado Holandês-Gir

Considerando o potencial genético dos rebanhos, o gado mestiço Holandês – Gir é responsável por aproximadamente 70 % do leite produzido no Brasil, sendo uma ótima opção para o aumento da produtividade média de leite no país. Esse grupo genético apresenta características funcionais como rusticidade, produtividade, precocidade, longevidade, fertilidade, além da alta capacidade de adaptação aos diferentes climas e sistemas de produção, desde sistemas totalmente extensivos com baixos níveis tecnológicos, até sistemas intensivos confinados com altos níveis tecnológicos (SILVA et al., 2015).

A utilização de grupos genéticos mais resistentes, em sintonia com o manejo correto zootécnico e sanitário, resulta em taxas menores de doenças. A mastite, por sua vez, é a alteração patológica que mais ocasiona perdas econômicas na produção leiteira no país e no mundo, além de ocasionar riscos à saúde pública. A genética desempenha um papel importante no controle dessa doença, visto que em termos de rebanho, algumas vacas dividem o mesmo ambiente e manejo e raramente se tornam infectadas, devido em grande parte dos casos, à variabilidade na resposta imune do hospedeiro à infecção (BISHOP, 2010).

2.3 Mastite

A mastite é a doença que mais onera a pecuária leiteira (SAAB et al., 2014), podendo ser apresentada na forma clínica e na forma subclínica. A forma clínica é de fácil identificação e apresenta sinais de inflamação e anormalidades visíveis. Dentre os sinais visíveis podemos destacar: aparecimento de edema, aumento na temperatura, aparecimento de grumos ou flocos no leite, exsudato purulento, e mudança na característica do leite (BENEDETTE et al., 2008). Ao contrário da clínica, a subclínica, não apresenta sinais clínicos evidentes, o que, na maioria das vezes, não é notado pelos produtores, tornando-a a forma mais predominante da doença. Estima-se que, para cada vaca com mastite clínica, existam em média sete, ou mais, com mastite subclínica (SANTOS et al., 2007)

Por não apresentar sintomatologia clínica, a mastite subclínica somente pode ser detectada pela elevação da contagem de células somáticas (CCS), que corresponde ao conjunto de células epiteliais de descamação do epitélio glandular e células de linhagem leucocitária, liberadas pelo sistema imune, em resposta a infecções da glândula mamária (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 2002). Essa forma de manifestação é a

responsável por grandes prejuízos na produção leite e encontra-se em boa parte dos rebanhos leiteiros, ocasionando redução na produção, maiores gastos com medicamentos, menores ganhos genéticos anuais e baixa intensidade de seleção (JARDIM et al., 2014).

2.4 Etiologia e patogenia da mastite

A identificação dos principais agentes etiológicos causadores de mastite e a associação destes com a contagem de células somáticas são ferramentas imprescindíveis para prevenir e controlar a doença nos rebanhos. O processo inflamatório é causado pela colonização de microorganismos como bactérias, fungos, leveduras e em casos raros, vírus podem estar etiológicamente envolvidos (SANTOS et al., 2007). Dentre os principais microorganismos causadores da mastite, estão: *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus sp*; *Pseudomonas sp*; *Escherichia coli*; *Corynebacterium sp*; *Enterobacter*; *Proteus*; *Citrobacter*; *Klebsiella*; *Serratia*; bacilos e algas do gênero *Prototheca*, entre muitas espécies de leveduras. Muitos microrganismos, dentre eles *Staphylococcus aureus* e algas do gênero *Prototheca* são responsáveis por causar mastite clínica de difícil tratamento (RADOSTITS et al., 2002).

A mastite pode ser classificada de acordo com o agente etiológico em Mastite contagiosa e Mastite ambiental (Tabela 1). Os agentes contagiosos vivem e se multiplicam sobre ou dentro da glândula mamária, sua transmissão ocorre de um animal infectado para outro animal sadio, ou de um teto afetado para outro teto sadio durante a ordenha. Eles se dispersam através dos tetos infectados, quer pelas máquinas de ordenha, quer através das mãos do ordenhador. Os principais microrganismos causadores da mastite contagiosa são *Staphylococcus aureus sp*, *Streptococcus agalactiae sp*, *Mycoplasma* e *Corynebacterium bovis sp* (SMITH, 1983).

Tabela 1. Agentes etiológicos contagiosos e ambientais causadores de mastites.

Agentes contagiosos	Agentes ambientais
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Mycoplasma spp.</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Corynebacterium bovis</i>	<i>Proteus spp.</i>
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>
	<i>Staphylococcus coagulase negativo</i>
	<i>Streptococcus uberis</i>
	<i>Leveduras, algas e fungos</i>

Fonte: Adaptado de Blowey & Edmonson, 2000.

A infecção por microrganismos ambientais que vivem no meio onde os animais são criados e durante a ordenha ocasiona mastite ambiental (OLIVER et al. 2004). Os agentes causadores de maior frequência são: *Streptococcus dysgalactiae* sp, *Streptococcus uberis* sp e *Streptococcus bovis* sp, *Enterococcus faecium* sp e *Enterococcus faecalis* sp., além de bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli* sp, *Klebsiella pneumoniae* sp e *Enterobacter aerogenes* sp (KULKAMI et al., 2013), algas como a *Prototheca zopfii* sp (BUENO et al., 2006), leveduras (COSTA et al., 2012) e fungos (ZHOU et al. 2013).

Bodman et al., (2001) mencionaram que o grupo dos microrganismos contagiosos assume importância, compreendendo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e uma série de patógenos envolvidos geralmente em infecções subclínicas de menor severidade. O patógeno *Staphylococcus* foi considerado por Pardo et al., (1998), o agente isolado mais frequente na etiologia de mastites em vacas primíparas no período pós-parto (64% das amostras positivas no exame bacteriológico). Segundo Hillerton et al., (1996), os *Streptococcus agalactiae* são os microrganismos melhor adaptados à glândula mamária, raramente são encontrados fora dela; geralmente estão envolvidos em doenças clínicas agudas e infecções subclínicas persistentes. Os *Streptococcus dysgalactiae* estão envolvidos com lesão nas tetas, sendo comumente associado à mastite no período seco.

Segundo Hogan et al., (2018a) o ambiente é definido como a associação de condições físicas que afetam o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência de um organismo ou grupo de organismos. É no ambiente que se origina o segundo grupo de patógenos envolvidos na mastite, incluindo *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Streptococcus uberis*, *Enterobacter* sp. e outros patógenos predominantemente oportunistas, que entram na glândula mamária quando os mecanismos de defesa estão comprometidos. Esses microrganismos requerem materiais orgânicos como alimento, ou até mesmo a água. Nesse sentido, alguns materiais utilizados como cama para os animais e a fonte da água podem promover um ambiente propício para propagação. A fonte de água pode contribuir para disseminação de mastite, principalmente causada por coliformes, pela contaminação por matéria fecal. De acordo com Hogan et al., (2018b), esses patógenos não sobrevivem por longos períodos de tempo na pele das tetas. Segundo Bradley et al., (2000), os patógenos ambientais são mais frequentes no período seco em relação ao período de lactação, podendo alguns animais desenvolver mastite crônica, agindo como reservatório de patógenos.

A patogenia da mastite pode ocorrer da seguinte forma: o microrganismo entra na glândula mamária via canal do teto, alcança o seio lactífero dos ductos coletores e alvéolos; a multiplicação do microrganismo estimula a atração de leucócitos originando a formação de edema e abscesso em alguns casos, ocorre a produção de toxinas que danificam o tecido secretor glandular, causando traumatismo físico e irritação química (KULKARNI et al, 2013); muitas vezes na cura, o tecido secretor glandular é substituído por tecido conetivo fibroso (SORDILLO et al., 2002).

A entrada dos agentes infecciosos no canal do teto representa um importante passo no processo de infecção (PICCININI et al., 2012). Esses agentes liberam substâncias que estimulam a migração de leucócitos a fim de combater os agentes agressores aumentando, dessa maneira, a contagem de células somáticas (CCS) (MACHADO et al., 2000).

2.5 Diagnóstico da mastite subclínica

No caso da mastite subclínica, o processo inflamatório somente pode ser detectado mediante realização de métodos diagnósticos baseados no conteúdo celular do leite, bem como através de exames bacteriológicos que forneçam informações sobre a prevalência e sobre o perfil dos agentes etiológicos envolvidos na doença. Vale ressaltar que quando não diagnosticada, a mastite subclínica pode se tornar crônica, levando à perda da funcionalidade da glândula mamária, e, conseqüentemente, a redução da produção leiteira.

O aumento da contagem de células somáticas (CCS) no leite, devido a migração de leucócitos para combater o agente da infecção, é a principal alteração alvo de métodos diagnósticos para mastite subclínica (PHILPOT et al, 2002). Esse aumento pode ser avaliado por diferentes testes, destacando-se o California Mastitis Test (CMT) e a Contagem Eletrônica de Células Somáticas (CECS).

O California Mastitis Test (CMT) é um dos testes mais populares e práticos para estimar a CCS, e consiste na adição de detergente aniônico neutro à uma amostra de leite, a fim de romper as membranas celulares e liberar o material nucléico, que por ser altamente viscoso. Esse teste permite estimar a quantidade de células da amostra segundo o grau de gelatinização obtido, onde a escala de valores para a interpretação varia de ausente a três cruzeiros (+++), ou de acordo com os seguintes escores : Escore 1- indica uma reação completamente negativa (sem presença de reação entre o reagente e o leite); Escore 2 -

reação suspeita (traços); Escore 3- reação fracamente positiva (+); Escore 4: reação positiva (++) e; Escore 5: reação fortemente positiva (+++), que equivalem a 100, 300, 900, 2700 e 8100 (x 1000 células/mL) (Tabela 2), respectivamente (PHILPOT et al, 1991).

Tabela 2. Relação entre o escore pelo California Mastitis Test (CMT) e a contagem de células simáticas (CCS).

Escore	Viscosidade	CCS
0	Ausente	100 000
Traços	Leve	300 000
+	Leve/Moderada	900 000
++	Moderada	2 700 000
+++	Intensa	8 100 000

Fonte: adaptado de Philpot & Nickerson, 1991.

2.6 Contagem de células somáticas (CCS) *versus* a produção e a qualidade do leite

A CCS é amplamente utilizada como indicador do estado geral da saúde da glândula mamária e como medida padrão para determinar a qualidade do leite (TSENKOVA et al., 2001). Durante o período de infecção, a CCS pode aumentar em média de 100 000 cél/ml a 1 000 000 cél/ml em apenas algumas horas, em animais saudáveis (RADOSTITIS et al., 2007). Esse aumento leva a um decréscimo da produção de leite, causando grandes prejuízos.

Essas perdas na produção de leite ocorrem devido às alterações nas células epiteliais secretoras e na permeabilidade vascular no alvéolo secretor durante a infecção. A extensão dessas perdas sofre influência de diversos fatores como o nível da infecção, tipo de microrganismo causador, duração, idade do animal, época do ano, estado nutricional e potencial genético (CUNHA et al., 2008a).

Além de ocasionar perdas à produção leiteira, a mastite subclínica altera a concentração dos principais componentes do leite, tais como: proteína, gordura e lactose. Os principais fatores relacionados com a alteração dos componentes do leite são as lesões das células produtoras de leite, que podem resultar em alterações da concentração de lactose, proteína e gordura, e aumento da permeabilidade vascular, que determina o aumento da passagem de substâncias do sangue para o leite, tais como sódio, cloro, imunoglobulinas e outras proteínas séricas (CUNHA et al., 2008b).

2.7 Principais fatores de risco para ocorrência da mastite

2.7.1 Estado fisiológico

A mastite pode ocorrer em diferentes etapas da vida do animal, podendo ser influenciada por diversos fatores. O parto, o período de lactação e período seco constituem eventos reprodutivos que podem ocasionar à mastite (ELBERS et al., 1998).

Durante o período seco, a glândula mamária passa por uma involução ativa, principalmente nas duas semanas seguintes à secagem da vaca (WALDNER, 2001). Autores afirmam que nessa fase a glândula continua a secretar leite, com o máximo acúmulo ocorrendo dois a três dias depois de suspensão do leite. A pressão originada na glândula, durante esse período, promove dilatação do canal da teta, predispondo à entrada de microrganismos para o interior do órgão (HURLEY et al., 2001a). Esses fatores favorecem a instalação da mastite subclínica, pelo fato de as bactérias não serem mais removidas durante a ordenha e a desinfecção da teta não ser mais realizada.

No início da lactação também há susceptibilidade devido ao estresse sofrido no parto; durante a lactação, no processo de ordenha, as vacas ficam mais susceptíveis a transmissão pela mastite contagiosa. Já nos intervalos entre ordenhas, a susceptibilidade recai sobre as mastites ambientais.

2.7.2 Genética e idade

Oliver et al., (2001) mencionaram que a ocorrência da mastite em novilhas com a idade de acasalamento ou gestantes, pode assumir grau significativo e persistir por longos períodos de tempo, estando associada à elevada contagem de células somáticas (CCS) e à redução substancial da produção pós-parto.

Esse aumento da CCS, em função do aumento da idade, também foi observado por Teixeira et al. (2003) em vacas da raça Holandesa, no Brasil. Segundo o autor, esse aumento pode ser atribuído possivelmente a maior oportunidade a exposição de agentes causadores de mastite e pelo prolongamento dos quadros de infecção.

Estudos sobre prevalência de mastite em vacas novilhas nas raças Jersey e Holandesa realizado por Nickerson et al.,(2009) onde verificou-se uma maior prevalência em animais da raça Jersey (67,7%), quando comparado à raça Holandesa (35%) (Nickerson et al., 2009) e por Pizzol et al., (2017) onde foi observado em vacas F1 Holandês X Jersey uma menor Contagem de Células Somáticas em comparação a vacas puras da raça Holandesa, mostram que esses resultados podem indicar uma possível maior resistência à mastite em vacas mestiças em relação a vacas puras.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Grandes perdas econômicas devido à redução na produção e na qualidade do leite ocasionadas pela mastite demonstram a importância que devemos dar à prevenção e controle desta enfermidade nos rebanhos leiteiros. Considerando que a mastite constitui uma doença plurietiológica e multifatorial, os estudos sobre a frequência da mastite subclínica, os principais microrganismos causadores da doença e a associação dos agentes etiológicos isolados com a contagem de células somáticas, contribuem para melhorias no manejo e ambiente. De forma direta, essas ações promovem o aumento da produção e melhorias na qualidade do leite e, proporcionam indiretamente, o desenvolvimento da bovinocultura leiteira.

Mastite subclínica em vacas com diferentes proporções genotípicas Holandês-Gir¹

Rafaelle S. Santana^{2*}, Chiara R. de A. Lopes³, Karla Patrícia C. da Silva³, Angelina B. Fraga⁴, Rafaelle Miguel da Silva⁵, Artur B. de Vasconcelos², Luís Gustavo Ramos de Moraes Calheiros⁶ e Rayane Thayse M. dos S. Carnaúba⁶

ABSTRACT.- Santana R.S., Lopes C.R.A., Silva K.P.C., Fraga A.B., Silva R.M., Vasconcelos A.B., Calheiros L.G.R.M., Carnaúba R.T.M.S. 2018. [Subclinical mastitis in cows with different genotypic proportions of Holstein-Gir] Mastite subclínica em vacas com diferentes proporções genotípicas Holandês-Gir. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Alagoas, Unidade Educacional Viçosa, Zona Rural, S/N, Viçosa, AL 57700-000, Brazil. E-mail: rafaelle.santanas@gmail.com

This study evaluated the occurrence of subclinical mastitis (SM) and carried out associations based on the main etiologic agents and somatic cell count (SCC) of crossbred cows of different Holstein and Gyr races. Data were obtained from the monthly California Mastitis Test (CMT) and the results of bacteriological tests and SCC of two dairy herds (herd A: predominance of 1/2 H 1/2 G; herd B: predominance of 3/4 H 1/4 G and 5/8 H 3/8 G 3/4, located in the semi-arid region of the State of Alagoas, Brazil. Statistical analyzes of the CMT test and bacteriological test results were performed using the chi-square test or Fisher's exact test. The comparisons using the SCC results were done using Student's t-test or the One-Way Analysis model, followed by the Tukey test. Herd A was the one most affected by occurrences of subclinical mastitis both by the CMT test ($p < 0.0001$), with 40.9% (11504/28141) of the cases evaluated versus 23.5% (5652/24100) of herd B, and by the microbiological tests, with 47.5% (38/80) of individual quarter milk samples of herd A were positive and 38.8% (31/80) of herd B ($p > 0.05$). There was no association of CMT test results with the time of year ($p > 0.05$), occurring in 32.4% (9454/29145) of the cases evaluated in the dry season and in 33.3% (7700/23094) of the cases evaluated in the rainy season. The main etiological agents isolated were *Staphylococcus* sp. (37%), *Streptococcus* sp. (25%), *Enterobacteriaceae* (16%) and *Corynebacterium* sp. (11%). Herds A and B did not differ in the number of infected quarters nor in the number of isolated microorganisms per animal ($p > 0.05$). The SCC of the samples composed by animal ranged from 15,800 to 2899,8 x1000 cells/mL, and presented a relation with the herds, number of infected quarters and number of microorganisms isolated per animal ($p < 0.05$). SCC was significantly higher for cows with four infected quarters and for cows with two or more than two microorganisms isolated from healthy ones ($p < 0.05$). Higher SCC values ($> 1\ 000\ 000$) were found in the presence of mixed infection (associations) by *Staphylococcus* sp., with one or more microorganisms of the genera *Micrococcus* sp., *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* sp. and *Corynebacterium* sp.; in mixed infection by *Streptococcus* sp. and *Corynebacterium* sp. and by *Enterobacteriaceae* and *Bacillus* sp.

INDEX TERMS: California mastitis test. Epidemiology. Holstein. Gyr. Mastitis. Somatic cell.

¹ Recebido em 21 de Setembro de 2018.

² Mestranda em Medicina Veterinária, Faculdade Medicina Veterinária (FMV), Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Unidade Educacional Viçosa, Zona Rural, S/N, Viçosa, AL 57700-000, Brasil. *Autor para correspondência: rafaelle.santanas@gmail.com.

³ Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Unidade Educacional Viçosa, Zona Rural, S/N, Viçosa, AL 57700-000, Brasil.

⁴ Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias (CECA/UFAL), BR 104, Km 85, s/n, Rio Largo, AL 57100-000.

⁵ Plantel Agropecuária LTDA, Rodovia AL 220, Km 02, São José da Tapera, AL 57445-000.

⁶ Graduando, Faculdade Medicina Veterinária (FMV), Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Unidade Educacional Viçosa, Zona Rural, S/N, Viçosa, AL 57700-000, Brasil.

RESUMO.- Este estudo avaliou a frequência da mastite subclínica (MS) e realizou associações a partir dos principais agentes etiológicos isolados e da contagem de células somáticas (CCS) de vacas mestiças de diferentes proporções genotípicas das raças Holandesa e Gir. Os dados foram obtidos a partir do California Mastitis Test (teste CMT) mensal e dos resultados dos exames bacteriológicos e da CCS de dois rebanhos leiteiros (rebanho A: predominância de 1/2 H 1/2 G; rebanho B: predominância de 3/4 H 1/4 G e de 5/8 H 3/8 G, localizadas na região semiárida do Estado de Alagoas, Brasil. Os resultados mostraram que o rebanho A foi o mais afetado pela mastite subclínica, tanto pelo teste CMT ($p < 0,0001$), com 40,9% dos casos avaliados (11504/28141) versus 23,5% (5652/24100) do rebanho B, quanto pelos exames microbiológicos, em que 47,5% (38/80) das amostras por quarto mamário do rebanho A foram positivas e 38,8% (31/80) do rebanho B ($p > 0,05$). Não houve associação dos resultados do teste CMT com a época do ano ($p > 0,05$), ocorrendo em 32,4% dos casos avaliados

na época seca (9454/29145) e em 33,3% dos casos avaliados na época chuvosa (7700/23094). Os principais agentes etiológicos isolados foram *Staphylococcus* sp. (37%), *Streptococcus* sp. (25%), *Enterobacteriaceae* (16%) e *Corynebacterium* sp. (11%). Os rebanhos A e B não diferiram quanto ao número de quartos infectados, nem quanto ao número de microrganismos isolados por animal ($p > 0,05$). A CCS das amostras compostas por animal variou de 15,800 a 2899,8 x 1000 cél/mL apresentando relação com os rebanhos, com o número de quartos infectados e com o número de microrganismos isolados por animal ($p < 0,05$). A CCS foi significativamente maior para as vacas que apresentaram os quatro quartos mamários infectados e para as vacas com dois ou acima de dois microrganismos isolados, em relação às sadias ($p < 0,05$). Maiores valores de CCS ($> 1\ 000\ 000$) foram encontrados na presença de infecção mista (associações) por *Staphylococcus* sp., com um ou mais microrganismos dos gêneros *Micrococcus* sp., *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* sp. e *Corynebacterium* sp.; na infecção mista por *Streptococcus* sp. e *Corynebacterium* sp. e por *Enterobacteriaceae* e *Bacillus* sp. A frequência da mastite subclínica detectada pelo California Mastitis Test (teste CMT) e a magnitude da contagem de células somáticas (CCS) foram maiores para o rebanho com predominância de vacas 1/2 Holandês-Gir em relação ao rebanho com predominância de vacas 3/4 e 5/8 Holandês-Gir, sugerindo diferenças na resposta imune e/ou diferenças estruturais e de manejo, entre os rebanhos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: California Mastitis Test. Epidemiologia. Holandês. Gir. Mastite. Células somáticas.

INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa a quinta posição no *ranking* mundial de produção de leite, com 35,17 bilhões de litros por ano, gerando uma movimentação, em toda sua cadeia, de cerca de R\$ 64 bilhões/ano (IBGE 2014). Aproximadamente 70% dessa produção provêm de mestiços Holandês-Zebu, sobretudo de mestiços Holandês-Gir, (Madalena et al. 2012). Grande parte dessa produção é atribuída à numerosa população nacional de bovinos leiteiros, uma vez que diversos fatores negativos, relacionados ao manejo, à nutrição e ao controle de doenças nos rebanhos, coloca o país muito aquém de outros países produtores, em termo de produtividade.

A mastite, inflamação da glândula mamária, geralmente por etiologia infecciosa, conduz a uma série complexa de eventos que reduz a atividade sintética da glândula, provoca mudanças na composição do leite e eleva a contagem de células somáticas (CCS) (Medeiros et al. 2011). Epidemiologicamente, a mastite subclínica é a forma mais importante da doença, pois, diferente da forma clínica, não apresenta alterações macroscópicas na glândula nem no leite, podendo permanecer silenciosa no rebanho, por longo período de tempo. Sua detecção ocorre apenas pela elevação da CCS, que corresponde ao conjunto de células epiteliais descamativas, mais os leucócitos liberados pelo sistema imune, em resposta a infecções da glândula mamária (IDF 2002).

A mastite pode ser classificada em contagiosa ou ambiental, de acordo com os microrganismos envolvidos. Os agentes etiológicos causadores da mastite contagiosa vivem e se multiplicam sobre ou dentro da glândula mamária e sua transmissão ocorre de animal para animal ou de teto para teto, durante a ordenha. Os principais patógenos contagiosos são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma* e *Corynebacterium bovis* sp. (Smith 1983). Por sua vez, a mastite ambiental é causada por microrganismos que vivem no meio onde os animais são criados. São eles, em maior frequência o *Streptococcus dysgalactiae*, os *Streptococcus uberis* e *Streptococcus bovis*, o *Enterococcus faecium* e o *Enterococcus faecalis*, além de bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes* (Kulkarni & Kaliwal 2013). Além disso, os agentes etiológicos podem ser divididos segundo a patogenicidade em patógenos primários, que incluem *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Arcanobacterium pyogenes*, e em patógenos secundários, como o *Staphylococcus coagulase-negativos* e *Corynebacterium bovis* (Mello et al. 2012).

A distribuição de cepas de patógenos da mastite difere entre animais dentro de rebanho, entre rebanhos, entre países e entre espécies hospedeiras (Armer et al. 2018). Dados dos últimos dez anos sobre a mastite em ruminantes no Brasil, indicaram que a prevalência da mastite subclínica variou de 10% a 48,64% na espécie bovina, destacando-se a etiologia por *Staphylococcus* sp. (Acosta et al. 2016). Diferenças genéticas entre raças também influenciam a resistência a doenças (Kelm et al. 2001), porém poucos estudos têm sido realizados no Brasil avaliando os aspectos da mastite subclínica em mestiços das raças Holandês e Gir.

Diante dos impactos da mastite subclínica sobre a produção leiteira e da escassez de estudos etiológicos da doença em vacas mestiças das raças Holandês e Gir, o presente estudo objetivou avaliar a frequência da mastite subclínica e a associação entre os microrganismos isolados e a CCS obtida em propriedades de bovinos leiteiros mestiços Holandês e Gir.

MATERIAL E MÉTODOS

Rebanhos. Os dados avaliados no presente estudo mediante a realização de dois experimentos, foram obtidos de vacas em lactação de dois rebanhos (Rebanho A e Rebanho B) pertencentes a duas fazendas distintas, especializadas na produção de leite, cujas coordenadas geográficas são 09 31' 17" S e 36 45' 33" W, temperatura média de 24,8 C e precipitação de 640 mm e 09 37' 10" S e 37 14' 36" W, temperatura média de 24,6 C e precipitação média de 618 mm, respectivamente. Localizados na região da bacia leiteira do Estado de Alagoas, Brasil. No rebanho A haviam em média 278 vacas em lactação, com média de produção diária de 3.800 litros de leite. No rebanho B havia aproximadamente 335 vacas, produzindo em média 6.000 litros de leite/dia. Os dois rebanhos realizavam sistema-intensivo de produção, com assistência médica veterinária e fornecimento de alimentação volumosa à base de gramíneas fenadas, palma forrageira e silagem de sorgo, além de concentrado composto de farelo de soja, farelo de trigo, milho moído e minerais, sistema mecanizado de ordenha, com duas ordenhas diárias e adoção de pré-dipping e pós-dipping,

As diferenças observadas entre os rebanhos avaliados relacionavam-se, basicamente, às proporções genótípicas dos animais, ao fornecimento de concentrado e às instalações da sala e do curral de ordenha, apenas. Os animais do rebanho A, com predominância de 1/2 H 1/2 G, eram alimentados antes da ordenha, a sala de ordenha não possuía revestimento cerâmico e a estrutura tanto da sala de ordenha quanto do curral de espera, propiciava o acúmulo de fezes, de umidade e a proliferação de moscas. Os animais do rebanho B, com predominância de 3/4 H 1/4 G e de 5/8 H 3/8 G, eram alimentados depois da ordenha e a sala de ordenha possuía revestimento cerâmico e curral de espera mais limpo e arejado. Além disso, apenas os animais do rebanho A, os mestiços, 1/2 H 1/2 G, eram submetidos ao uso da ocitocina, para estimular a decida do leite.

Esta pesquisa cumpriu Princípios Éticos para Pesquisa Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (Protocolo n. 65/2017).

Experimento 1 - Frequência da mastite pelo California Mastitis Test (CMT). Os dados foram obtidos a partir do teste CMT mensal de dois rebanhos leiteiros (A e B), no período de maio de 2015 a janeiro de 2018, totalizando 52.541 observações. Amostras por quarto mamário apresentando escores 1 (-) ou 2 (traços) no teste CMT foram consideradas negativas para a mastite subclínica; Amostras com escores 3 (+), 4 (++) ou 5 (+++), foram consideradas positivas (Philpot & Nickerson, 1991). Os resultados foram tabulados e analisados, de forma a verificar a associação da composição genética predominante nos dois rebanhos leiteiros (rebanho A: predominância de 1/2 H 1/2 G; rebanho B: predominância de 3/4 H 1/4 G e de 5/8 H 3/8 G) e com a época do ano (chuvosa: de março a agosto; seca: de setembro a fevereiro), mediante o teste do qui-quadrado.

Cálculo estatístico. Os resultados das frequências dos exames microbiológicos foram tabulados para verificar a associação dos fenótipos (rebanhos A: predominância de 1/2 H 1/2 G; rebanho B: predominância de 3/4 H 1/4 G e de 5/8 H 3/8 G) com o número de quartos infectados (0, 1, 2, 3 ou 4) e com o número de microrganismos isolados por animal (1, 2 ou >2), pelo teste do qui-quadrado ou pelo teste Exato de Fisher, ao limite mínimo de significância de 0,05, mediante o programa estatístico Epi Info™ versão 7.2.2.6.

Experimento 2 - Estudo microbiológico e contagem de células somáticas (CCS). Em abril de 2018, foram obtidas aleatoriamente dos dois rebanhos avaliados (A e B), 160 amostras de leite por quarto mamário, para exames bacteriológicos, e 80 amostras de leite compostas por animal, para a CCS. Após a realização do teste da caneca telada, a primeira e a última vaca clinicamente sadias foram selecionadas de cada lote a ser ordenhado, para colheita das amostras, até completar a amostragem de 20 animais.

Amostras. Após a higienização dos tetos com solução de *pré-dipping* e a secagem com papel toalha, procedeu-se a desinfecção do orifício do teto com algodão embebido em álcool 70°GL. Amostras de leite por quarto mamário e amostras compostas dos quatro quartos por animal foram coletadas diretamente em frascos Falcon estéreis. As amostras por quarto mamário foram refrigeradas e encaminhadas ao laboratório, para exames bacteriológicos, e as amostras compostas, dos quatro tetos, foram analisadas imediatamente após a coleta, para quantificação das células somáticas.

Isolamento e identificação. O material foi semeado pela técnica de esgotamento de alça em 120 placas de Petri contendo meio ágar-sangue de ovinos a 5% (40/120), meio ágar-verde brilhante (40/120) e meio Agar Centrimide (40/120). Em seguida, as placas foram incubadas em estufas bacteriológicas, por 48 horas, em ambiente de aerobiose, a 37 °C. As amostras foram submetidas à observação de características macroscópicas e microscópicas do agente.

Contagem de células somáticas (CCS). A quantificação das células somáticas foi realizada durante a colheita do leite, mediante equipamento Contador Eletrônico de Células Somáticas - DCC da marca Delaval®, que

utiliza emissão de luz de frequência específica, para deixar as células somáticas fluorescentes, e a captura da imagem com óptica especializada.

Cálculo estatístico. Com o intuito de linearizar os dados, a CCS foi transformada em escore linear de células somáticas $ECS = [\log_2(CCS/100)] + 3$ (Shook 1993). A normalidade e a homocedasticidade dos dados foram verificadas pelos testes de Shapiro-Wilk e de Levene, respectivamente.

Após a transformação dos dados, a CCS das dos rebanhos (A e B) foram comparadas pelo teste t de Student. A influência do número de quartos infectados por animal (0, 1, 2, 3 ou 4) e do número de microrganismos isolados por animal (1, 2 ou >2) sobre a CCS foi verificada através do modelo de Análise de Variância (One-Way), seguido do teste de Tukey, ao nível mínimo de significância de 0,05, mediante o pacote Rcommander do programa estatístico R (Landeiro, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Experimento 1 - Frequência da mastite pelo California Mastitis Test (CMT)

A propriedade A, com predominância de vacas 1/2 H 1/2 G, foi a mais afetada pela mastite subclínica (MS) ($p < 0,0001$), com 40,9% (11504/28141) dos casos avaliados *versus* 23,5% (5652/24100) dos casos avaliados na propriedade B, com vacas predominantemente 3/4 e 5/8 Holandês-Gir. A MS não diferiu entre as épocas do ano ($p > 0,05$), ocorrendo em 32,4% (9454/29145) dos casos avaliados na época seca e em 33,3% (7700/23094) dos casos avaliados na época chuvosa.

Em concordância com os achados no presente estudo, dados dos últimos dez anos sobre a mastite em ruminantes no Brasil, indicaram que a prevalência da MS variou de 10% a 48,64% na espécie bovina (Acosta et al. 2016), sendo estimada em 46,4%, em estudo com 1.809 rebanhos leiteiros brasileiros (Busanello et al. 2017). Entretanto, tendo em vista o nível de prevalência aceitável de 15% para as manifestações subclínicas (Ribeiro et al. 2006), o elevado número de infecções mamárias nos rebanhos amostrados revela a necessidade de adoção sistemática de medidas de controle e profilaxia da MS.

A menor frequência da doença na propriedade B pode ser atribuída a causas genéticas, relativas à maior resistência à mastite pelos animais 3/4 e 5/8 Holandês-Gir, assim como, ao manejo alimentar e a estrutura física de suas instalações (sala de ordenha e curral de ordenha). Os animais da propriedade A, predominantemente 1/2 Holandês-Gir, eram alimentados antes da ordenha e a sala de ordenha não possuía revestimento cerâmico, favorecendo, assim, o acúmulo de água, de fezes e a consequente infestação por moscas. Os animais da propriedade B, com predominância de 3/4 e de 5/8 Holandês-Gir, eram alimentados depois da ordenha e a sala de ordenha possuía revestimento cerâmico. Além disso, apenas os animais da propriedade A eram submetidos ao uso da ocitocina, para estimular a decida do leite.

Vale ressaltar que o presente estudo foi realizado em condições de semiárido, em que o período seco (verão) é caracterizado como quente e seco e o período chuvoso (inverno) como pouco úmido (geralmente há baixa pluviosidade) e com temperaturas mais amenas. Além disso, muitas vezes a temperatura ambiental permanece satisfatória ao crescimento microbiano, favorecendo, assim, a manutenção de um ambiente propício à disseminação dos germes ambientais ao longo do ano, independentemente da estação climática (Costa et al. 2015). De acordo com Mello et al., 2012 a maior prevalência da MS no verão ocorre devido a maior facilidade de proliferação dos microrganismos em temperaturas mais elevadas, associadas à alta umidade.

Experimento 2 - Estudo microbiológico e contagem de células somáticas (CCS)

Perfil microbiológico

Os exames bacteriológicos mostraram que 47,5% (38/80) e 38,8% (31/80) das amostras por quarto mamário dos rebanhos A e B foram positivas ($p < 0,05$) respectivamente. Isto foi condizente com os resultados obtidos pelo teste CMT.

O perfil bacteriano mostrou que das 69 amostras de leite por quarto mamário positivas no exame bacteriológico: 37% continham *Staphylococcus* sp.; 25% *Streptococcus* sp.; 16% *Enterobacteriaceae* e 11% *Corynebacterium* sp. Verificou-se ainda que *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. e *Enterobacteriaceae*, constituíram 80% da frequência de microrganismos observada (Fig.1). Tais resultados corroboram com diversos estudos realizados nas diferentes regiões do Brasil, em que *Staphylococcus* sp. foi o gênero mais prevalente nos casos de mastites nas espécies de ruminantes (Acosta et al. 2016). No agreste pernambucano, região em que as condições climáticas se assemelham a região da bacia leiteira de Estado de Alagoas, onde o presente estudo foi realizado, foi observada frequência de 66,43% de *Staphylococcus aureus* (Sá et al. 2015).

Staphylococcus sp. e *Corynebacterium* sp., são caracterizados como patógenos secundários devido a baixa patogenicidade (Harmon, 1994). Entretanto, apesar da baixa patogenicidade, a infecção por *Staphylococcus*

sp. ocasiona altos valores na contagem de células somáticas (CCS), redução na produção de leite, taxas de cura extremamente baixas (SÁ et al., 2015), além de causar redução nas concentrações de proteína e de lactose do leite, possivelmente devido a alterações sofridas no tecido secretor da glândula mamária (França et al. 2017). Mastites por *Staphylococcus* sp. são contagiosas e a infecção pode ocorrer de uma glândula mamária infectada para uma sadia, ressaltando-se a importância de medidas de controle higiênicas e terapêuticas adequadas para fins de redução dos índices de MS nos rebanhos.

Streptococcus sp. e *Enterobacteriaceae* que também tiveram percentuais consideráveis nos isolamentos, são classificados (exceto *S. agalactiae*) como microrganismos ambientais (Radostits et al. 2002), presentes em locais como na água, no solo e/ou na cama dos animais. Elevadas frequências desses microrganismos no leite indicam problemas relacionados à falta de higiene no manejo antes, durante e/ou após a ordenha.

A avaliação da mastite de acordo com padrão de infecção é de relevada importância, pois possibilita a adoção de estratégias distintas para fins de prevenção e controle da doença nos rebanhos.

Considerando os resultados por animal, 25% (5/20) e 35% (7/20) dos animais das propriedades A e B, respectivamente, estavam sadios. Os demais apresentaram um ou mais quartos infectados e um ou mais tipos de microrganismos isolados, sendo considerados, portanto, positivos para a MS (Quadro 1). As propriedades A e B não diferiram quanto ao número de quartos infectados, nem quanto ao número de microrganismos isolados por animal ($p > 0,05$) (Quadro 1).

Quadro 1. Frequência de quartos mamários infectados e do número de microrganismos isolados, por animal, segundo o rebanho

<u>Nº de quartos infectados por animal</u>	0	1	2	3	4
Rebanho A	5 (25,%)	3 (15%)	5 (25%)	3 (15%)	4 (20%)
Rebanho B	7 (35%)	3 (15%)	4 (20%)	4 (20%)	2 (10%)
Total	12 (30%)	6 (15%)	9 (22,5%)	7 (17,5%)	6 (15%)

<u>Nº de microrganismos isolados por animal</u>	1	2	>2
Rebanho A	7 (46,7%)	6 (40%)	2 (13,3%)
Rebanho B	5 (38,5%)	7 (53,8%)	1 (7,7%)
Total	12 (43%)	13 (46%)	3 (11%)

Teste Exato de Fisher: $p > 0,05$. (propriedade 1: predominância de 1/2 Holandês + 1/2 Gir; propriedade 2: predominância de 3/4 Holandês + 1/4 Gir e de 5/8 Holandês + 3/8 Gir)

Observou-se que 30% do total de animais de ambos os rebanhos (12/40) estavam sadios, não apresentando nenhum quarto mamário infectado. Os demais apresentaram infecção por patógenos em um, dois, três ou quatro quartos mamários, na ordem de 15%, 22,5%, 17,5% e 15%, respectivamente. Estudo semelhante revelou maior prevalência de mastite em um quarto único, seguido por dois e quatro quartos, e menor prevalência em três quartos mamários (Kurjogi e Kaliwal 2014).

Quanto ao número de microrganismos identificados por animal, um único agente etiológico foi identificado em 43% das vacas infectadas. Entretanto, em 46% dos animais com mastite, foram identificados dois patógenos e em 11% das vacas positivas, acima de dois microrganismos causadores de mastite (Quadro 1).

Contagem de células somáticas

A contagem de células somáticas (CCS) das amostras compostas por animal variou de 15,800 a 2899,8 x1000 cél./mL. A magnitude da CCS apresentou relação com as propriedades, com o número de quartos infectados e com o número de microrganismos isolados por animal (Quadro 2).

A propriedade A, com predominância de vacas 1/2 H 1/2 G, apresentou média de CCS (996.950 cél./mL) acima do limite máximo (500.000 cél./mL) estabelecido pela legislação brasileira (Brasil 2016), e superior a média de CCS da propriedade B (356.850 cél./mL), com vacas predominantemente 3/4 e 5/8 Holandês-Gir ($p < 0,05$) (Quadro 2).

A CCS foi significativamente maior para as vacas que apresentaram os quatro quartos mamários infectados em relação as sadias ($p < 0,05$). As médias de CCS obtidas a partir de animais com dois quartos infectados apresentaram valores que ultrapassam o limite de 500.000 cél./mL preconizado pela legislação brasileira (Brasil 2016).

A CCS de animais sadios não diferiu da CCS de animais com um microrganismo isolado ($p > 0,05$). Entretanto, tanto os animais com um microrganismo isolado, como aqueles com dois e acima de dois patógenos isolados apresentaram média de CCS acima do limite estabelecido de 500.000 cél./mL (Brasil 2016).

Contagens celulares de 200.000, 500.000, 800.000 e 1.000.000/mL indicam diminuição na produção de leite de 6%, 9%, 11% e 12%, respectivamente (Philpot e Nickerson 1991). Desse modo, estima-se que os rebanhos avaliados apresentem perdas semelhantes em termos de produção.

Quadro 2 Contagem de células somáticas (CCS) e escore de células somáticas (ECS), de acordo com o rebanho, com o número de quartos infectados por animal e com o número de microrganismos isolados por animal.

Fonte de variação	Nº de amostras	CCS (x 1000 cel/mL)	ECS	IC 95% _{ECS}	CV	p*
Rebanhos						
A	20	996,950	5,465	4,515	6,414	0,37
B	20	356,850	4,054	3,260	4,848	0,42
Nº de quartos infectados por animal						
0	12	288,917	3,245 ^a	2,267	4,222	0,64
1	6	494,333	4,616 ^{ab}	3,860	5,371	0,35
2	7	705,444	5,114 ^{ab}	4,305	5,923	0,34
3	9	555,143	5,206 ^{ab}	4,754	5,659	0,19
4	6	1734,667	6,879 ^b	1,018	7,356	0,15
Nº de microrganismos isolados por animal						
0	12	288,917	3,245 ^a	2,267	4,222	0,64
1	12	636,083	5,035 ^{ab}	4,343	5,728	0,30
2	13	843,077	5,403 ^b	4,643	6,162	0,30
>2	3	1672,000	6,925 ^b	6,547	7,304	0,12

Comparação entre rebanhos: Teste t de Student; Demais comparações: ANOVA (One-Way). IC 95%_{ECS}: intervalo de confiança de 95% para o escore de células somáticas; CV: coeficiente de variação; p: probabilidade do erro; letras diferentes na mesma coluna indicam diferença entre os escores de células somáticas (ECS).

Em pesquisa realizada no Estado de Goiás, valores de CCS médios de 382.000, 293.000 e 460.000 cél/mL foram obtidos dos genótipos 1/2, 3/4 e 5/8 Holandês-Gir, respectivamente ($p > 0,05$) (Melo et al. 2015). Em contrapartida, a maioria dos estudos comparativos da mastite entre vacas holandesas e raças zebuínas, bem como entre animais de diferentes genótipos dos cruzamentos Holandês-Zebu, tem demonstrado maior prevalência para a raça Holandesa ou para os mestiços com maior fração genética desta raça (Nóbrega & Langoni 2011, Kurjogi & Kaliwal 2014, Rahman et al. 2009, Biffa et al. 2005), sobretudo em decorrência da seleção voltada à produção de leite para a raça Holandesa (Heins et al. 2008), em detrimento à resistência e à rusticidade. Cabe ressaltar que as diferenças quanto à predominância de genótipos, outros fatores relacionados ao ambiente, como o manejo e aspectos estruturais das propriedades avaliadas, podem ter influenciado os resultados da CCS observados no presente estudo.

Associação dos agentes etiológicos isolados com a contagem de células somáticas

Do total de vacas avaliadas 70% (28/40) apresentaram infecção por um, dois ou acima de dois patógenos da mastite. Para avaliar a associação da CCS com os agentes etiológicos, amostras de leite por animal foram agrupadas por CCS em intervalos de até 200.000, entre 200.000 e 499.000, de 500.000 a 1.000.000 e acima de 1.000.000 de cél./mL, de acordo com os microrganismos isolados (Quadro 3).

Das amostras positivas 75% apresentaram valores médios de CCS acima do limite máximo de 500.000 estabelecido pela legislação brasileira (Brasil 2016). Em 25% das amostras a CCS estava abaixo de 500, assim como as amostras negativas que apresentaram CCS no intervalo de 200-500 x 100 cél./mL.

Os maiores valores de CCS (>1.000.000) foram encontrados na presença de infecção mista (associações) por *Staphylococcus* sp, com um ou mais microrganismos dos gêneros *Micrococcus* sp, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* sp e *Corynebacterium* sp.; na infecção mista por *Streptococcus* sp e *Corynebacterium* sp e por *Enterobacteriaceae* e *Bacillus* sp. (Quadro 3), demonstrado que alguns gêneros bacterianos exercem maior influência sobre a contagem de células somáticas.

Em estudo onde os microrganismos isolados foram agrupados em contagiosos (*S. aureus* e *S. agalactiae*), ambientais (outros *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Enterococcus* spp. e *Enterobacter* sp.), secundários (*Corynebacterium* spp., *Arcanobacterium* spp., *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo, *Staphylococcus* spp.

coagulase-positivo e levedura) e associações, os maiores valores de CCS foram encontrados na presença de infecção mista (associações) e na presença de patógenos classificados como ambientais (Carvalho et al. 2007).

Quadro 3 Contagem de células somáticas (CCS), número de vacas positivas no exame bacteriológico (N) e respectivo(s) microrganismo(s) isolado(s) por animal

CCS x 1000 cel./mL Ocorrência (%)	N	Microrganismos
>1000 7 (25%)	1	<i>Staphylococcus</i> sp e <i>Micrococcus</i> sp;
	2	<i>Staphylococcus</i> e <i>Enterobacteriaceae</i>
	1	<i>Staphylococcus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> e <i>Micrococcus</i> sp;
	1	<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> sp, <i>Enterobacteriaceae</i> e <i>Corynebacterium</i> sp
	1	<i>Streptococcus</i> sp e <i>Corynebacterium</i> sp
	1	<i>Enterobacteriaceae</i> + <i>Bacillus</i> sp
501-1000 14 (50%)	1	<i>Staphylococcus</i> sp + <i>Streptococcus</i> sp + <i>Candida</i> sp
	1	<i>Enterobacteriaceae</i> + <i>Corynebacterium</i> sp
	3	<i>Staphylococcus</i> sp + <i>Corynebacterium</i> sp
	6	<i>Staphylococcus</i> sp
	3	<i>Streptococcus</i> sp
200-500 1 (4%)	1	<i>Streptococcus</i> sp + <i>Enterobacteriaceae</i>
≤200 6 (21%)	3	<i>Enterobacteriaceae</i>
	1	<i>Escherichia coli</i> sp + <i>Salmonella</i> sp
	1	<i>Staphylococcus</i> sp + <i>Streptococcus</i> sp
	1	<i>Staphylococcus</i> sp + <i>Candida</i> sp
Total	28 (70%)	

Tanto *Streptococcus* spp. quanto coliformes aumentaram a CCS e diminuíram a produção de leite, além de ocasionarem aumento no teor de proteína e redução na concentração de lactose, respectivamente (Franca et al. 2017). Em infecções por coliformes, como *Enterobacteriaceae*, a produção de endotoxina, durante a fase de multiplicação, é responsável pela diminuição da produção de leite, além de febre, perda de peso e, desidratação (Santos e Fonseca, 2007).

CONCLUSÕES

A frequência da mastite subclínica detectada pelo California Mastitis Test (teste CMT) e a magnitude da contagem de células somáticas (CCS) foram maiores para o rebanho com predominância de vacas 1/2 Holandês-Gir em relação ao rebanho com predominância de vacas 3/4 e 5/8 Holandês-Gir, sugerindo diferenças na resposta imune e/ou diferenças estruturais e de manejo, entre os rebanhos.

Não houve influência dos períodos seco e chuvoso sobre a frequência da MS nos rebanhos avaliados, indicando que, em condições de semiárido, a época do ano não constitui fator relevante sobre a frequência da doença.

Staphylococcus spp é o gênero de maior relevância nas propriedades avaliadas, com frequência de 37%.

As bactérias dos gêneros *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae* e *Corynebacterium* também merecem destaque na etiologia da mastite subclínica nas propriedades estudadas, ressaltando-se a importância da adoção de medidas higiênico-sanitárias e terapêuticas pelas propriedades avaliadas.

A CCS varia em função do número de quartos mamários infectados e do número de microrganismos isolados por animal.

Alguns gêneros bacterianos exercem maior influência sobre a contagem de células somáticas e indicam quais estratégias utilizar para prevenção e controle da MS na população alvo de vacas leiteiras.

Instalações apropriadas com saneamento adequado, rastreamento regular para detecção e tratamento precoces da MS, utilização de linha de ordenha e descarte de vacas mais velhas com infecções recorrentes, são medidas recomendadas para o controle da mastite subclínica e para a redução dos impactos causados pela doença nos rebanhos.

REFERÊNCIAS

- Acosta A.C., Silva L.B.G., Medeiros, E.S., Pinheiro-Júnior, J.W. & Mota R.A. 2016. Mastites em ruminantes no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 36(7):565-573.
- Amer S., Gálvez F.L.A., Fukuda Y., Tada C., Jimenez I.L., Valle W.F.M., & Nakai Y. 2018. Prevalence and etiology of mastitis in dairy cattle in El Oro Province, Ecuador. *J. Vet. Med. Sci.* 80(6): 861-868.
- Biffa D., Debela E. & Beyene F. 2005. Prevalence and risk factors of mastitis in lactating dairy cows in Southern Ethiopia. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 3(3):189-198.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 07 de 03 de maio de 2016. Dispõe sobre alterações no regulamento técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte do leite. *Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1*, 84 maio. 2016.
- Busanello M., Rossi R.S., Cassoli L.D., Pantoja J.C.F. & Machado P.F. 2017. [Estimation of prevalence and incidence of subclinical mastitis in a large population of Brazilian dairy herds.](#) *J Dairy Sci.* 100(8):6545-6553.
- Carvalho L.B., Amaral F.R., Brito M.A.V.P. & Lange C.C. Contagem de células somáticas e isolamento de agentes causadores de mastite em búfalas (*Bubalus bubalis*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59(1):242-245.
- Costa H.N., Molina L.R., Facury Filho E.J., Moreira G.H.F.A. & Carvalho A.U. 2015. Estudo longitudinal da mastite subclínica e produção de leite em um rebanho mestiço Holandês-Zebu criado em sistema semi-intensivo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.67, n.6, p.1501-1509.
- França, M.M., Del Valle, T.A., Campana, M., Veronese, L.P., Nascimento, G. & Morais, J.P.G. 2017. Mastitis causative agents and SCC relationship with milk yield and composition in dairy cows. *Arch Zootec* 2017;66:45-49.
- Harmon, R.J. 1994. Symposium – mastitis and genetic evaluation for somatic-cell count – physiology of mastitis and factors affecting somatic-cell counts. *J Dairy Sci*, 77: 2103-2112.
- Heins B.J., Hansen L.B., Seykora A.J., Hazel A.R., Johnson D.G. & Linn J.G. 2008. Crossbreds of Jersey x Holstein compared with pure Holsteins for body weight, body condition score, dry matter intake, and feed efficiency during the first one hundred fifty days of first lactation. *J Dairy Sci.* 91:3716-3722.
- IBGE/Produção da Pecuária Municipal. Rio de Janeiro: IBGE, v. 42, p.1-39, 2014.
- IDF - International dairy Federation. Statistics: the world dairy situation. 2002. *Bulletin of International Dairy Federation, Document 378.* p. 46-47.
- Kelm S.C., Freeman A.E. & Kehrli Jr M.E. 2001. Genetic control of disease resistance and immunoresponsiveness. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 17:477-493.
- Kulkarni A.G. & Kaliwal B. 2013. Bovine mastitis: a review. *Int. J. Recent Sci. Res.* 4:543-548.
- Kurjogi M.M. & Kaliwal B.B. 2014. Epidemiology of Bovine Mastitis in Cows of Dharwad District. *International Scholarly Research Notices.* Article ID 968076. doi:10.1155/2014/968076
- Madalena, F.E., Peixoto, M.G.C.D. & Gibson, J. 2012. Dairy cattle genetics and its applications in Brazil. *Liv. Res. Rural Develop.* 24:97.

- Medeiros E.S., Barbosa S.B.P., Jatobá R.B., Azevedo, S.S., Pinheiro-Junior J.W., Saukas, T.M., Albuquerque P.P.F., Mota R.A. 2011. Perfil da contagem de células somáticas na infecção intramamária em búfalas na Região Nordeste do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 31(3):219-223.
- Mello P.L., Agostinis R.O., Barzon E.M., Colombo R.B., Silva A.V. & Martins L.A. 2012. Prevalência da mastite subclínica e associação dos agentes etiológicos com a contagem de células somáticas de vacas leiteiras da região Sudoeste do Paraná. *Vet. e Zootec.* 19(4):513-521.
- Nóbrega D.B. & Langoni H. 2011. Breed and season influence on milk quality parameters and in mastitis occurrence. *Pesq. Vet. Bras.* 31(12):1045-1052.
- Philpot W.N. & Nickerson S.C. 1991. *Mastitis: counter attack. A strategy to combat mastitis.* Naperville: Babson Bros, 150p.
- Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C. & Hinchcliff K.W. 2002. *Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos.* 9ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. p. 541-629.
- Rahman M.A., Bhuiyan M.M.U., Kamal M.M. & Shamsuddin M. 2009. Prevalence and risk factors of mastitis in dairy cows, *Bangladesh Veterinarian*, 26(2):54-60.
- Ribeiro M.E.R., Petrini L.A., Barbosa R.S., Zanela M.B., Gomes J.F., Stumpf Jr W., et al. 2006. Ocorrência de mastite causada por nocardia spp. em rebanhos de unidades de produção leiteira no sul do Rio Grande do Sul. *Revta Bras Agrocienc.* 12:471-3.
- Sá M.E.P., Mota R.A., Souza M.I., Oliveira, A.A.F. 2015. Etiologia da mastite subclínica em bovinos leiteiros do agreste meridional do Estado de Pernambuco. *R. bras. Ci. Vet.* 7(2):100-103.
- Santos, M.V. & Fonseca, L.F.L. 2007. Estratégias para controle de mastite e melhoria na qualidade do leite: contagem de células somáticas e o efeito da mastite sobre a qualidade do leite. 1ª ed. Manole, Barueri, 314p.
- Smith K.L. 1983. Mastitis control: a discussion. *J. Dairy Sci.* 66:1790-1794.

Legendas das Figuras

Fig.1. Frequência relativa e acumulada dos agentes etiológicos isolados.

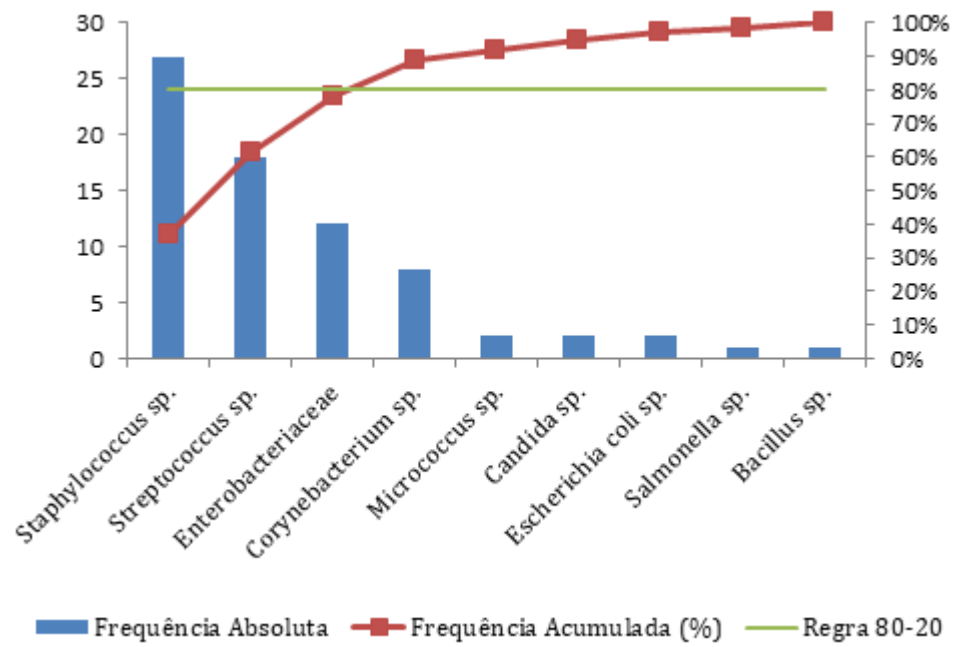


Figura 1

REFERÊNCIAS

BENEDETTE, M. F.; SILVA, D.; ROCHA, F. P. C. Mastite Bovina. Revista científica eletrônica de medicina veterinária, n.11, 2008.

BISHOP, S.C. Disease resistance: Genetics. Encyclopedia of animal science. Marcel Dekker, Inc. New York. p. 288-290. 2010.

BODMAN, G.R., RICE, D.N. Mastitis is a disease – Control is an every task. [online] Disponível em: <http://digitalcommons.unl.edu/extensionhist/498/>. [Data de acesso: 10 de julho de 2018].

BRADLEY, A.J., GREEN, M.J. A study of the incidence and significance of intramammary enterobacterial infections acquired during the dry period. Journal Dairy Science, v. 83, n. 9, p. 1957-1965. 2000.

BUENO, V.F.F., Mesquita A.J., Dias Filho F.C. Prototheca zopfii: importante patógeno na etiologia da mastite bovina no Brasil. Ciênc. Anim. Bras. 7:273-283. 2006.

CUNHA, R.P.L.; MOLINA, L.R.; CARVALHO, A.U. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.60, n.1, p.19-24, 2008.

ELBERS, A.R.W., MILTENBURG, J.D., DE LANGE, D., CRAUWELS, A.P.P., BARKEMA, H.W., SCHUKKEN, Y.H. Factors for clinical mastitis in a random sample of dairy herds from the Southern part of the Netherlands. Journal Dairy Science, v. 81, n. 2, p. 420-426, 1998.

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. Relatório de perspectivas OCDE- FAO 2017. [online]. Disponível em

<http://www.fao.org/americas/noticias/ver/pt/c/992188/>. Data de acesso: 17 de Outubro de 2018.]

HILLERTON, J.E. Controle da mastite bovina. In: WORKSHOP SOBRE PROGRAMA DE CONTROLE INTEGRADO DA MASTITE BOVINA, Juiz de Fora, 1996. Anais. Juiz de Fora: Embrapa. p. 6-21. 1996.

HOGAN, J.S., SMITH, K.L. Environmental streptococcal mastitis. [online]. Disponível em <http://wdmc.org/2007/hogan.pdf>. [Data de acesso: 08 de setembro de 2018].

HURLEY, W.L., MORIN, D.E. Factors affecting susceptibility to mastitis. Lactation biology. Disponível: <http://www.classes.aces.uiuc.edu/AnSci308/> [Data de acesso: 21 de março de 2018].

IBGE/Produção da Pecuária Municipal. Rio de Janeiro: IBGE, v. 42, p.1-39, 2014.

IDF - International dairy Federation. Statistics: the world dairy situation. Bulletin of International Dairy Federation, Document 378. p. 46-47. 2002.

JARDIM, J.G.; QUIRINO, C.R.; PACHECO, A.; LIMA, G.R.S.. Melhoramento genético visando à resistência a mastite em bovinos leiteiros. Arch. Zootec., v. 63, p. 199-219, 2014.

KULKARNI, A.G. et al. Bovine mastitis: a review. Int. J. Recent Sci. Res. 4:543-548. 2013.

LADEIRA, S.R.L. Mastite bovina. Doenças em ruminantes e eqüinos. Pelotas: Universitária/UFPel. Cap. 3. p. 248-260. 1998

LANDEIRO, V. L. Introdução ao uso do programa R. Programa de Pós Graduação em Ecologia, 2011. Disponível em [http:// https://cran.r-project.org/doc/contrib/Landeiro-Introducao.pdf](http://https://cran.r-project.org/doc/contrib/Landeiro-Introducao.pdf) [Data de acesso: 15 de Outubro de 2018].

MADALENA, F.E. et al. J. Dairy cattle genetics and its applications in Brazil. *Liv Res Rural Develop*, 24: 97, 2012.

MARTINS, A. et al. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal. v.9, n.2, 206-214, abr - jun . 2015.

NICKERSON, S.C. et al. Mastitis control in replacement heifers. 2009. *Veterinary microbiology*, v.134. pág., 128-135. 2009. [online]. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811350800374X>. [Data de acesso: 09 setembro de 2018].

OLIVER, S.P.; GILLESPIE, B.E.; HEADRICK, S.J. Efficacy of extended ceftiofur intramammary therapy for treatment of subclinical mastitis in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.87, p.2393-2400, 2004.

PARDO, P.E., METTIFOGO, E., MÜLLER, E.E., NASCIMENTO, E.R., BUZINHANI, M., YAMAGUTI, M., FREITAS, J.C. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas no pós-parto. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 18, n. 3, p. 115-118, 1998.

PHILPOT, W.N., NICKERSON, S.C. Mastitis: counter attack. A strategy to combat mastitis. Naperville: Babson Bros, 150p. 1991.

PHILPOT W.N.; NICKERSON S.C. Vencendo a luta contra mastite. Naperville – IL: Westfalia Surge Inc. 192p. 2000.

PHILPOT, N.W.; NICKERSON, S.C. Vencendo a luta contra a mastite. Piracicaba: Westfalia Surge/Westfalia Landtechnik do Brasil. 192p. 2002.

PICCININI, R. et al. Study of *Staphylococcus aureus* collected at slaughter from dairy cows with chronic mastitis. *Journal of Dairy Research*. 79 249–255. 2012.

Pizzol, J.G. Dal, Gomes, I.P.O., Braun, W., Lisboa, J.A.N., Flaiban, K.K.M.C., & Thaler Neto, A.. (2017). Comparação entre vacas puras Holandês e mestiças Holandês x Jersey

quanto à sanidade, imunidade e facilidade de parto. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 69(4), 955-961.

RADOSTITS, O. M. et al. Mastite. In: Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, caprinos e equinos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap.15, p.541-629, 2002.

RADOSTITS, O.M, GAY, C.C, HINCHCLIFF, K.W., CONSTABLE, P.D. Veterinary Medicine, A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10 th edition, Saunders Elsevier Company. 2007.

SAAB, A.B. et al. Prevalence and etiology of bovine mastitis in the Nova Tebas, Parana. *Semina: Ciênc. Agrárias* 35:835-843. 2014.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade de Leite. Pirassununga: Ed. Manole, 2007.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade de Leite. Pirassununga: Ed. Manole, 314 p. 2007.

SILVA M.V.G.B. et al. Programa de melhoramento genético da raça Girolando. Sumário de touros. Resultados do teste de progênie. 3ª prova de pré-seleção de touros – Julho 2015, Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 74 p. 2015.

SMITH, K.L. Mastitis control: a discussion. *J. Dairy Sci.* 66:1790-1794. 1983.

SORDILLO, L. M. et al. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 7:135-146. 2002.

TORRES, A.D.P. Melhoramento dos rebanhos: noções fundamentais. 3 ed. Revisada e ampliada. São Paulo: Ed. Nobel. 399p. 1981.

TSENKOVA, R.; ATANASOVA, S.; OZARI, Y.; TOYODA, K.; ITOH, K. Near infrared spectroscopy for biomonitoring: influence of somatic cell count on cow's milk composition analysis. *International Dairy Journal*, v.11, n.10, p.779-783, 2001.

VILELA, G. H. P. Potencial de uso de gado Girolando na produção leiteira. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais. 2013.

WALDNER, D.N. Dry cow therapy for mastitis control. [online]. Disponível em <http://www.dairyweb.ca/Resources/USWebDocs/DryCowTreatment.pdf>. [Data de acesso: 02 de Setembro de 2018.]

ZHOU, Y. et al. Survey of mycotic mastitis in dairy cows from Heilongjiang Province, China. *Trop. Anim. Health Proc.* 45:1709-1714. 2013.

ANEXO I

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A submissão de artigos à revista “Pesquisa Veterinária Brasileira” (PVB) deve ser feita em Word, através do Sistema ScholarOne, *link* <<https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo>>

A tramitação somente pode ter início se o seu artigo estiver rigorosamente dentro das normas de apresentação da revista, de acordo com as Instruções aos Autores, o modelo no site da revista e os últimos fascículos publicados (www.pvb.com.br). Na verificação de falhas de apresentação, o artigo será devolvido aos autores para as devidas correções.

Os autores podem submeter seus artigos em **Inglês** ou em **Português**, mas sempre com um Resumo em português. No caso de artigos aceitos escritos em **Português**, estes serão traduzidos para o **Inglês** pela Editora Cubo; pois todos os artigos publicados na PVB serão em inglês. Para os artigos já submetidos em **Inglês**, os autores devem apresentar via ScholarOne um Certificado de Tradução de uma empresa habilitada ou de um Tradutor Nativo. **Essa regra vale para artigos submetidos a partir de 1 de janeiro de 2018.**

Os pagamentos da taxa de publicação (*Paper Charge*) serão cobrados na ocasião do envio da comunicação de aceite por e-mail:

(1) Artigos submetidos em inglês, R\$ 1.500,00 (US\$ 480.00) por artigo;

(2) Artigos submetidos em português, R\$ 2.000,00 (US\$ 640.00) por artigo, incluindo as despesas com a tradução.

O **texto** deve ser formatado, em todos os pormenores, de acordo com as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br).

Se o artigo for submetido fora das normas de apresentação, a tramitação somente ocorrerá após as devidas correções feitas pelo autor.

A PVB publica Artigos Originais, Artigos de Revisão Crítica e Tópicos de Interesse Geral; não publica artigos com a denominação de *Short Communications*.

Os Artigos Originais devem conter resultados de pesquisa ainda não publicados ou submetidos para outros periódicos.

Artigos de Revisão de Literatura, submetidos a convite, devem constituir-se de análise crítica, de assuntos na área de experiência dos autores, isto é, quando os autores já tiverem publicado anteriormente artigos sobre o assunto.

Os raros Tópicos de Interesse Geral devem constituir-se de assuntos de grande importância atual baseado na vasta experiência dos autores.

As opiniões e conceitos emitidos nos artigos submetidos são de responsabilidade dos autores. O Conselho Editorial da PVB, com a assistência da Assessoria Científica, pode sugerir ou solicitar modificações. Os artigos submetidos são avaliados pelos pares (*peer review*) e, aceitos para publicação com dois pareceres favoráveis, ou rejeitados por dois pareceres desfavoráveis.

Os direitos autorais dos artigos aceitos para publicação permanecem com os autores.

1. Os artigos devem ser organizados em **TÍTULO, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES** (de preferência os últimos três separadamente), **Agradecimentos, Declaração de conflito de interesse e REFERÊNCIAS:**

a) O **TÍTULO** deve ser conciso e indicar o conteúdo do artigo; pormenores de identificação científica devem ser colocados em **MATERIAL E MÉTODOS**.

b) **O(s) Autor(es) com numerosos primeiros nomes e sobrenomes, deve(m) padronizar o seu “nome para publicações científicas”,** como por exemplo: Cláudio Severo Lombardo de Barros, escreve Cláudio S.L. Barros ou Barros C.S.L.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F. **Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores.** O autor para correspondência deve ser um autor que garante o contato com o Conselho Editorial da PVB. Asteriscos de chamadas para o rodapé devem ser mais uma vez elevados (sobrescritos), para aparecerem maiores e mais nítidos.

c) O **Cabeçalho do ABSTRACT** deve conter, além dos nomes dos autores abreviados invertidos, o ano, o **TÍTULO**, o endereço postal do laboratório (inclusive o CEP) ou instituição principal onde foi desenvolvida a pesquisa. Endereços postais brasileiros não devem ser traduzidos para o inglês, mesmo em artigos escritos na língua inglesa, a fim de evitar dificuldade na postagem. Devem-se conferir os nomes dos autores do artigo e do Cabeçalho do Abstract para evitar discrepâncias.

d) O **Rodapé da primeira página** deve conter os endereços profissionais postais completos dos autores (evitando-se traços horizontais), na língua do país do respectivo autor (em português, espanhol, inglês) e seus e-mails; o e-mail do autor para correspondência deve ser sublinhado. Os sinais de chamada para os nomes dos autores devem ser números arábicos, colocados em sobrescrito, sem o uso automático de “Inserir nota de fim”, do Word (essas chamadas devem ser contínuas por todo artigo, isto é, em todas as notas de rodapé das outras páginas).

e) O **ABSTRACT** deve ser uma versão do **RESUMO**, mas pode ser mais explicativo, seguido de “INDEX TERMS” que devem incluir termos do título, por não se tratar somente de “ADDITIONAL INDEX TERMS”.

f) O **RESUMO** deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos “TERMOS DE INDEXAÇÃO” que incluem termos do título, por não se tratar somente de “TERMOS DE INDEXAÇÃO ADICIONAIS”.

g) A **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal e deve finalizar com a indicação do objetivo do artigo.

h) **MATERIAL E MÉTODOS** deve reunir a totalidade dos dados que permitam o desenvolvimento de trabalho semelhante por outros pesquisadores.

i) Em **RESULTADOS** devem ser apresentados concisamente os dados obtidos.

j) Na **DISCUSSÃO** devem ser confrontados os resultados diante da literatura. Não convém mencionar artigos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los.

k) **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados obtidos e devem ser apresentados em diferentes parágrafos (uma Conclusão somente deve ser apresentada em parágrafo único).

l) Os **Agradecimentos** não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé; devem ser sucintos e colocados antes da Declaração de conflito de interesse e da Lista de Referências.

m) A **Declaração de conflito de interesse** é obrigatória e deve ser mencionada nos casos positivos ou negativos; deve ser sucinta e colocada imediatamente antes da Lista de Referências.

n) A Lista de **REFERÊNCIAS** deve incluir todas as citações apresentadas no texto e que tenham servido como fonte para consulta. A Lista deve ser ordenada alfabética e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido de todos os demais autores (em caixa alta e baixa), do ano, do título da publicação citada, e abreviado (por extenso em casos de dúvida) o nome do periódico. Sugerimos consultar exemplos dos últimos fascículos (www.pvb.com.br).

(Notem: (1) As Referências citadas no texto devem ser colocadas em ordem cronológica, mas alfabética tratando-se de referências do mesmo ano; (2) Quando utilizados programas de formatação (p.ex. Endnote X7), remover o fundo automático cinzento antes da submissão, para não dificultar eventuais correções.

2. Na elaboração do texto devem ser atendidas as seguintes normas:

a) Fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples; página formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), texto corrido em uma coluna justificada, com as Legendas das Figuras no final (logo após a Lista de REFERÊNCIAS) sem repetir as legendas junto com as Figuras.

b) **ABSTRACT** e **RESUMO** serão escritos em um só parágrafo corrente e não devem conter citações bibliográficas.

c) A redação dos artigos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal.

d) Os nomes científicos usados no manuscrito devem ser apresentados por extenso (p.ex. *Palicourea marcgravii*), no início de cada capítulo (**TÍTULO, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, etc.**), quando aparecem pela primeira vez, seguido da abreviação do gênero (p.ex. *P. marcgravii*).

e) Nos títulos dos Quadros e nas Legendas das Figuras os nomes científicos devem ser apresentados por extenso, já que estes são independentes do texto.

f) No texto, os sinais de chamada para notas de rodapé devem ser números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o artigo; as notas deverão ser lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo número de chamada, sem o uso do “Inserir nota de fim”, do Word.

Notem: para evitar a separação em duas linhas, os numerais devem ser apresentados junto com suas unidades, ou seja, sem espaçamento, por exemplo: 100ppm, 10mm, 50cm, 18x10cm, (P<0,05), 15h; de conveniência quando seguida de letra alta (35 kg ou 35kg, 4 h ou 4h). A abreviação de número é “no” e não “no”; grau Celsius é “oC” e não “oC”.

g) Os Quadros (não usar o termo Tabela) e as Figuras devem ser citados no texto, pelos respectivos números, em ordem crescente e devem ser submetidos separadamente do texto!

h) Siglas e abreviações das instituições, ao aparecerem pela primeira vez, deverão ser colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso;

i) Citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”, p.ex. (Caldas 2005); artigos de até dois autores serão citados pelos nomes dos dois (Pedroso & Pimentel 2013); e com mais de dois, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano (Brito et al. 2015); se dois artigos não se distinguirem, a diferenciação será feita através do acréscimo de letra minúscula ao ano (Barros 2017a, 2017b). A ordem de citação deve ser cronológica (Barbosa et al. 2003, Armién et al. 2004).

j) **Recomenda-se consultar na íntegra todos os artigos citados**; se isto não for possível, deve-se colocar no texto a referência original (não consultada na íntegra) seguida do ano, p.ex. (Bancroft 1921); na Lista de Referências deve ser incluída a referência original como: Bancroft 1921. título. ... periódico. (Apud Suvarna & Layton 2013). A referência consultada também deve ser incluída na Lista de Referências.

k) O uso de “comunicação pessoal” e de “dados não publicados” deve ser feito apenas em casos excepcionais; no texto com citação de Nome e Ano, e na Lista de Referências como: Barbosa 2016. Comunicação pessoal (Universidade Federal do Pará, campus Castanhal).

l) As **Legendas das Figuras** devem conter informações suficientes para sua compreensão (independente do texto); e devem ser precedidas de “Fig.” seguida do número sem espaço, p.ex. “Fig.8. ...”. Para elaboração das legendas sugerimos consultar exemplos nos últimos fascículos (www.pvb.com.br).

(Notem: Na legenda de Figuras compostas deve-se colocar a letra de cada “subfigura” em **negrito** com parênteses claros antes do texto correspondente e devem ser mencionados letras ou sinais, que estão dentro de cada “subfigura”, em parênteses e claros após o respectivo texto da legenda.)

m) O Título dos **Quadros** devem ser em **negrito**, sem ponto, e a “garganta” (título das colunas) deve ser escrita em claro e separada por dois traços longos horizontais; o Título dos Quadros e da “garganta” devem ser escritas em caixa alta e baixa. Os Quadros (não usem o termo Tabela) devem conter os resultados mais relevantes. Não há traços verticais, nem fundos cinzentos; excepcionalmente pode conter traços horizontais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, com “a” em cada Quadro. As chamadas de rodapé deverão ser lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda; e devem evitar números arábicos. Os títulos não têm ponto no final, ao passo que as legendas terminam com um ponto. Os Quadros devem ser apresentados em Word e ser editáveis, a fim de inserirmos eventuais alterações de apresentação, dentro das normas da revista.

n) Dados complexos devem ser expressos por Gráficos (devem ser chamados de **Figuras**). Os gráficos devem ser produzidos em 2D, sem fundo e sem linhas horizontais.

3. Apresentação das Figuras:

- a) As imagens devem ser salvas em 300 dpi, arquivo TIF.
- b) Numerar cada figura separadamente (1, 2, ...).
- c) Figuras com assuntos similares (subfiguras) devem ser agrupadas em pranchas com espaço entre elas de aprox. 1mm. Identifique cada imagem com uma letra maiúscula (A, B, ...) colocada no canto inferior esquerdo, de preferência fonte Arial 14, branca, em um quadro preto sem bordas.
- d) Usar, de preferência, barras de escala para indicar o aumento; para micrografias ópticas apresentar na legenda sempre o método de coloração e a objetiva, p. ex.: HE, obj.40x.
- e) As legendas de Figuras devem conter inicialmente o que se observa na imagem, seguida das informações adicionais (Formato típico da legenda = Fig.1. Descrição da imagem. Diagnóstico, órgão ou tecido, espécie animal, número do caso. Método de coloração e objetiva.).

4. Todas as referências citadas no texto devem ser incluídas na Lista de Referências e vice-versa; na revisão final do artigo pelos autores, antes da submissão, isto deve ser conferido criteriosamente, para evitar discrepâncias (o sistema ScholarOne bloqueia automaticamente artigos com discrepâncias).

Exemplos de Referências

- Artigos publicados em periódicos:

Pavarini S.P., Soares M.P., Bandarra P.M., Gomes D.C., Bandinelli M.B., Cruz C.E.F. & Driemeier D. 2011. Mortes súbitas causadas por *Amorimia exotropa* (Malpighiaceae) no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 31(4):291-296.

Hooiveld M., Smit L.A., Wouters I.M., Van Dijk C.E., Spreeuwenberg P., Heederik D.J. & Yzermans C.J. 2016. Doctor-diagnosed health problems in a region with a high density of concentrated animal feeding operations: a cross-sectional study. *Environ. Health* 17:15-24.

(Notem: Os iniciais dos autores devem ser colocados sem espaço. O sinal “&” é usado para separar o penúltimo do último autor. As primeiras letras das palavras do título de artigos publicados em periódicos científicos devem ser de preferência minúsculas. A palavra “Revista” deve ser abreviada como “Revta” em diferença a “Rev.”, do inglês “Review”. Deve-se indicar o número do respectivo volume do periódico e, se possível, também do fascículo. Somente abreviações tem um ponto, exceto as que terminam com a última letra da palavra em extenso. O traço entre as páginas é curto (-) e não comprido. Não devem ser usados “ponto-vírgulas” (;) em lugar de vírgulas.

➤ Livros:

Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro, p.305-348.

Marsh P. & Martin M. 1992. Oral Microbiology. 3rd ed. Chapman and Hall, London, p.167-196.

(Notem: A primeira letra de termos do título de livros deve ser maiúscula. Devem ser mencionadas as páginas que foram consultadas, em vez do total de páginas do livro.

➤ Capítulos de livros:

Barros C.S.L. 2007. Doenças víricas: leucose bovina, p.159-169. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), Doenças de Ruminantes e Equídeos. Vol.1. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria.

Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. Plantas que afetam o funcionamento do coração, p.27-94. In: Ibid. (Eds), Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro.

(Notem: As primeiras letras das palavras do título de capítulos de livros são minúsculas, mas as de livros são maiúsculas.)

➤ Dissertações e Teses:

Silva R.M.M. 2016. Prevalência, identificação e distribuição das lesões abscedativas em caprinos e ovinos abatidos em um matadouro frigorífico no Estado da Bahia. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas. 56p.

Sant’Ana V.A.C. 2004. Proteinograma do leite de vacas: padrões e variabilidade. Tese de Doutorado, Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP. 161p.

(Notem: (1) Deve-se evitar se referir a Dissertações ou Teses em vez de aos artigos baseados nas mesmas e publicados em periódicos científicos que são de mais fácil acesso. (2) Não deve-se tentar de publicar o texto de Dissertação ou Tese praticamente na íntegra sem escrever um artigo conciso de seus resultados.

➤ Resumos publicados em eventos:

Mendonça F.S., Almeida V.M., Albuquerque R.F., Chaves H.A.S., Silva Filho G.B., Braga T.C., Lemos B.O. & Riet Correa F. 2016. Paralisia laríngea associada à deficiência de cobre em caprinos no semiárido de Pernambuco (IX Endivet, Salvador, BA). *Pesq. Vet. Bras.* 36(Supl.2):50-51. (Resumo)


Pierezan F., Lemos R.A.A., Rech R.R., Rissi D.R., Kommers G.D., Cortada V.C.L.M., Mori A.E. & Barros C.S.L. 2007. Raiva em equinos. *Anais XIII Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Campo Grande, MS*, p.145-146. (Resumo)

(Note: Evitar na consulta o uso de Resumos ao invés de artigos na íntegra!)

ANEXO II

Comprovante de submissão do artigo “Mastite subclínica e associação dos agentes etiológicos com a contagem de células somáticas em vacas mestiças Holandês-Gir” à Revista Pesquisa Veterinária Brasileira

21/09/2018 ScholarOne Manuscripts

 Pesquisa Veterinária Brasileira

[Home](#)

[Author](#)

Submission Confirmation [Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to
Pesquisa Veterinária Brasileira

Manuscript ID
PVB-6140

Title
Mastite subclínica e associação dos agentes etiológicos com a contagem de células somáticas em vacas mestiças Holandês-Gir

Authors
Santana, Rafaelle
Lopes, Chiara
Silva, Karla Patrícia
Fraga, Angelina
Silva, Rafaelle
Vasconcelos, Artur
Calheiros, Luis Gustavo
Carnaúba, Rayane Thayse

Date Submitted
21-Sep-2018

[Author Dashboard](#)