

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**FATORES DE RISCO PARA MASTITE BOVINA E AVALIAÇÃO
FENOTÍPICA DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA**

Thamara Venâncio de Almeida
Orientador: Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau

GOIÂNIA

2020



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o(a) autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do(a) autor(a): Thamara Venâncio de Almeida

Título do trabalho: Fatores de risco para mastite bovina e avaliação fenotípica de resistência antimicrobiana

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Independente da concordância com a disponibilização eletrônica, é imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Thamara Venâncio de Almeida
Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente de acordo:

Prof. Edmar Soares Nóbrega
Coordenador
Centro de Pesquisa em Saúde (CPS)

Assinatura do(a) orientador(a)*

Data: 30 / 03 / 2020

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento. Imagens coladas não serão aceitas.

THAMARA VENÂNCIO DE ALMEIDA

**FATORES DE RISCO PARA MASTITE BOVINA E AVALIAÇÃO
FENOTÍPICA DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora
em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária e
Zootecnia da Universidade Federal de Goiás

Área de concentração:

Saúde Animal, Tecnologia e Segurança de alimentos

Orientador:

Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau - EVZ/UFG

Comitê de Orientação:

Profa. Dra. Clarice Gebara Muraro Serrate Cordeiro - EVZ/UFG

Profa. Dra. Ozana de Fátima Zacaroni - EVZ/UFG

GOIÂNIA

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Almeida, Thamara Venâncio de
FATORES DE RISCO PARA MASTITE BOVINA E AVALIAÇÃO
FENOTÍPICA DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA [manuscrito] /
Thamara Venâncio de Almeida. - 2020.
xv, 81 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau; co-orientadora Dra.
Clarice Gebara Muraro Serrate Cordeiro; co-orientador Dr. Ozana de
Fátima Zacaroni .

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de
Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Goiânia, 2020.

Bibliografia. Anexos.

Inclui tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. contagem de células somáticas. 2. mastite clínica. 3. mastite
subclínica. 4. *Staphylococcus aureus*. 5. susceptibilidade
antimicrobiana. I. Nicolau, Edmar Soares, orient. II. Título.

CDU 63



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº 289 da sessão de Defesa de Tese de Thamara Venâncio de Almeida que confere o título de Doutor(a) em Ciência Animal, na área de concentração em Saúde Animal, Tecnologia e Segurança de alimentos.

Aos vinte e oito dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte a partir da(s) 13h30min, no(a) sala 03 (auditório) do setor de Pós-Graduação da EVZ/UFG, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada "Fatores de risco para mastite bovina e avaliação fenotípica de resistência antimicrobiana". Os trabalhos foram instalados pelo(a) Orientador(a), Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau (EVZ/UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Prof.ª Dr.ª Fernanda Antunha de Freitas Alves (Itambé), membro titular externo; Prof. Dr. Fernando Nogueira de Souza (UFPB) membro titular externo; Prof.ª Dr.ª Cíntia Silva Minafra e Rezende (EVZ/UFG), membro titular interno; Prof. Dr. Marco Antônio Pereira da Silva (IFGoiano), membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido o(a) candidato(a) aprovada pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo(a) Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos vinte e oito dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por Edmar Soares Nicolau, Professor do Magistério Superior, em 28/02/2020, às 17:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 69, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Cíntia Silva Minafra E Rezende, Professora do Magistério Superior, em 28/02/2020, às 17:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 69, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Fernanda Antunha de Freitas Alves, Usuário Externo, em 28/02/2020, às 17:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 69, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Marco Antônio Pereira da Silva, Usuário Externo, em 28/02/2020, às 17:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 69, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

25/03/2020

SEI/UFMG - 1181487 - Ata de Defesa de Tese



Documento assinado eletronicamente por Fernando Nogueira de Souza, Usuário Externo, em 28/02/2020, às 17:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 68, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1181487 e o código CRC EADDCA29.

Referência: Processo nº 23070.004468/2020-05

SEI nº 1181487

Dedico aos meus pais

Saulo Carlos e Maura Venâncio

E ao meu esposo

Juan Carlos

AGRADECIMENTOS

A Deus. *“Eis que Deus é o meu ajudador; o Senhor é quem sustenta a minha vida.” Salmos 54:4*

Aos meus pais, Saulo Carlos de Almeida e Maura Venâncio Xavier Almeida, pelo amor e apoio incondicional. Cada conquista em minha vida é graças a vocês. Obrigada por tudo.

Ao meu esposo, Juan Carlos Roberto Saavedra More, que esteve sempre ao meu lado e não mediu esforços na realização deste trabalho. Compartilho com você o mérito desta conquista.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau, pela oportunidade, confiança e valiosos ensinamentos.

À minha coorientadora Prof^a Dr^a Clarice Gebara Muraro Serrate Cordeiro, pelos ensinamentos que tanto contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

À minha coorientadora, Prof^a Dr^a Ozana de Fátima Zacaroni, pela contribuição na melhoria deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Maria Auxiliadora Andrade, pela atenção e presteza de sempre.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa em Alimentos, pela solicitude com que sempre me ajudaram.

Aos colegas de pós-graduação, pelos bons momentos compartilhados.

Ao Prof. Dr. Vantuil Moreira De Freitas, pela boa vontade e contribuição neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Emmanuel Arnhold, pela disponibilidade e ajuda imprescindível na análise estatística.

Ao Serviço Nacional de Aprendizagem Rural (SENAR Goiás), nas pessoas de Guilherme Brandão Gonçalves Bizinoto, Joás Barbosa Bueno e Kelen Sousa Alves, pela parceria na realização deste trabalho

Aos amigos Flávia, José Rodolfo, Thiago, Wanessa e Rebeka, pelo companheirismo, apoio e preciosa amizade.

Muito obrigada a todos que de alguma forma participaram desta etapa da minha vida.

“Não é o crítico que importa; nem aquele que aponta onde foi que o homem tropeçou ou como o autor das façanhas poderia ter feito melhor. O crédito pertence ao homem que está por inteiro na arena da vida, cujo rosto está manchado de poeira, suor e sangue; que luta bravamente; que erra, que decepciona, porque não há esforço sem erros e decepções; mas que, na verdade, se empenha em seus feitos; que conhece o entusiasmo, as grandes paixões; que se entrega a uma causa digna; que, na melhor das hipóteses, conhece no final o triunfo da grande conquista e que, na pior, se fracassar, ao menos fracassa ousando grandemente”.

Theodore Roosevelt

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. A mastite.....	3
2.2. Patógenos causadores de mastite.....	5
2.3. Fatores de risco para mastite.....	7
2.4. Mastite e uso de antimicrobianos.....	10
2.5. Resistência antimicrobiana.....	11
2.6. Mecanismos de transferência horizontal de genes.....	13
2.7. Testes para detecção de resistência antimicrobiana.....	15
REFERÊNCIAS.....	18
CAPÍTULO 2 – FATORES DE RISCO PARA MASTITE SUBCLÍNICA EM REBANHOS LEITEIROS DO ESTADO DE GOIÁS, BRASIL.....	25
RESUMO.....	25
ABSTRACT.....	26
1. INTRODUÇÃO.....	27
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.1. Checklist.....	28
2.2. Coleta de amostras de leite para avaliação de mastite subclínica.....	29
2.3. Análise de Contagem de células somáticas.....	30
2.4. Análise estatística.....	30
3. RESULTADOS.....	31
4. DISCUSSÃO.....	38
5. CONCLUSÕES.....	41
REFERÊNCIAS.....	42

SUMÁRIO

CAPÍTULO 3 – RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA FENOTÍPICA EM PATÓGENOS GRAM POSITIVOS CAUSADORES DE MASTITE CLÍNICA E SUBCLÍNICA EM VACAS LEITEIRAS.....	45
RESUMO.....	45
ABSTRACT.....	46
1. INTRODUÇÃO.....	47
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
2.1. Coleta de amostras de leite de mastite subclínica.....	49
2.2. Coleta de amostras de leite de mastite clínica.....	49
2.3. Isolamento bacteriano.....	50
2.4. Teste de sensibilidade a antimicrobianos.....	50
2.5. Análise dos dados.....	51
3. RESULTADOS.....	53
4. DISCUSSÃO.....	59
5. CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS.....	65
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
ANEXO I.....	68
ANEXO II.....	72
ANEXO III.....	75
ANEXO IV.....	80

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Resposta da glândula mamária à invasão bacteriana.....	3
Figura 2 – Profundidade do úbere. Base do úbere acima do jarrete (ideal) e base do úbere abaixo do jarrete.....	7
Figura 3 – Escores de hiperqueratose na extremidade dos tetos: (1) sem anel, (2) pequena formação de anel sem rugosidade, (3) formação de anel rugoso e (4) grande formação de anel rugoso.....	8
Figura 4 – Escores de limpeza do úbere: (1) totalmente limpo, (2) pouco sujo, (3) sujo e (4) completamente sujo.....	9
Figura 5 – Mecanismos de transferência horizontal de genes. Transdução mediada por bacteriófagos; Conjugação dependente do contato célula-célula; Transformação de células naturalmente competentes usando DNA ambiental liberado a partir de células lisadas.....	14

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Frequência (%) de fazendas e animais de acordo com a estratificação de CCS.....	32
--	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Dados dos 27 rebanhos avaliados no presente estudo.....31

Tabela 2 – Frequência de mastite subclínica para as variáveis explicativas relacionadas às características individuais da vaca, manejo de ordenha e controle de mastite e estrutura da fazenda com $p < 0,15$ no teste Qui-quadrado.....34

Tabela 3 – Odds ratio (OR) e intervalo de confiança (IC) de mastite subclínica de acordo com o modelo de regressão logística final para as variáveis explicativas relacionadas às características individuais da vaca e ao manejo de ordenha e controle de mastite.....36

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Amostras de leite de mastite clínica e subclínica analisadas e classificadas de acordo com a coloração de Gram das colônias, ausência de crescimento e contaminação (três ou mais colônias distintas na mesma placa)53

Tabela 2 – Distribuição dos isolados bacterianos, cocos Gram-positivos, de amostras de leite de vacas com mastite subclínica.....54

Tabela 3 – Distribuição dos isolados bacterianos, cocos Gram-positivos, de amostras de leite de vacas com mastite clínica.....55

Tabela 4 – Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados ($n = 50$) de amostras de leite de vacas leiteiras com mastite clínica ou subclínica.....56

Tabela 5 – Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. (não aureus) isolados ($n = 57$) de amostras de leite de vacas leiteiras com mastite clínica ou subclínica.....56

Tabela 6 – Suscetibilidade antimicrobiana de *Streptococcus* spp. isolados ($n = 72$) de amostras de leite de vacas leiteiras com mastite clínica ou subclínica.....57

Tabela 7 – Suscetibilidade antimicrobiana de *Enterococcus* spp. isolados ($n = 21$) de amostras de leite de vacas leiteiras com mastite clínica ou subclínica.....57

Tabela 8 – Proporções de isolados multisensíveis, resistentes a uma ou duas classes de antimicrobianos e multirresistentes.....58

RESUMO

A mastite bovina é a doença mais comum e que mais causa prejuízos econômicos em rebanhos leiteiros de todo o mundo. Objetivou-se com o presente estudo avaliar os fatores de risco para mastite subclínica em rebanhos leiteiros do Estado de Goiás, identificar os micro-organismos gram-positivos causadores de mastite, bem como a sua resistência antimicrobiana. Foram coletadas amostras de leite de 1.034 vacas em lactação de 27 propriedades leiteiras localizadas no Estado de Goiás e realizadas análises de contagem de células somáticas (CCS), exame bacteriológico e teste de sensibilidade a antimicrobianos. Foi aplicado um *checklist* em cada propriedade participante para obtenção de dados sobre os animais, as propriedades e o manejo higiênico e sanitário dos rebanhos. Os fatores de risco para mastite foram avaliados em modelo linear generalizado misto. Das 27 propriedades, 11 (40,74%) tinham CCS do tanque acima de 500.000 células/mL, portanto acima do limite máximo estabelecido pela legislação brasileira. A prevalência de mastite subclínica nos rebanhos (CCS > 200.000 células/mL) foi de 54,93%. Os principais fatores de risco associados à ocorrência de mastite subclínica em vacas leiteiras foram idade avançada, úbere penduloso e estágio de lactação avançado. Foram identificados 216 micro-organismos, cocos gram-positivos. *Staphylococcus* spp. (53,10%), particularmente *S. aureus* (30,09%), destacou-se como um dos agentes mais comuns envolvidos na etiologia da mastite subclínica bovina, seguido de *Streptococcus* spp. (22,12%) e *Enterococcus* sp. (16,81%). As maiores taxas de resistência antimicrobiana foram de *Staphylococcus aureus* à penicilina (76%) e ampicilina (74%), *Streptococcus* spp. à neomicina (65,08%), gentamicina (46,03) e tetraciclina (43,66%) e *Enterococcus* spp. à tetraciclina (52,38%). Foram encontrados isolados de *Streptococcus* spp. multirresistentes (18,06%).

Palavras-chave: contagem de células somáticas, mastite clínica, mastite subclínica; *Staphylococcus aureus*; susceptibilidade antimicrobiana, vacas leiteiras.

ABSTRACT

Bovine mastitis is the most common disease that causes the most economic losses in dairy herds around the world. The objective of this study was to evaluate the risk factors for subclinical mastitis in dairy herds in the State of Goiás, to identify the gram-positive microorganisms that cause mastitis, as well as their antimicrobial resistance. Milk samples were collected from 1,034 lactating cows from 27 dairy farms located in the State of Goiás and analyzes of somatic cell count (SCC), bacterial examination and antimicrobial sensitivity test were performed. A research *checklist* was applied to each participating property to obtain data on the animals, the properties and the hygienic and sanitary management of the herds. Risk factors for mastitis were assessed using a mixed generalized linear model. Of the 27 properties, 11 (40.74%) had SCC of the tank above 500,000 cells/mL, therefore above the maximum limit established by Brazilian legislation. The prevalence of subclinical mastitis in herds (SCC > 200,000 cells / mL) was 54.93%. The main risk factors associated with the occurrence of subclinical mastitis in dairy cows were old age, pendulous udder and advanced lactation stage. 216 microorganisms were identified, gram-positive cocci. *Staphylococcus* spp. (53.10%), particularly *S. aureus* (30.09%), stood out as one of the most common agents involved in the etiology of bovine subclinical mastitis, followed by *Streptococcus* spp. (22.12%) and *Enterococcus* sp. (16.81%). The highest rates of antimicrobial resistance were *Staphylococcus aureus* to penicillin (76%) and ampicillin (74%), *Streptococcus* spp. to neomycin (65.08%), gentamicin (46.03) and tetracycline (43.66%) and *Enterococcus* spp. tetracycline (52.38%). Isolates of *Streptococcus* spp. multiresistant (18.06%).

Keywords: antimicrobial susceptibility; clinical mastitis; dairy cows, somatic cell count; *Staphylococcus aureus*; subclinical mastitis.

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

A mastite é a inflamação da glândula mamária e é uma das doenças mais comuns e economicamente importantes que afetam a cadeia produtiva do leite em todo o mundo. Os prejuízos provocados pela mastite incluem redução na produção e qualidade do leite, aumento de custos com medicamentos, descarte de leite com resíduo de antibiótico, descarte precoce de animais e até mesmo morte dos animais em casos graves. Além disso, a mastite é um problema de bem-estar animal e de saúde pública.

A mastite ocorre principalmente em resposta a uma infecção intramamária bacteriana. A doença é acompanhada por sinais clínicos (mastite clínica) ou inaparentes (mastite subclínica)¹. Em casos de mastite clínica podem ocorrer aumento da temperatura local, dor, vermelhidão, edema do quarto mamário ou sinais sistêmicos e leite com coloração, viscosidade ou consistência anormais².

A contagem de células somáticas (CCS) é um parâmetro importante para caracterizar a qualidade do leite, sendo um indicador do estado sanitário da glândula mamária das vacas. As células somáticas encontradas no leite são células de descamação do epitélio secretor da glândula mamária e células de defesa, leucócitos. Quando há um processo inflamatório na glândula mamária ocorre uma migração de leucócitos do sangue para a glândula mamária com o objetivo de combater o agente causador, o que provoca um aumento na CCS do leite³.

A CCS do leite é uma ferramenta importante para o diagnóstico da mastite subclínica e é internacionalmente aceita como critério para avaliar a saúde da glândula mamária de uma vaca. Para a confirmação da doença, em amostras compostas de leite, geralmente é utilizado o limiar de 200.000 células somáticas/ mL (CS/mL), portanto um animal com CCS acima deste valor é considerado com mastite subclínica^{4, 5}. No Brasil, de acordo com o Regulamento Técnico sobre Identidade e Qualidade do leite cru refrigerado, aprovado pela Instrução Normativa nº 76 de 26 de novembro de 2018, o leite cru refrigerado no tanque deve apresentar médias geométricas trimestrais de CCS de no máximo 500.000 CS/mL⁶.

O tratamento de mastites, seja durante a lactação ou no período seco, é uma das principais razões para o uso de antimicrobianos às vacas leiteiras⁷. Monitorar o desenvolvimento da resistência antimicrobiana é importante para garantir a saúde continuada de animais e seres humanos.

Diversos fatores podem estar associados à ocorrência de mastite. A identificação destes fatores de risco ajuda a identificar medidas para melhorar a saúde do úbere em rebanhos leiteiros, e a elaborar, aprimorar e implementar programas de controle e prevenção da doença, podendo assim melhorar a produtividade e qualidade do leite. Muitos fatores de risco para mastite são conhecidos, porém os estudos não são definitivos, pois é impossível avaliar em um único estudo todos os potenciais fatores de risco em um rebanho⁵.

Como os sistemas de gestão diferem entre as regiões e propriedades leiteiras, estudos regulares da mastite continuam a ser indispensáveis para adaptação e desenvolvimento de novas ferramentas de controle e prevenção da doença¹. Diante do exposto, objetivou-se com o presente estudo avaliar os fatores de risco para mastite subclínica em rebanhos leiteiros do Estado de Goiás, identificar os micro-organismos gram-positivos causadores de mastite, bem como a sua resistência antimicrobiana.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Mastite

A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária que ocorre principalmente em resposta a uma invasão bacteriana. As mastites podem ocorrer de forma clínica ou subclínica. Na forma clínica o leite se apresenta visivelmente anormal, caracterizado principalmente pela presença de grumos (mastite leve). Também podem ocorrer edema, vermelhidão e dor no quarto mamário afetado (mastite moderada) e, em alguns casos, podem ocorrer sinais sistêmicos, como febre, desidratação, fraqueza e inapetência (mastite grave). Na forma subclínica não há alterações visuais no leite ou úbere e o diagnóstico pode ser feito pelo *California Mastitis Test* (CMT) ou pela Contagem de Células Somáticas (CCS) do leite⁸. A CCS de amostras de leite de vacas individuais é o parâmetro mais preciso para diagnosticar os casos de mastite subclínica em um rebanho leiteiro⁹. A CCS de amostras de leite de vacas superior a 200.000 CS/mL indica mastite subclínica, sendo que, um ou mais quartos mamários podem estar infectados¹⁰.

A mastite provoca redução na produção de leite devido a injúrias às células do epitélio secretor da glândula mamária, reduzindo sua capacidade de síntese (Figura 1). Cunha et al.¹¹ observaram redução progressiva na produção de leite com o aumento da CCS, esta redução foi de 19,4% entre amostras com $CCS \leq 100.000$ e amostras com $CCS > 3.000.000$.

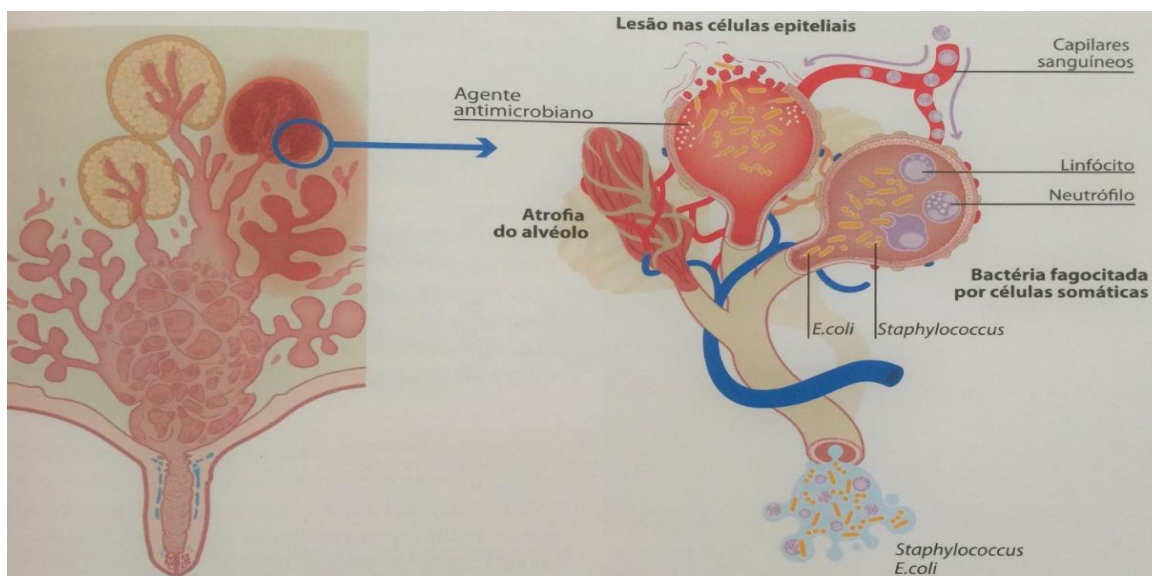


Figura 1 - Resposta da glândula mamária à invasão bacteriana.

Fonte: Santos e Fonseca³.

De acordo com Gonçalves et al.¹², a produção de leite começa a ser afetada a partir de 12.400 células somáticas/mL para vacas de raça holandesa em rebanhos brasileiros. As perdas diárias de leite dependeram do número de partos e do estágio de lactação. As perdas de leite por unidade de aumento no logaritmo natural de CCS variaram de 0,55 a 0,97 kg/dia na primeira lactação, 1,09 a 2,45 kg/dia na segunda lactação e 1,13 a 2,65 kg/dia na terceira lactação. As perdas de leite foram menores durante o pico de lactação e maiores no final da lactação.

Pearson et al.¹³ estimaram o efeito de uma infecção intramamária no peri-parto sobre a produção de leite de vacas primíparas nos primeiros 200 dias em lactação comparando 96 gêmeas monozigóticas (48 pares), em que uma tinha uma infecção intramamária ocorrida naturalmente e detectada na primeira ordenha após o parto e a outra gêmea não. Gêmeos monozigóticos proporcionam um modelo ideal para analisar o efeito da mastite na produção de leite e CCS pois a composição genética idêntica minimiza a variação de animal para animal. Dados de 29 pares de gêmeas monozigóticas foram utilizados para estimar o efeito de infecção intramamária por *Streptococcus uberis* e dados de 19 pares de gêmeas foram utilizados para estimar o efeito de infecção intramamária por estafilococos não-*aureus*. Uma vaca primípara com infecção por *Streptococcus uberis* produziu 200 kg a menos de leite (7%) durante os primeiros 200 dias em lactação em comparação com a irmã gêmea não infectada. A infecção por estafilococos não-*aureus* não foi associada com menor produção de leite, apesar da gêmea infectada ter tido uma CCS superior ($5,25 \pm 0,09 \log_{10}$ CS/mL) à gêmea não infectada ($4,88 \pm 0,09 \log_{10}$ CS/mL) nos primeiros 30 dias em lactação ($p = 0,002$).

Além da diminuição da produção leiteira, a mastite também causa alterações na composição do leite devido ao aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos da glândula mamária e à redução da sua capacidade de síntese, ou ainda pela ação direta dos micro-organismos e suas enzimas sobre os componentes do leite¹⁴. As alterações nos teores dos componentes do leite não são favoráveis à sua qualidade, pelo contrário, interferem negativamente sobre a fabricação e a qualidade dos derivados lácteos¹⁵.

A elevação do número de células somáticas no leite aumenta as atividades de lipólise e proteólise devido ao aumento de enzimas originadas de células leucocitárias e bacterianas. A lipólise e a proteólise são processos importantes que contribuem com a deterioração do leite cru durante seu armazenamento e também podem causar a redução no rendimento industrial e vida de prateleira dos produtos lácteos¹⁶.

Em um estudo avaliando o perfil higiênico-sanitário do leite de 1.600 rebanhos do Estado de Goiás no período de 2012 a 2014 observou-se que 21% dos rebanhos apresentaram médias de CCS de leite de tanque acima do limite legal permitido no Brasil, que é de 500.000 CS/mL¹⁷.

2.2. Patógenos causadores de mastite

A mastite é causada, principalmente, por agentes bacterianos, podendo ser classificada em contagiosa ou ambiental de acordo com a origem do agente. Na mastite contagiosa os micro-organismos geralmente são transmitidos entre as vacas no momento da ordenha, seja pelo equipamento de ordenha ou pelas mãos do ordenhador; destacam-se como micro-organismos predominantemente contagiosos *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. Na mastite ambiental os micro-organismos têm o seu reservatório no ambiente das vacas, destacam-se como micro-organismos predominantemente ambientais *Escherichia coli* e *Streptococcus uberis*¹⁸.

Os estafilococos não-*aureus* (ENA), juntamente com outros agentes patogênicos, como as bactérias do gênero *Corynebacterium* spp., são comumente, considerados patógenos secundários da mastite, em oposição aos patógenos principais, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus agalactiae*, pelo efeito mais significativo destes patógenos na CCS do leite, na produção de leite e por possuírem maior patogenicidade¹⁹.

Nas mastites contagiosas, a principal forma de transmissão dos patógenos, como *S. aureus*, é via fômites de vaca para vaca como, por exemplo, pelas teteiras de ordenha, visto que o leite de vacas infectadas é a principal fonte desses patógenos. Procedimentos adequados, boa higiene e manutenção do sistema de ordenha, treinamento de funcionários e controle de moscas são importantes para a prevenção de novos casos de mastite contagiosa²⁰.

Verbeke et al.¹ avaliaram casos de mastite clínica no norte da Bélgica em 2012 e 2013 e os patógenos isolados mais frequentemente foram *Streptococcus uberis* (18,2%) e *Escherichia coli* (15,5%). A maioria dos casos (63,1%) foram classificados como leves (apenas grumos no leite). Do total, 29,9% foram moderados (sinais no quarto mamário, sem sinais gerais) e 7% considerados graves (doença sistêmica).

Schmidt et al.²¹ analisaram a diversidade de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. isoladas de infecções intramamárias bovinas, clínicas e subclínicas (CCS $\geq$ 200.000 CS/mL). As amostras de leite foram coletadas na Província KwaZulu-Natal, África do Sul,

em 2013 e 2014. Foram identificados 146 isolados de *Staphylococcus aureus* e 102 isolados de estafilococos não-*aureus*. Sete espécies do gênero *Staphylococcus* spp. foram identificadas entre os estafilococos não-*aureus*, predominando o *Staphylococcus chromogenes* (78,4%). As outras espécies identificadas foram *S. xylosus*, *S. hyicus*, *S. simulans*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* e *S. epidermidis*.

Ramírez et al.²² identificaram os patógenos causadores de mastite bovina em rebanhos leiteiros da Antioquia, Colômbia, em 2009 e 2010. Amostras de leite de quartos mamários de 1.662 vacas pertencentes a 37 rebanhos foram analisadas com o intuito de observar a presença de mastite subclínica pela técnica de CCS (≥ 200.000 CS/mL). A prevalência média de mastite subclínica foi de 37,2%. Os micro-organismos predominantes isolados foram bactérias contagiosas, incluindo *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus aureus*.

Tomazi et al.²³ “association” caracterizaram a frequência dos patógenos causadores de mastite clínica em 20 rebanhos leiteiros na região Sudeste do Brasil, nos Estados de São Paulo e Minas Gerais, entre 2014 e 2016. Os patógenos mais frequentemente isolados foram *Escherichia coli* (6,6%), *Streptococcus uberis* (6,1%) e *Streptococcus agalactiae* (5,9%). A maioria dos casos de mastite clínica foi leve (60,3%), enquanto 34,1% foram moderados e 5,6% graves.

Oliveira et al.²⁴ encontraram frequências de 35% de coliformes, 16% de *Staphylococcus* não-*aureus*, 9% de *Streptococcus uberis* e 7% de *Streptococcus agalactiae* em amostras de leite positivas na cultura bacteriana provenientes de animais com mastite clínica no Estado de Minas Gerais, entre 2009 e 2014.

Martins²⁵ avaliou amostras individuais de leite de vaca de sete propriedades no Estado de Goiás entre 2010 e 2011 e encontrou que 57,59% (3316/5758) das amostras compostas de leite apresentaram resultado de CCS acima de 200.000 CS/mL, possivelmente provenientes de animais com mastite subclínica. Nas amostras de leite provenientes de animais com mastite clínica *Streptococcus uberis* e *Staphylococcus aureus* foram os agentes mais frequentemente isolados. Nas amostras de leite provenientes de animais com mastite subclínica (CCS > 200.000 CS/mL) os agentes mais isolados foram *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Staphylococcus* spp.

2.3. Fatores de risco para mastite

Os fatores associados à mastite bovina podem estar relacionados ao animal, ao ambiente, ao manejo do rebanho e ao equipamento de ordenha. A profundidade do úbere pode ser considerada um fator de risco para mastite. Úberes abaixo do jarrete foram associados com maior chance de mastite. O úbere penduloso fica mais próximo ao solo o que facilita a entrada de patógenos, além de ser mais provável de sofrer injúrias^{5, 26}. A profundidade do úbere pode ser avaliada considerando a altura da base do úbere em relação ao jarrete, podendo ser acima, na altura ou abaixo do jarrete (Figura 2)¹⁰.

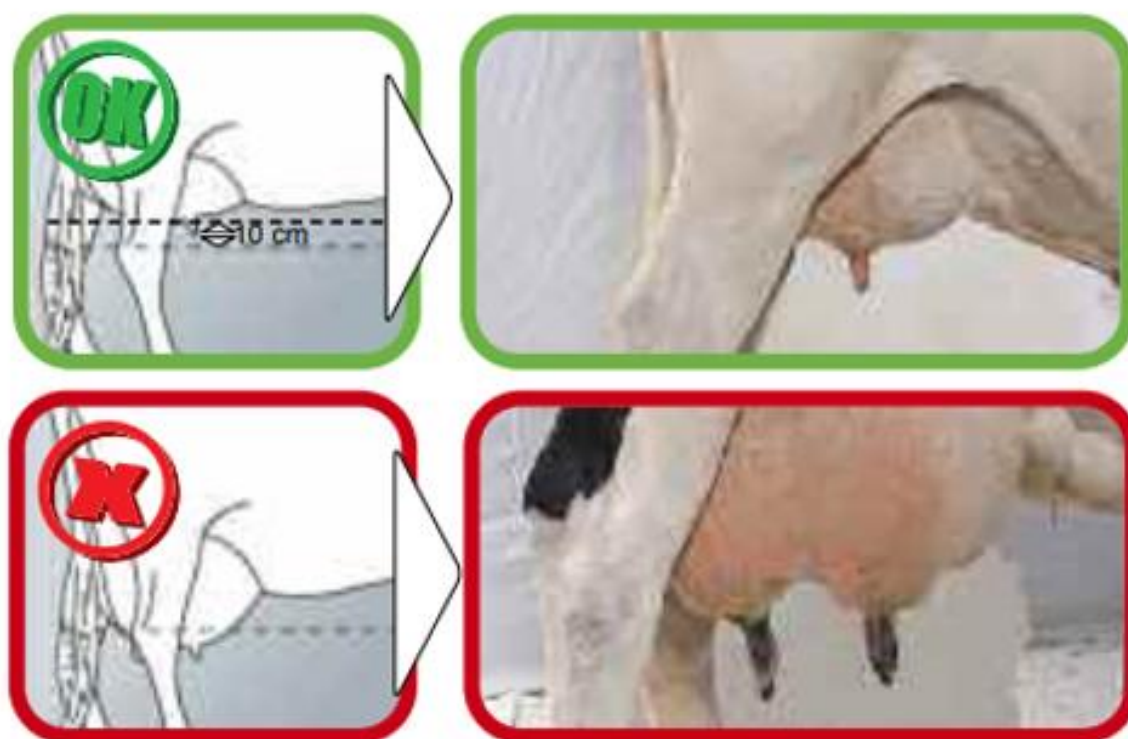


Figura 2 - Profundidade do úbere. Base do úbere acima do jarrete (ideal) e base do úbere abaixo do jarrete.

Fonte: *Canadian Bovine Mastitis Research Network*²⁷.

Outro fator de risco para mastite associado ao animal é a presença de hiperqueratose nos tetos do úbere. Uma vez que a causa mais frequente de mastite é a infecção por bactérias que entram na glândula mamária pelo canal do teto, a extremidade do teto saudável serve como barreira primária que impede a penetração de bactérias na glândula mamária. Portanto, a condição do teto é um fator importante que pode agir como barreira de proteção contra a infecção dos quartos mamários²⁸. Assim, a manutenção das ordenhadeiras

é importante, visto que condições inadequadas de uso da ordenhadeira podem induzir alterações teciduais no teto, como hiperqueratose, que podem prejudicar os mecanismos de defesa locais, facilitando a colonização bacteriana²⁹.

Pantoja et al.³⁰ realizaram uma revisão sistemática para elucidar o papel da hiperqueratose na extremidade do teto como fator de risco para mastite clínica ou mastite subclínica. Os resultados dos estudos revisados sugerem que hiperqueratose na extremidade do teto grave é um fator de risco para mastite clínica e subclínica e enfatiza a importância da saúde do teto para o controle da mastite.

A hiperqueratose na extremidade dos tetos pode ser classificada em escores de 1 a 4, sendo (1) sem anel, (2) pequena formação de anel sem rugosidade, (3) formação de anel rugoso e (4) grande formação de anel rugoso (Figura 3)³¹. A presença de lesões, maior calosidade e rugosidade da extremidade do teto, especialmente de escore médio de hiperqueratose maior que três, foram associadas com maior chance de mastite^{5, 28, 32, 33}.



Figura 3 - Escores de hiperqueratose na extremidade dos tetos: (1) sem anel, (2) pequena formação de anel sem rugosidade, (3) formação de anel rugoso e (4) grande formação de anel rugoso.

Fonte: *Canadian Bovine Mastitis Research Network*²⁷.

A higiene do úbere também está relacionada à ocorrência de mastite nas vacas. Úberes sujos ou muito sujos no início da ordenha em comparação com úberes limpos são associados com maiores chances de mastite^{1, 5, 22}. A limpeza do úbere pode ser classificada em escores de sujeidade de 1 a 4 (1 totalmente limpo, 2 pouco sujo, 3 sujo e 4 completamente sujo) (Figura 4)³⁴.



Figura 4 - Escores de limpeza do úbere: (1) totalmente limpo, (2) pouco sujo, (3) sujo e (4) completamente sujo.

Fonte: *Canadian Bovine Mastitis Research Network*²⁷.

Outros fatores são associados à maior chance de mastite, como maior número de partos/lactações/idade^{5, 22, 35}, maior estágio de lactação/dias em lactação^{5, 22, 32, 36} e maior porcentagem de raça holandesa no rebanho^{2, 22, 33, 35}. Vacas de raça holandesa em geral têm uma maior produção de leite em comparação com outras raças, podendo ser menos resistentes e, portanto, mais suscetíveis à mastite clínica².

São fatores associados a menores chances de mastite, a realização de linha de ordenha, isto é, ordenha das vacas com mastite posteriormente às vacas saudáveis ou separadamente⁵, a utilização de luvas descartáveis durante a ordenha²⁸, a desinfecção do teto pré-ordenha^{20, 28}, a secagem adequada dos tetos^{20, 32}, a desinfecção do teto pós-ordenha^{20, 22} e a manutenção regular do equipamento de ordenha⁵. A utilização de luvas é um fator limitante da adesão bacteriana, reduzindo o papel potencial de transmissão de patógenos por meio das mãos dos ordenhadores²⁸.

A nutrição dos animais também tem sido associada à ocorrência de mastite. A alimentação com ração balanceada, com suporte adequado de vitaminas e minerais, otimiza o sistema imunológico dos animais e consequentemente ocorre uma redução na chance de ocorrência de mastite^{26, 37}. Por outro lado, baixo escore de condição corporal aumenta a chance de mastite²⁶.

A higiene do ambiente onde as vacas em lactação são alojadas é outro fator importante para a mastite. Maior frequência de limpeza das instalações das vacas resulta em pisos mais limpos, pés mais limpos, menor contaminação fecal das camas, úberes mais limpos e menor incidência de mastite². Provavelmente, o efeito do alojamento seja mediado pela exposição a agentes patogênicos na cama dos animais e sujeira dos animais^{33, 38}. Por exemplo, no *Compost Barn* a cama precisa ser revolvida para incorporar os dejetos dos

animais, facilitar a compostagem aeróbia e fornecer uma superfície confortável e seca para as vacas. O manejo da cama de forma a mantê-la sempre seca resulta em animais mais limpos e com menos risco de mastite³⁹.

Eventos que ocorreram na lactação anterior também podem aumentar a chance de mastite na lactação seguinte, como um histórico de mastite clínica ou CCS alta^{24, 35, 40}. O tratamento da mastite na lactação anterior pode ter apenas suprimido os sinais clínicos, sem eliminar completamente os agentes infecciosos, seja por resistência antimicrobiana, escolha, dose, frequência ou duração da administração de medicamento inadequadas, de forma que, tenha permanecido a infecção na forma subclínica até voltar a manifestar sinais clínicos²⁶.

Van den Borne et al.⁴¹ observaram em seu estudo realizado na Holanda que, após a implementação de programa de controle de mastite ao longo de cinco anos, as mudanças na atitude e conhecimento dos produtores de leite foram associadas a uma diminuição da taxa de incidência da mastite clínica. Com estes resultados, os autores sugeriram que a forma como são executadas as medidas de gestão podem ser tão importantes quanto a sua execução. No estudo de Costa et al.²⁰, em Ohio, EUA, o envolvimento do proprietário nas operações de ordenha, reduziu significativamente a probabilidade de detecção de *S. aureus* no leite do tanque.

2.4. Mastite e uso de antimicrobianos

Uma das principais razões para a administração de antimicrobianos às vacas leiteiras é o tratamento da mastite⁷. Na maioria dos casos, a mastite clínica deve ser tratada imediatamente após diagnosticada. Na mastite subclínica não é indicado o tratamento durante a lactação, devido à baixa taxa de cura. No entanto, em rebanhos em que a mastite contagiosa é um problema, a identificação e o tratamento de vacas subclínicamente infectadas por *Streptococcus agalactiae*, que são susceptíveis à terapia antimicrobiana, pode ser aconselhável a fim de diminuir o risco de transmissão. A recomendação geral é efetuar o tratamento da mastite subclínica no final da lactação do animal, ao iniciar-se o período seco. Este tratamento, chamado de terapia de vaca seca, além da cura das mastites subclínicas da lactação anterior, reduz a taxa de novas infecções no período seco³. Porém, o uso preventivo de antimicrobianos tornou-se questionável devido a preocupações de saúde pública, como a possibilidade de criar pressão seletiva sobre populações bacterianas e contribuir para o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos⁴².

A identificação de microrganismos causadores de mastite pode ser realizada na própria fazenda (*On farm culture*). Os resultados de cultura microbiológica na fazenda podem ser usados na tomada rápida de decisões sobre protocolos de tratamento seletivo de mastite clínica, ou ainda, em programas de controle de mastite para identificar patógenos contagiosos e avaliar a cura microbiológica após o tratamento³.

Segundo Stevens et al.⁴³ rebanhos que fazem parte de um programa veterinário de gestão da saúde do rebanho e rebanhos em que a terapia de vaca seca é seletiva, isto é, sem uso de antimicrobianos na secagem das vacas com baixa CCS antes da secagem, utilizam menos antimicrobianos em comparação com os rebanhos que não fazem parte de tal programa ou em que a terapia de vaca seca é feita em todas as vacas.

Na terapia de vaca seca é utilizado antimicrobiano com liberação lenta, sendo que a concentração do fármaco é mantida no úbere por mais tempo e o risco de resíduo do antimicrobiano no leite é menor, desde que seja respeitado o período de carência⁸. Nos Estados Unidos, os produtos antimicrobianos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento intramamário de vacas em lactação pertencem às classes de antimicrobianos beta-lactâmicos (amoxicilina, ceftiofur, cefapirina, cloxacilina, hetacilina e ampicilina) e lincosaminas (pirilmicina). Já os produtos antimicrobianos aprovados para o tratamento intramamário de vacas secas pertencem às classes de antimicrobianos beta-lactâmicos (cefapirina, ceftiofur, penicilina G procaína e cloxacilina) e aminoglicosídeos (estreptomicina)⁸.

Um melhor gerenciamento da saúde do rebanho foi associado à redução no uso de antimicrobianos que são extremamente importantes para a saúde humana ao longo do tempo e com menores contagens bacterianas e contagem de células somáticas do leite do tanque⁴⁴.

2.5. Resistência antimicrobiana

O mau uso de antibióticos tem aumentado e acelerado o processo de resistência antimicrobiana, tornando-a uma ameaça grave à medicina moderna⁴⁵. A seleção de resistência antimicrobiana é devido ao processo de evolução, quando células bacterianas são expostas a antibióticos, aquelas células sem resistência natural às drogas serão mortas e aquelas com resistência irão sobreviver em um ambiente de competição reduzida⁴⁵.

O custo do tratamento com antimicrobianos e a mortalidade devido à resistência estão aumentando em todo o mundo. A resistência antimicrobiana tem causado preocupação

na comunidade de saúde pública e por líderes globais⁴⁶. O uso de antimicrobianos em animais produtores de alimentos está sob crescente preocupação devido à potencial propagação de resistência. A resistência antimicrobiana pode se propagar de animais para os seres humanos por meio do contato direto, alimentos de origem animal e resíduos de animais, que podem contaminar lavouras e fontes de água⁴⁷.

Estafilococos são os principais patógenos causadores da mastite bovina e a resistência antimicrobiana dos estafilococos é uma das principais razões para a baixa taxa de cura da mastite. O uso indevido e generalizado de antimicrobianos para o tratamento e prevenção da mastite bovina levou a seleção de resistência antimicrobiana entre os patógenos causadores de mastite⁴⁸.

As bactérias podem ser resistentes a antimicrobianos por meio de vários mecanismos⁴⁹, que são: alteração enzimática da molécula, como por exemplo, a hidrólise do anel beta-lactâmico dos antimicrobianos beta-lactâmicos por beta-lactamases⁵⁰ e a inativação de aminoglicosídeos por acetiltransferases, adeniltransferases ou fosfotransferases⁵¹; alteração do sítio de ação, que faz com que o antimicrobiano perca sua capacidade de ligação e consequentemente sua atividade, como por exemplo a resistência aos beta-lactâmicos por alterações nas proteínas ligadoras de penicilina⁵²; alteração da permeabilidade da parede celular bacteriana, que causa redução na entrada ou aumento do efluxo, regulando a concentração interna de antimicrobianos na célula, sendo a principal forma de resistência à tetraciclina⁵³; e inclusão de vias alternativas aos processos fisiológicos normais, para escapar da atividade antimicrobiana como, por exemplo, a resistência à trimetoprima pela produção adicional de uma diidrofolato redutase⁵⁴.

Os antibióticos beta-lactâmicos inibem a síntese da parede celular através da ligação às chamadas proteínas ligadoras de penicilina nas bactérias, interrompendo a síntese de peptidoglicano. O mecanismo mais comum e importante através do qual as bactérias podem tornar-se resistentes a beta-lactâmicos é a produção de beta-lactamases, codificadas pelo gene *blaZ*⁵⁵. A resistência pode também ser devido a proteínas ligadoras de penicilina alteradas, codificadas pelo gene *mecA* ou análogos como, por exemplo, *mecC*, de forma que os beta-lactâmicos não podem se ligar de forma tão eficaz a elas⁵⁶.

Os aminoglicosídeos inibem a síntese de proteínas por ligação à subunidade 30S do ribossomo das bactérias e/ou por alterar a integridade da membrana celular bacteriana⁵⁷. O principal mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos é a sua inativação por enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. Estas enzimas são classificadas em três grandes classes

de acordo com o tipo de modificação: acetiltransferases (AAC), adeniltransferases ou nucleotidiltransferase (ANT) e fosfotransferases (APH)⁵⁸.

Macrolídeos e lincosaminas inibem a síntese de proteínas por ligação à subunidade 50S do ribossomo das bactérias⁵⁹. O mecanismo mais comum de resistência aos macrolídeos e lincosaminas é devido à presença de rRNA-metilases, que são codificadas pelos genes *erm*. Estas enzimas modificam o sítio de ação do antibiótico no ribossomo, impedindo sua ligação. Outros dois mecanismos de resistência a estes antibióticos são bombas de efluxo e enzimas de inativação, codificadas pelos genes *msr* e *ere*, respectivamente⁶⁰.

As sulfonamidas, com sua estrutura análoga ao ácido para-aminobenzoico, que está envolvido na biossíntese de ácido fólico, inibe competitivamente a enzima dihidropteroato sintase, que catalisa o penúltimo passo da via biossintética do ácido fólico, um importante metabólito na síntese de DNA. A resistência às sulfonamidas está associada às variantes da enzima dihidropteroato sintase que possuem pouca afinidade pelo antimicrobiano, codificadas pelos genes *sul1*, *sul2* e *sul3*⁵⁹.

As tetraciclina inibem a síntese de proteínas por ligação à subunidade 30S do ribossomo das bactérias. Os mecanismos de resistência às tetraciclina são bombas de efluxo, proteínas de proteção ribossomais ou inativação enzimática do antimicrobiano. Dentre os genes determinantes de resistência às tetraciclina, 25 genes *tet*, dois genes *otr* e um gene *tcr* codificam para bombas de efluxo, enquanto 10 genes *tet* e um gene *otr* codificam para proteínas de proteção ribossomais. O mecanismo de inativação enzimática pode ser atribuído a três genes *tet*⁵⁹.

2.6. Mecanismos de transferência horizontal de genes

A resistência antimicrobiana pode ser intrínseca ou adquirida. Resistência antimicrobiana intrínseca é uma característica inerente de uma espécie bacteriana ou gênero para um determinado antimicrobiano. A resistência é adquirida quando uma cepa susceptível se torna resistente como consequência de uma evolução recente da cepa⁶¹. Isto pode ser o resultado de uma mutação, que geralmente acontece espontaneamente dentro de uma população bacteriana, ou pode ser resultante da aquisição de um gene de resistência específica por transferência horizontal de genes⁶¹. A transferência de genes de resistência antimicrobiana é facilitada por elementos genéticos móveis, como plasmídeos e

transposons^{62, 63}. Os antimicrobianos exercem uma forte pressão seletiva para propagação da resistência.

Existem três mecanismos principais de transferência horizontal de genes entre bactérias: transformação, transdução e conjugação (Figura 5). A transformação é o processo em que DNA bacteriano livre no ambiente, decorrente de lise celular, é captado e incorporado por células bacterianas competentes⁶⁴. A transdução é o processo de transferência de DNA mediada por bacteriófagos. A conjugação, considerada como o principal modo de transferência de genes de resistência antimicrobiana entre as bactérias, é a transferência de DNA que ocorre entre células bacterianas vivas e requer contato direto entre a célula doadora e a célula receptora⁶⁵.

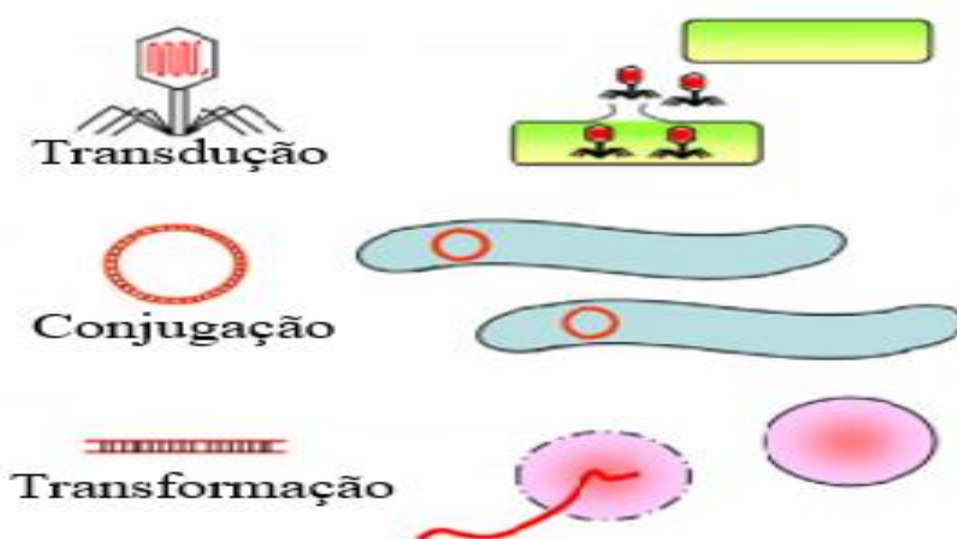


Figura 5 - Mecanismos de transferência horizontal de genes. Transdução mediada por bacteriófagos; Conjugação dependente do contato célula-célula; Transformação de células naturalmente competentes usando DNA ambiental liberado a partir de células lisadas.

Fonte: Adaptado de Blakely ⁶⁶.

Plasmídeos são elementos genéticos que contêm a sua própria origem de replicação, genes que codificam as funções de replicação. Os plasmídeos geralmente contêm genes que codificam funções que permitem a transferência para novas células através de conjugação. Os plasmídeos que abrigam genes de conjugação são chamados conjugativos, os plasmídeos que não contêm genes de conjugação podem fazer uso das funções de conjugação de outros plasmídeos para transferir para um novo hospedeiro⁶⁷.

Além das funções envolvidas na replicação e transferência, plasmídeos geralmente codificam resistência a antimicrobianos, isto é, se um gene de resistência está em um plasmídeo ele tem o potencial de transferir a novos hospedeiros. Alguns plasmídeos têm uma ampla gama de hospedeiros e podem transferir os genes entre diferentes espécies, outros têm uma gama de hospedeiros limitada a um gênero ou espécie. Há também plasmídeos que não podem replicar no novo hospedeiro ou não se replicam bem. Neste caso o plasmídeo pode ser perdido ou, se ele contiver um gene de resistência em um transposon, este elemento genético pode translocar para o cromossoma bacteriano e ser mantido mesmo na ausência do plasmídeo⁶⁷.

Transposons conjugativos, assim como os plasmídeos conjugativos, contêm os genes necessários para a conjugação e, normalmente, os genes que codificam a resistência antimicrobiana. Porém, diferentemente dos plasmídeos, os transposons não contêm uma origem de replicação, por isso precisam se integrar a um replicon a fim de serem mantidos. Este replicon pode ser qualquer plasmídeo ou cromossomo. Isto dá aos transposons uma vantagem sobre os plasmídeos, uma vez que não têm mecanismo de replicação que precisa ser compatível com o hospedeiro, eles tendem a ter uma gama de hospedeiros maior do que os plasmídeos⁶⁵.

2.7. Testes para detecção de resistência antimicrobiana

Como a utilização de antimicrobianos para o tratamento da mastite pode levar à resistência bacteriana por parte dos patógenos, a sensibilidade destes aos antimicrobianos pode ser avaliada para a escolha do antibiótico mais apropriado⁶⁸. A resistência antimicrobiana dos patógenos da mastite é mais comumente medida por meio de testes de susceptibilidade fenotípica, os quais avaliam a capacidade de uma série de concentrações de agentes antimicrobianos inibir o crescimento bacteriano. Em medicina veterinária, os métodos fenotípicos mais comumente utilizados incluem disco difusão em ágar e microdiluição em caldo⁶⁹.

O teste de disco difusão é realizado por meio da aplicação de um inóculo de bactérias de aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL na superfície de uma placa de ágar Mueller-Hinton. Até 12 discos de papel com princípios ativos de antibióticos em uma placa grande (150 mm de diâmetro), comercialmente preparados, com concentração fixa, são colocados na superfície do ágar inoculado. As placas são incubadas durante 16 a 24 horas a 35°C antes da determinação dos resultados. As zonas de inibição de crescimento (área sem

crescimento detectável a olho nu) em torno de cada um dos discos com antibióticos são medidas e esses valores interpretados usando os critérios publicados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)⁷⁰ e pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST)⁷¹. O diâmetro da zona está relacionado com a susceptibilidade do isolado e a taxa de difusão da droga através do meio de ágar e os resultados do teste de disco difusão são qualitativos (sensível, intermediário ou resistente)⁶⁹.

O teste de microdiluição em caldo é realizado por meio da utilização de placas plásticas contendo 96 poços, que permite 12 antimicrobianos serem testados em 8 diluições. As placas de microdiluição contendo as soluções de antimicrobianos são inoculadas para obter uma concentração bacteriana final de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL em cada poço da placa de microdiluição. Os painéis de microdiluição são incubados a 35°C por 16 a 24 horas e posteriormente é realizada a leitura da placa e determinação da concentração inibitória mínima (CIM). CIM é a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um micro-organismo. Se a CIM do antibiótico para a bactéria em questão está dentro do intervalo de concentração que pode ser alcançado por esse antimicrobiano, a bactéria é considerada susceptível. Se a CIM do antibiótico para a bactéria em questão é mais elevada do que a concentração que pode ser obtida no local da infecção, a bactéria é considerada resistente⁶⁹.

Métodos genotípicos são utilizados para a detecção de genes de resistência a antimicrobianos, sendo que muitos de tais genes já foram identificados em patógenos causadores de mastite. Estes métodos avaliam o genótipo do micro-organismo, enquanto que os testes de susceptibilidade fenotípica avaliam o fenótipo (expressão do genótipo) sob condições laboratoriais, isto é, detectam resultados da expressão gênica⁷².

Os mecanismos moleculares subjacentes à resistência aos antimicrobianos são muito complexos devido à multiplicidade e diversidade das associações entre os genes. Com isso, a presença ou ausência de um gene específico correspondente a um fenótipo particular, não implica, necessariamente, que o isolado particular seja resistente ou susceptível⁷³.

Ruegg et al.⁷⁴ determinaram a susceptibilidade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo e a presença de genes de resistência antimicrobiana (*ermC*, *blaZ*, *tetK* e *tetM*) em isolados de *Staphylococcus aureus*, estafilococos não-*aureus* e *Streptococcus* spp. provenientes de amostras de leite de vacas com mastite clínica. A susceptibilidade fenotípica à eritromicina foi observada em apenas 8,6 e 15,7% dos isolados de *Staphylococcus aureus* e ECN, respectivamente. Em relação aos isolados de

Streptococcus spp., 51% demonstraram sensibilidade *in vitro* à tetraciclina. De todos os isolados avaliados, 36,9% não continham nenhum dos genes selecionados para o estudo, 35,4% continham um gene e 27,7% continham mais de um gene (geralmente *blaZ* em combinação com um gene *tet*). Em geral, a proporção de isolados que apresentaram resistência fenotípica não correspondeu à proporção de isolados os quais foram identificados os genes de resistência selecionados. Os autores sugeriram que uma seleção mais ampla de genes deve ser testada e mais pesquisas devem ser direcionadas para validar os pontos de corte do teste fenotípico.

Devido à grande importância da mastite bovina para a cadeia produtiva do leite, do ponto de vista econômico, de saúde pública e bem-estar animal, monitorar os patógenos causadores de mastite, os fatores de risco associados, bem como a resistência antimicrobiana, são fundamentais para melhorar a qualidade do leite produzido.

REFERÊNCIAS

1. Verbeke J, Piepers S, Supre K, De Vliegher S. Pathogen-specific incidence rate of clinical mastitis in Flemish dairy herds, severity, and association with herd hygiene. *J. Dairy Sci.* 2014;97(11):6926-34.
2. Santman-Berends IMGA, Swinkels JM, Lam TJGM, Keurentjes J, van Schaik G. Evaluation of udder health parameters and risk factors for clinical mastitis in Dutch dairy herds in the context of a restricted antimicrobial usage policy. *J. Dairy Sci.* 2016;99(4):2930-9.
3. Santos MV, Fonseca LFL. Controle da Mastite e Qualidade do Leite: Desafios e Soluções. Pirassununga(SP);2019. 301p.
4. Dohoo IR, Leslie KE. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. *Prev. Vet. Med.* 1991;10(3):225-37.
5. Cardozo LL, Thaler Neto A, Souza GN, Picinin LC, Felipus NC, Reche NL, et al. Risk factors for the occurrence of new and chronic cases of subclinical mastitis in dairy herds in southern Brazil. *J. Dairy Sci.* 2015;98(11):7675-85.
6. Brasil. Instrução Normativa no 76 de 26 nov 2018. Aprova os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. *Diário Oficial da União, Brasília* (30 nov 2018); Sec.1: 9.
7. Saini V, McClure JT, Leger D, Dufour S, Sheldon AG, Scholl DT, et al. Antimicrobial use on Canadian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 2012;95(3):1209-21.
8. Royster E, Wagner S. Treatment of Mastitis in Cattle. *VET CLIN N AM-FOOD A.* 2015;31(1):17-46.
9. Lievaart JJ, Reneau JK, Kremer WD, Barkema HW. Short communication: influence of sampling interval on the accuracy of predicting bulk milk somatic cell count. *J. Dairy Sci.* 2011;94(2):804-7.
10. Coentrão CM, Souza GN, Brito JRF, Paiva e Brito MAV, Lilenbaum W. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2008;60:283-8.
11. Cunha RPL, Molina LR, Carvalho AU, Facury Filho EJ, Ferreira PM, Gentilini MB. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2008;60:19-24.

12. Gonçalves JL, Cue RI, Botaro BG, Horst JA, Valloto AA, Santos MV. Milk losses associated with somatic cell counts by parity and stage of lactation. *J. Dairy Sci.* 2018;101(5):4357-66.
13. Pearson LJ, Williamson JH, Turner SA, Lacy-Hulbert SJ, Hillerton JE. Peripartum infection with *Streptococcus uberis* but not coagulase-negative staphylococci reduced milk production in primiparous cows. *J. Dairy Sci.* 2013;96(1):158-64.
14. Machado PF, Pereira AR, Sarries GA. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. *Rev. Bras. Zootec.* 2000;29:1883-6.
15. Vargas D, Nörnberg J, Mello R, Scheibler R, Breda F, Milani M. Correlações entre contagem de células somáticas e parâmetros físico-químicos e microbiológicos de qualidade do leite. *Cienc. Anim. Bras.* 2014;15:473-83.
16. Ma Y, Ryan C, Barbano DM, Galton DM, Rudan MA, Boor KJ. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. *J. Dairy Sci.* 2000;83(2):264-74.
17. Soares Neves RB, de Mesquita AJ, dos Santos MV, Nicolau ES, Bueno CP, Coelho KO. Avaliação sazonal e temporal da qualidade do leite cru goiano tendo como parâmetros a CCS e a CBT. *Arch. Vet. Sci.* 2019;24(1):10-23.
18. Picoli T, Zani JL, Bandeira FS, Roll VFB, Ribeiro MER, Vargas GDA, Hübner SO, Lima M, Meireles MCA, Fischer G. Manejo de ordenha como fator de risco na ocorrência de microorganismos em leite cru. *Semin Cienc Agrar.* 2014;35(4):2471-80.
19. Vanderhaeghen W, Piepers S, Leroy F, Van Coillie E, Haesebrouck F, De Vliegher S. Invited review: effect, persistence, and virulence of coagulase-negative *Staphylococcus* species associated with ruminant udder health. *J. Dairy Sci.* 2014;97(9):5275-93.
20. da Costa LB, Rajala-Schultz PJ, Schuenemann GM. Management practices associated with presence of *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk from Ohio dairy herds. *J. Dairy Sci.* 2016;99(2):1364-73.
21. Schmidt T, Kock MM, Ehlers MM. Diversity and antimicrobial susceptibility profiling of *staphylococci* isolated from bovine mastitis cases and close human contacts. *J. Dairy Sci.* 2015;98(9):6256-69.
22. Ramirez NF, Keefe G, Dohoo I, Sanchez J, Arroyave O, Ceron J, et al. Herd- and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in dairy farms from the High Plains of the northern Antioquia, Colombia. *J. Dairy Sci.* 2014;97(7):4141-50.

23. Tomazi T, Ferreira GC, Orsi AM, Gonçalves JL, Ospina PA, Nydam DV, et al. Association of herd-level risk factors and incidence rate of clinical mastitis in 20 Brazilian dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 2018;161:9-18.
24. Oliveira CSF, Hogeveen H, Botelho AM, Maia PV, Coelho SG, Haddad JPA. Cow-specific risk factors for clinical mastitis in Brazilian dairy cattle. *Prev. Vet. Med.* 2015;121(3):297-305.
25. Martins JD. Estudo da etiologia das principais bactérias isoladas de mastite bovina em rebanhos leiteiros de propriedades rurais de Goiás [dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia; 2012.
26. Sarker SC, Parvin MS, Rahman AK, Islam MT. Prevalence and risk factors of subclinical mastitis in lactating dairy cows in north and south regions of Bangladesh. *Trop Anim Health Prod.* 2013;45(5):1171-6.
27. Canadian Bovine Mastitis and Milk Quality Research Network. [acesso 10 oct 2019]. Disponível em:
https://www.medvet.umontreal.ca/rcrmb/en/page.php?p=12&tm=s#Practical_Illustrated_Sheets.
28. Dufour S, Dohoo IR, Barkema HW, Descoteaux L, Devries TJ, Reyher KK, et al. Manageable risk factors associated with the lactational incidence, elimination, and prevalence of *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2012;95(3):1283-300.
29. Zoche-Golob V, Haverkamp H, Paduch JH, Klocke D, Zinke C, Hoedemaker M, et al. Longitudinal study of the effects of teat condition on the risk of new intramammary infections in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2015;98(2):910-7.
30. Pantoja JCF, Correia LBN, Rossi RS, Latosinski GS. Association between teat-end hyperkeratosis and mastitis in dairy cows: A systematic review. *J. Dairy Sci.* 2020;103(2):1843-55.
31. Mein G, Neijenhuis F, Morgan W, Reinemann D, Hillerton E, Baines J, et al. Evaluation of Bovine Teat Condition in Commercial Dairy Herds: 1. Non-Infectious Factors. 2001.
32. Tolosa T, Verbeke J, Ayana Z, Piepers S, Supre K, De Vliegher S. Pathogen group specific risk factors for clinical mastitis, intramammary infection and blind quarters at the herd, cow and quarter level in smallholder dairy farms in Jimma, Ethiopia. *Prev. Vet. Med.* 2015;120(3-4):306-12.

33. Iraguha B, Hamudikuwanda H, Mushonga B. Bovine mastitis prevalence and associated risk factors in dairy cows in Nyagatare District, Rwanda. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 2015;86(1):1228.
34. Schreiner DA, Ruegg PL. Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 2003;86(11):3460-5.
35. Bates AJ, Dohoo I. Risk factors for peri-parturient farmer diagnosed mastitis in New Zealand dairy herds: findings from a retrospective cohort study. *Prev. Vet. Med.* 2016;127:70-6.
36. Tolosa T, Verbeke J, Piepers S, Supre K, De Vlieghe S. Risk factors associated with subclinical mastitis as detected by California Mastitis Test in smallholder dairy farms in Jimma, Ethiopia using multilevel modelling. *Prev. Vet. Med.* 2013;112(1-2):68-75.
37. Bastan A, Salar S, Cengiz M, Darbaz I, Demirel A, Özen D. The prediction of the prevalence and risk factors for subclinical heifer mastitis in Turkish dairy farms. *Turkish J. vet. anim. sci.* 2015;39.
38. Richert RM, Cicconi KM, Gamroth MJ, Schukken YH, Stiglbauer KE, Ruegg PL. Risk factors for clinical mastitis, ketosis, and pneumonia in dairy cattle on organic and small conventional farms in the United States. *J. Dairy Sci.* 2013;96(7):4269-85.
39. Fávero S, Portilho FVR, Oliveira ACR, Langoni H, Pantoja JCF. Factors associated with mastitis epidemiologic indexes, animal hygiene, and bulk milk bacterial concentrations in dairy herds housed on compost bedding. *Livest. Sci.* 2015;181:220-30.
40. Pinedo PJ, Fleming C, Risco CA. Events occurring during the previous lactation, the dry period, and peripartum as risk factors for early lactation mastitis in cows receiving 2 different intramammary dry cow therapies. *J. Dairy Sci.* 2012;95(12):7015-26.
41. van den Borne BH, Jansen J, Lam TJ, van Schaik G. Associations between the decrease in bovine clinical mastitis and changes in dairy farmers' attitude, knowledge, and behavior in the Netherlands. *Res Vet Sci.* 2014;97(2):226-9.
42. Scherpenzeel CG, den Uijl IE, van Schaik G, Olde Riekerink RG, Keurentjes JM, Lam TJ. Evaluation of the use of dry cow antibiotics in low somatic cell count cows. *J. Dairy Sci.* 2014;97(6):3606-14.
43. Stevens M, Piepers S, De Vlieghe S. Mastitis prevention and control practices and mastitis treatment strategies associated with the consumption of (critically important) antimicrobials on dairy herds in Flanders, Belgium. *J. Dairy Sci.* 2016;99(4):2896-903.

44. Stevens M, Piepers S, De Vliegher S. The effect of mastitis management input and implementation of mastitis management on udder health, milk quality, and antimicrobial consumption in dairy herds. *J. Dairy Sci.* 2019;102(3):2401-15.
45. Howard SJ, Hopwood S, Davies SC. Antimicrobial Resistance: A Global Challenge. *Sci Transl Med.* 2014;6(236):236.
46. Laxminarayan R, Sridhar D, Blaser M, Wang M, Woolhouse M. Achieving global targets for antimicrobial resistance. *Science.* 2016;353(6302):874.
47. Woolhouse MEJ, Ward MJ. Sources of Antimicrobial Resistance. *Science.* 2013;341(6153):1460.
48. Oliver SP, Murinda SE. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2012;28(2):165-85.
49. Verraes C, Van Boxtael S, Van Meervenne E, Van Coillie E, Butaye P, Catry B, et al. Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10(7):2643-69.
50. Livermore DM, Woodford N. The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol.* 2006;14(9):413-20.
51. Wright GD. Aminoglycoside-modifying enzymes. *Curr Opin Microbiol.* 1999;2(5):499-503.
52. Pinho MG, Filipe SR, de Lencastre H, Tomasz A. Complementation of the essential peptidoglycan transpeptidase function of penicillin-binding protein 2 (PBP2) by the drug resistance protein PBP2A in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 2001;183(22):6525-31.
53. McMurry L, Petrucci RE, Jr., Levy SB. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1980;77(7):3974-7.
54. Pattishall KH, Acar J, Burchall JJ, Goldstein FW, Harvey RJ. Two distinct types of trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase specified by R-plasmids of different compatibility groups. *J. Biol Chem.* 1977;252(7):2319-23.
55. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 2009;22(1):161-82.
56. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001;14(4):933-51.
57. Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin. Microbiol. Rev.* 2003;16(3):430-50.

58. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug resist.* 2010;13(6):151-71.
59. Roberts MC. Resistance to tetracycline, macrolide-lincosamide-streptogramin, trimethoprim, and sulfonamide drug classes. *Mol Biotechnol.* 2002;20(3):261-83.
60. Roberts MC. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiol Lett.* 2008;282(2):147-59.
61. Holzbauer S, Chiller T. Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. *Emerg. Infect. Dis.* 2006;12:1180-1.
62. Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol.* 2008;153 Suppl 1:S347-57.
63. Revilla C, Garcillan-Barcia MP, Fernandez-Lopez R, Thomson NR, Sanders M, Cheung M, et al. Different pathways to acquiring resistance genes illustrated by the recent evolution of IncW plasmids. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(4):1472-80.
64. Kelly BG, Vespermann A, Bolton DJ. Horizontal gene transfer of virulence determinants in selected bacterial foodborne pathogens. *Food Chem Toxicol.* 2009;47(5):969-77.
65. Wozniak RA, Waldor MK. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(8):552-63.
66. Blakely GW. Chapter 15 - Mechanisms of Horizontal Gene Transfer and DNA Recombination. In: Tang Y-W, Sussman M, Liu D, Poxton I, Schwartzman J, editors. *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*. Boston: Academic Press; 2015. p. 291-302.
67. Smillie C, Garcillán-Barcia MP, Francia MV, Rocha EPC, de la Cruz F. Mobility of Plasmids. *Microbiol. mol. biol. rev.* 2010;74(3):434.
68. Thomas V, de Jong A, Moyaert H, Simjee S, El Garch F, Morrissey I, et al. Antimicrobial susceptibility monitoring of mastitis pathogens isolated from acute cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;46(1):13-20.
69. Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clin. Infect. Dis.* 2009;49(11):1749-55.
70. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Twelfth Edition*. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: CLSI; 2018.

71. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing—version 8.0. ; 2018.
72. Woodford N, Sundsfjord A. Molecular detection of antibiotic resistance: when and where? J Antimicrob Chemother. 2005;56(2):259-61.
73. Gow SP, Waldner CL, Harel J, Boerlin P. Associations between Antimicrobial Resistance Genes in Fecal Generic *Escherichia coli*. Isolates from Cow-Calf Herds in Western Canada. Appl. Environ. Microbiol. 2008;74(12):3658.
74. Ruegg PL, Oliveira L, Jin W, Okwumabua O. Phenotypic antimicrobial susceptibility and occurrence of selected resistance genes in gram-positive mastitis pathogens isolated from Wisconsin dairy cows. J. Dairy Sci. 2015;98(7):4521-34.

CAPÍTULO 2 – FATORES DE RISCO PARA MASTITE SUBCLÍNICA EM REBANHOS LEITEIROS DO ESTADO DE GOIÁS, BRASIL

RESUMO

Estudos avaliando fatores de risco para mastite são úteis para o desenvolvimento de estratégias específicas de controle e prevenção da enfermidade. Considerando que os fatores de risco para mastite podem diferir entre as regiões e as propriedades leiteiras objetivou-se com este estudo avaliar os principais fatores de risco para mastite subclínica em rebanhos leiteiros no Estado de Goiás, Brasil. Foram coletadas amostras de leite para análise de contagem de células somáticas (CCS) individual de 1034 vacas em lactação de 27 propriedades leiteiras localizadas no Estado de Goiás, Brasil, nos meses de junho a agosto de 2019 (estação seca), em sete municípios Goianos. Foi aplicado um *checklist* em cada propriedade participante para obtenção de dados sobre os animais, as propriedades e o manejo higiênico e sanitário dos rebanhos. Estes dados foram obtidos por meio de entrevista ao produtor durante a visita à propriedade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico *R*. Uma vaca foi classificada como tendo mastite subclínica quando apresentou resultado de CCS > 200.000 células somáticas / mL. Realizou-se teste Qui-quadrado para independência e os fatores com tendência à significância ($p < 0,15$) foram incluídos para avaliação no modelo linear generalizado misto, que incluiu o efeito aleatório da fazenda. A prevalência de mastite subclínica nos rebanhos avaliados foi de 54,93%. Vacas com número de partos ≥ 4 tiveram 6,84 vezes mais chance de ter mastite subclínica do que vacas primíparas ($p = 0,001$). Animais com mais de 300 dias em lactação apresentaram 3,83 vezes mais chance de ter mastite subclínica do que vacas com até 100 dias em lactação ($p = 0,01$). Vacas com úbere abaixo do jarrete apresentaram 3,2 vezes mais chance ter mastite subclínica do que vacas com úbere acima do jarrete ($p = 0,01$). Os principais fatores de risco para mastite subclínica nos rebanhos leiteiros avaliados foram maior número de partos, estágio de lactação avançado e úbere abaixo do jarrete (penduloso). Com base nestes achados a substituição de vacas velhas no rebanho e a seleção genética para a conformação de úbere contribuiriam como parte de um programa de estratégias de controle e prevenção de mastite. Tais achados são importantes para ações de prevenção e controle da mastite na região.

Palavras-chave: contagem de células somáticas; estágio de lactação; número de partos; profundidade de úbere; vacas leiteiras.

ABSTRACT

Studies evaluated risk factors for mastitis are useful for the development of specific disease control and prevention strategies. What risk factors for mastitis may differ between regions and dairy properties are aimed at this study to evaluate the main risk factors for subclinical mastitis in dairy herds in the State of Goiás, Brazil. Milk samples were collected for analysis of individual somatic cell count (SCC) from 1034 lactating cows from 27 dairy farms located in the State of Goiás, Brazil, from June to August 2019 (dry season), in seven municipalities in Goiás. A checklist was applied to each participating property to use data from animals, such as properties and hygienic and sanitary management of herds. These data were used through an interview with the producer during a visit to the property. As statistical statistics were used as statistical software R. A cow was used as having subclinical mastitis when it presented a result of $SCC > 200,000$ somatic cells / mL. A Chi-square test for independence was performed and factors with a tendency to significance ($p < 0.15$) were included for evaluation in the mixed generalized linear model, which included the random effect of the farm. The prevalence of subclinical mastitis in reduced herds was 54.93%. Cows with parity ≥ 4 were 6.84 times more likely to have subclinical mastitis than primary cows ($p = 0.001$). Animals with more than 300 days of lactation shown 3.83 times more chances of subclinical mastitis than cows with up to 100 days of lactation ($p = 0.01$). Cows with udders below the hock described 3.2 times more likely to subclinical mastitis than cows with udders above the hock ($p = 0.01$). The main risk factors for subclinical mastitis in dairy herds are the number of larger deliveries, advanced lactation stage and udder below the hock (pendulum). Based on these findings, the replacement of old cows is not a herd and genetic selection for the formation of ulcers contributes as part of the mastitis control and prevention control program. These findings are important for actions to prevent and control mastitis in the region.

Keywords: dairy cows; lactation stage; number of deliveries; somatic cell count; udder depth.

1. INTRODUÇÃO

Os resultados de estudos avaliando fatores de risco para mastite são úteis para o desenvolvimento de estratégias específicas de controle e prevenção da enfermidade devido às diferenças etiológicas e epidemiológicas da mastite que ocorrem entre e dentro das regiões dos países. Isso é ainda mais importante em países com sistemas de produção semelhantes ao Brasil, no qual a indústria de laticínios ainda está em desenvolvimento, e o estabelecimento de programas de qualidade do leite em larga escala ainda é amplamente necessário¹. Dentre os Estados brasileiros, Goiás é o quarto maior produtor de leite, responsável por 9,11% da produção do país e 75,64% da produção da Região Centro-Oeste². No entanto, a alta prevalência de mastite nos rebanhos brasileiros tem sido um desafio para a indústria de laticínios³.

A mastite bovina é a doença mais comum e que mais causa prejuízos econômicos em rebanhos leiteiros em todo o mundo. Está associada à redução da produção de leite e do aumento do descarte deste devido à presença de resíduos de antimicrobianos. Além disso, essa enfermidade afeta o bem-estar animal, podendo levar a óbito ou ao descarte de animais infectados cronicamente⁴. A mastite subclínica, caracterizada pela ausência de sinais clínicos, é a forma mais comum e, embora o leite ainda possa ser comercializado, tem-se uma redução na qualidade do leite e de seus derivados³.

A incidência e prevalência de mastite, bem como a frequência dos patógenos causadores, variam entre países e rebanhos. A mastite é uma doença multifatorial e os fatores contribuintes estão relacionados às características individuais da vaca, manejo e condições ambientais⁵. Estudos em diversos países investigaram fatores associados à mastite⁶⁻⁸.

No Brasil, alguns estudos foram publicados, porém, pelo conhecimento dos autores, nenhum estudo foi realizado no Estado de Goiás para avaliar os fatores de risco relacionados ao animal. Considerando que os fatores de risco podem diferir entre as regiões e as propriedades leiteiras, objetivou-se com este estudo avaliar os principais fatores de risco para mastite subclínica em rebanhos leiteiros no Estado de Goiás.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo desse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CEP (Anexo 1) da Universidade Federal de Goiás (UFG), sob número de Parecer 3.306.634 e pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA (Anexo 2) da Universidade Federal de Goiás (UFG), registrado com o protocolo nº 027/19.

2.1. Checklist

Foi aplicado *checklist* (Anexo 3) em cada propriedade participante para obtenção de dados sobre os animais, as propriedades e o manejo higiênico e sanitário dos rebanhos. Estes dados foram obtidos por meio de entrevista ao produtor, por um único pesquisador, durante a visita à propriedade. Foram colhidas informações relacionadas a:

- 1) Características individuais das vacas: número de partos, dias em lactação, produção de leite, vazamento de leite nos tetos antes da ordenha, tetos perdidos.
- 2) Manejo de ordenha e controle de mastite: número de ordenhas, tipo de ordenha, número de animais por conjunto de ordenha, material das teteiras, extração automática das teteiras, manutenção do equipamento de ordenha, linha de ordenha (vacas com mastite ordenhadas por último ou separadamente), utilização de luvas descartáveis, lavagem dos tetos com água antes da ordenha, eliminação dos três primeiros jatos de leite (teste da caneca), realização do *pré-dipping*, secagem dos tetos, realização do *pós-dipping*, realização do teste *California Mastitis Test* (CMT), realização de análise de contagem de células somáticas (CCS) de amostras individuais de cada vaca, tratamento imediato da mastite clínica, tratamento de mastite subclínica durante a lactação, realização de cultura e antibiograma do leite, fornecimento de alimento às vacas durante a ordenha, fornecimento de alimento às vacas imediatamente após a ordenha, tratamento com antibiótico na secagem, uso de selante de tetos na secagem, utilização de vacinas para mastite, descarte de animais com mastite, utilização de água morna para enxágue da ordenhadeira, utilização de detergente alcalino com água quente, detergente ácido e sanitizante.
- 3) Propriedade: volume de produção diária de leite, número de vacas em lactação, CCS do tanque, assistência técnica, pagamento do leite de acordo com a qualidade e sistema de alojamento das vacas.

2.2. Coleta de amostras de leite para avaliação de mastite subclínica

Foram coletadas amostras de leite de 1.034 vacas em lactação (uma amostra individual composta por vaca) de 27 propriedades leiteiras localizadas no Estado de Goiás, nos meses de junho a agosto de 2019 (estação seca), em sete municípios Goianos (Anápolis, Goianápolis, Piracanjuba, Bela Vista, Silvânia, Gameleira de Goiás e Jaupaci).

As amostras (40 mL cada) foram representativas de uma ordenha completa de cada animal. Após a coleta, foram acondicionadas em frascos plásticos contendo um comprimido conservante bronopol (D&F Control Systems Inc., Dublin, EUA). As amostras foram imediatamente transportadas refrigeradas ($< 10\text{ }^{\circ}\text{C}$) em caixa isotérmica contendo gelo reciclável até o Laboratório de Qualidade do Leite (LQL), do Centro de Pesquisa em Alimentos (CPA), da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), da Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia - GO, para análise de contagem de células somáticas (CCS).

Foram avaliadas por meio de observação por um único avaliador mediante comparação com figuras (Anexo 4)⁹, antes da ordenha, a profundidade do úbere¹⁰, o grau de limpeza do úbere¹¹ e a condição da extremidade dos tetos¹² de todos os animais amostrados, conforme classificação abaixo:

- Profundidade do úbere:
 - Úbere acima do jarrete
 - Úbere na linha do jarrete
 - Úbere abaixo do jarrete
- Grau de limpeza do úbere:
 - Úbere totalmente limpo
 - Úbere pouco sujo
 - Úbere sujo
 - Úbere completamente sujo
- Condição da extremidade de todos os tetos funcionais
 - 1 = Extremidade do teto sem anel
 - 2 = Extremidade do teto com pequena formação de anel sem rugosidade
 - 3 = Extremidade do teto com formação de anel rugoso
 - 4 = Extremidade do teto com grande formação de anel rugoso

Posteriormente, foi calculado o escore médio dos tetos do animal, pela média das pontuações dos tetos funcionais¹².

2.3. Análise de Contagem de células somáticas

As análises de CCS foram realizadas utilizando o equipamento eletrônico Fossomatic 5000 Basic[®] (Foss Electric, Hillerød, Dinamarca), cujo princípio analítico baseia-se na citometria de fluxo, conforme descrito em ISO 13366-2 /IDF 148-2, sendo os resultados expressos em células/mL.

2.4. Análise estatística

Para análise estatística, uma vaca foi classificada como tendo mastite subclínica quando apresentou resultado de CCS > 200.000 células somáticas/mL na análise de leite de amostras compostas de vacas individuais¹³. As análises foram realizadas utilizando o software estatístico R na versão 3.6.1 com os pacotes lme4 e car¹⁴. Foram realizadas associações incondicionais (teste Qui-quadrado para independência) para avaliar se a ocorrência de mastite subclínica dependia dos fatores de risco avaliados. Os fatores com tendência à significância ($p < 0,15$) foram inicialmente incluídos para avaliação no modelo linear generalizado misto, que incluiu o efeito aleatório da fazenda. A análise foi realizada usando um procedimento de eliminação passo a passo. Após cada execução, a variável com maior valor de p foi excluída do modelo até que todas as variáveis tivessem $p < 0,05$. O resultado do modelo final, em que apenas variáveis com $p < 0,05$ foram mantidas, foi apresentado como Odds Ratio (Razão de chance) juntamente com seu intervalo de confiança de 95% para quantificar a probabilidade de ocorrência de mastite subclínica em relação aos fatores de risco. No modelo final, as interações bidirecionais com credibilidade biológica foram testadas.

3. RESULTADOS

Os dados demográficos dos rebanhos participantes da pesquisa estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados dos 27 rebanhos avaliados no presente estudo.

Fazendas	Número de vacas em lactação	Produção de leite (L/dia)	Produtividade de leite por vaca (L/vaca/dia)	CCS do leite do tanque x ($\times 10^3$ células/mL)
1	18	193	10,72	797
2	18	250	13,89	116
3	77	1137	14,77	1732
4	19	271	14,26	593
5	82	1250	15,24	340
6	29	300	10,34	508
7	64	1200	18,75	797
8	48	700	14,58	391
9	24	330	13,75	864
10	38	520	13,68	517
11	35	550	15,71	118
12	15	250	16,67	641
13	19	180	9,47	310
14	43	350	8,14	1003
15	13	140	10,77	234
16	17	372	21,88	319
17	13	250	19,23	140
18	68	1000	14,71	485
19	75	1090	14,53	236
20	110	3500	31,82	271
21	28	400	14,29	220,5
22	39	450	11,54	533
23	120	1400	11,67	334
24	23	200	8,70	494
25	18	200	11,11	799
26	24	420	17,50	320
27	39	450	11,54	310
Média	41,3	642,7	14,4	497,1
Mediana	29	400	14,3	391
Varição ¹	13 - 120	140 - 3500	8,1 - 31,8	116 - 1732

¹ Mínimo ao máximo

Das 27 propriedades, 11 (40,7%) obtiveram resultado da análise de CCS de amostras de leite do tanque acima de 500.000 células/mL, portanto acima do limite máximo estabelecido pela legislação brasileira (Figura 1).

O valor médio do resultado da análise de CCS individual das 1.034 vacas avaliadas foi de 712.150 células/mL. Dado o limite máximo de 200.000 células/mL¹⁵ estabelecido para os fins do estudo, apenas 45,07% das vacas foram consideradas saudáveis. A prevalência de mastite subclínica (CCS > 200.000 CS/mL), portanto, foi de 54,93%.

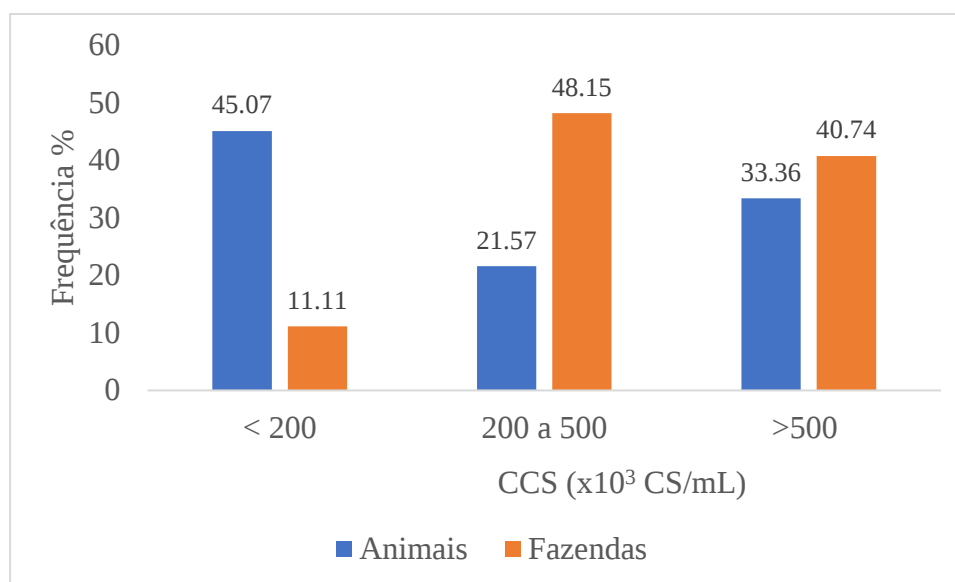


Figura 1 - Frequência (%) de fazendas e animais de acordo com a estratificação de CCS.

A maioria das vacas avaliadas eram mestiças, raças zebuínas (*Bos taurus indicus*) cruzadas com raças européias (*Bos taurus taurus*). No entanto, a maioria dos produtores não souberam informar com certeza a raça dos animais, nem os níveis de combinações das raças, por isso estes dados não foram incluídos na análise estatística.

Alguns dados do *checklist* foram comuns a todas as 27 propriedades participantes como: material das teteiras (borracha), não possuir extração automática de teteiras, fazer linha de ordenha (vacas com mastite ordenhadas por último ou separadamente), realizar tratamento imediato da mastite clínica e lavagem da ordenhadeira com detergente alcalino com água quente e detergente ácido. Outros dados do *checklist* tiveram apenas uma fazenda diferindo das demais, como é o caso da utilização de luvas (apenas em uma fazenda os ordenhadores utilizavam luvas descartáveis), número de ordenhas (apenas uma fazenda realizava três ordenhas ao dia), assistência técnica (apenas uma fazenda não recebia nenhum tipo de assistência técnica) e pagamento de acordo com a qualidade do leite (apenas uma fazenda não recebia de acordo com a qualidade do leite). Estes dados não foram incluídos como variáveis independentes na análise estatística.

As variáveis independentes foram analisadas separadamente pelo teste de qui-quadrado para independência para determinar as variáveis que afetaram o risco de mastite subclínica. As variáveis com $p < 0,15$ na ocorrência de casos de mastite subclínica foram selecionadas para gerar um modelo de regressão logística (Tabela 2).

Tabela 2 - Frequência de mastite subclínica para as variáveis explicativas relacionadas às características individuais da vaca, manejo de ordenha e controle de mastite e estrutura da fazenda com $p < 0,15$ no teste Qui-quadrado.

Grupo de variáveis	Variável independente	Categoria	Frequência	Frequência de mastite subclínica	p
Características individuais da vaca	Produção de leite (litros/dia)	<10	147/900 (16,33%)	100/147 (68,03%)	0,0005
		10 a 20	518/900 (57,56%)	282/518 (54,44%)	
		> 20	235/900 (26,11%)	112/235 (47,66%)	
	Número de partos	1	235/756 (31,08%)	66/235 (28,09%)	< 0,001
		2	200/756 (26,46%)	89/200 (44,5%)	
		3	122/756 (16,14%)	72/122 (59,02%)	
		>3	199/756 (26,32%)	150/199 (75,38%)	
	Dias em lactação (DEL)	Até 100	265/718 (36,91%)	108/265 (40,75%)	< 0,001
		101 a 200	206/718 (28,69%)	110/206 (53,40%)	
		201 a 300	150/718 (20,89%)	82/150 (54,67%)	
		>300	97/718 (13,51%)	67/97 (69,07%)	
	Profundidade do úbere	Acima do jarrete	480/939 (51,12%)	212/480 (44,17%)	< 0,001
		Na linha do jarrete	292/939 (31,10%)	172/292 (58,90%)	
		Abaixo do jarrete	167/939 (17,78%)	129/167 (77,25%)	
Manejo de ordenha e controle de mastite	Lavagem dos tetos com água	Sempre / quando sujo	490/1034 (47,39%)	283/490 (57,76%)	0,095
		Nunca	544/1034 (52,61%)	285/544 (52,39%)	
	Realização de pré-dipping	Sim	883/1034 (85,40%)	466/883 (52,77%)	0,001
		Não	151/1034 (14,60%)	102/151 (67,55%)	
	Fornecimento de alimento às vacas durante a ordenha	Sim	614/1034 (59,38%)	358/614 (58,31%)	0,010
		Não	420/1034 (40,62%)	210/420 (50%)	
	Tratamento de mastite subclínica durante a lactação	Sim	205/1034 (19,83%)	124/205 (60,49%)	0,088
		Não	829/1034 (80,17%)	444/829 (53,56%)	
	Realização de cultura e antibiograma do leite	Sim	297/1034 (28,72%)	131/297 (44,11%)	< 0,001
		Não	737/1034 (71,28%)	437/737 (59,29%)	
Estrutura da fazenda	Número de vacas em lactação	< 40	416/1034 (40,23%)	215/416 (51,68%)	0,097
		≥ 40	618/1034 (59,77%)	353/618 (57,12%)	

Houve relação significativa entre a frequência de mastite subclínica e o aumento do número de partos e do estágio de lactação das vacas ($P < 0,001$). Os animais com úbere abaixo do jarrete ($P < 0,001$) ou com produção de leite menor do que 10 litros/dia ($P = 0,0005$) apresentaram maior frequência de infecções subclínicas.

Entre as características de manejo de ordenha e controle de mastite avaliadas, observou-se aumento significativo no número de casos de mastite subclínica em vacas devido à não realização do pré-*dipping* ($P = 0,001$), fornecimento de alimento para os animais durante a ordenha ($P = 0,01$) e não realização de cultura e antibiograma do leite dos animais ($P < 0,001$).

Para minimizar a influência das particularidades dos rebanhos nos resultados do modelo, a fazenda foi incluída como variável de efeito aleatório. Nenhuma das interações bidirecionais foi significativamente associada à mastite, e, portanto, não foram incluídas no modelo final. O modelo que melhor explicou o risco de uma vaca ter mastite subclínica está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Odds ratio (OR) e intervalo de confiança (IC) de mastite subclínica de acordo com o modelo de regressão logística final para as variáveis explicativas relacionadas às características individuais da vaca e ao manejo de ordenha e controle de mastite.

Variável independente	Categoria	Frequência	Frequência de mastite	OR	IC 95%		p
					Inferior	Superior	
Produção de leite (litros/dia)	<10	147/900 (16,33%)	100/147 (68,03%)	3,93	1,7	9,07	0,01
	10 a 20	518/900 (57,56%)	282/518 (54,44%)	2,07	1,13	3,79	
	> 20 ¹	235/900 (26,11%)	112/235 (47,66%)				
Número de partos	1 ¹	235/756 (31,08%)	66/235 (28,09%)				0,001
	2	200/756 (26,46%)	89/200 (44,5%)	2,58	1,38	4,82	
	3	122/756 (16,14%)	72/122 (59,02%%)	4,02	2,02	7,98	
	≥4	199/756 (26,32%)	150/199 (75,38%)	6,84	3,53	13,22	
Dias em lactação (DEL)	Até 100 ¹	265/718 (36,91%)	108/265 (40,75%)				0,01
	101 a 200	206/718 (28,69%)	110/206 (53,40%)	1,87	1,1	3,2	
	201 a 300	150/718 (20,89%)	82/150 (54,67%)	2,23	1,22	4,06	
	>300	97/718 (13,51%)	67/97 (69,07%)	3,83	1,86	7,87	
Profundidade do úbere	Acima do jarrete ¹	480/939 (51,12%)	212/480 (44,17%)				0,01
	Na linha do jarrete ²	292/939 (31,10%)	172/292 (58,90%)	1,23	0,7	2,15	
	Abaixo do jarrete	167/939 (17,78%)	129/167 (77,25%)	3,20	1,5	6,83	

¹Categoria referência.

²Não significativo.

O modelo final incluiu quatro variáveis explicativas em relação ao animal: produção de leite, número de partos, dias em lactação e profundidade do úbere. Nenhuma variável em relação ao rebanho permaneceu no modelo final. Isto sugere que o manejo da saúde do úbere entre os rebanhos não diferiu substancialmente, enquanto as vacas sob o mesmo manejo diferiram mais no grau de exposição a patógenos causadores ou na suscetibilidade à infecção.

Vacas com produção de leite menor do que 10 litros/dia tiveram 3,93 vezes mais chances de terem mastite subclínica ($P=0,01$) do que vacas com produção maior que 20 litros/dia. O risco de mastite subclínica aumentou progressivamente com o aumento do número de partos. Por exemplo, vacas com número de partos ≥ 4 tiveram 6,84 vezes mais chances de ter CCS acima de 200.000 células / mL do que vacas primíparas ($P=0,001$). Animais com mais de 300 dias em lactação apresentaram maior probabilidade ($OR = 3,83$; $P=0,01$) de mastite subclínica em comparação a vacas no início da lactação (até 100 dias). Vacas com úbere abaixo do jarrete apresentaram maior risco de mastite subclínica ($OR = 3,2$; $P=0,01$) em comparação com vacas com úbere acima do jarrete.

4. DISCUSSÃO

A prevalência de mastite subclínica nos rebanhos avaliados no presente estudo foi de 54,93%. Essa alta prevalência de mastite é consequência da falta de um plano de qualidade de leite bem implementado, realidade não só do Estado de Goiás, como também de todo o Brasil. Altos índices de mastite subclínica também foram encontrados em diferentes Estados brasileiros. No estudo de Busanello et al.³, no qual avaliou-se 517 rebanhos leiteiros nos Estados de Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Pará, Goiás, Ceará e Bahia, quase metade (46,4%) das vacas estavam com mastite subclínica, situação que não melhorou ao longo do período de estudo (janeiro de 2011 a maio de 2015).

As variáveis independentes, como a realização de *pré-dipping*, o fornecimento de alimento para os animais durante a ordenha e a realização de cultura e antibiograma do leite dos animais, apesar de terem sido significativas no teste qui-quadrado, não contribuíram para o modelo estatístico final. É importante salientar que isso não significa que esses fatores não são relevantes para a probabilidade de ocorrência de mastite, mas que outros fatores introduzidos no modelo tiveram uma influência mais substancial nessa probabilidade.

Os procedimentos envolvidos na prevenção de mastite, como a realização do *pré-dipping*, podem parecer simples, mas a consistência da implementação do protocolo ao longo do tempo é crucial para uma redução da incidência de mastite. A realização do *pré-dipping*, que é a desinfecção dos tetos antes da ordenha, reduz a contaminação dos tetos antes da ordenha, o que diminui o risco de novas infecções intramamárias e a contagem bacteriana total (CBT) do leite¹⁶. No estudo de Costa et al.¹⁷, as fazendas em que os procedimentos de ordenha normalmente recomendados (teste da caneca, *pré-dipping*, *pós-dipping* e uso de toalhas individuais) não foram implementados simultaneamente tiveram maiores chances de ter *Staphylococcus aureus* detectado no leite de tanque.

A maior produção de leite tem sido relatada como um fator de risco no desenvolvimento de mastite¹⁸. Porém, no presente estudo a menor produção de leite representou um risco aumentado de mastite (OR = 3,93 para produção < 10 litros; p = 0,01 em comparação com produção > 20 litros). Este resultado deve ser interpretado biologicamente e não estatisticamente. A menor produção de leite é uma consequência da mastite, isto é, as vacas por terem mastite produzem menos leite e não o contrário¹⁹.

Interpretação semelhante foi feita no estudo de Pinedo et al.⁵, no qual vacas com menor produção de leite na lactação anterior apresentaram maiores chances de mastite

subclínica até 30 dias após o parto em comparação com vacas de alta produção, indicando que a saúde mamária na lactação anterior já estava prejudicada, o que resultou na menor produção de leite.

No presente estudo encontrou-se que as vacas com maior número de partos apresentaram maior risco de ocorrência de mastite subclínica (OR = 6,84; $p = 0,001$ para número de partos ≥ 4). Alguns fatores podem explicar o aumento do risco de mastite com número de partos crescente. Com a idade, a resistência a infecções mamárias pode diminuir por comprometimento das funções leucocitárias. Por exemplo, neutrófilos no sangue e no leite de vacas multíparas têm atividade fagocítica menos eficiente e produção de espécies reativas de oxigênio reduzida em comparação com neutrófilos de vacas primíparas²⁰. Além disso, os períodos de lactação subsequentes podem afetar a integridade do esfíncter dos tetos, por danos anatômicos ou hiperqueratose na extremidade dos tetos. Esses mecanismos de defesa intramamários e anatômicos abaixo do padrão podem explicar a maior incidência de mastite em vacas mais velhas. O aumento da suscetibilidade à mastite também pode ocorrer simplesmente pela exposição prolongada à infecção que acompanha a idade^{18, 20, 21}.

A transferência de infecção intramamária crônica persistindo de lactações anteriores também pode ser uma explicação possível para o aumento da suscetibilidade de vacas multíparas a mastites²⁰. Nesse caso, as vacas podem parecer clinicamente curadas, mas permanecem infectadas bacteriologicamente⁷.

Resultados concordantes foram encontrados em estudos anteriores. Keshavarzi et al.⁶ observaram que aumento no número de partos foi associado a um risco aumentado de mastite clínica. De acordo com Ramírez et al.⁸ as chances de uma vaca com número de partos ≥ 4 ter mastite subclínica foi maior que uma vaca primípara. Cardozo et al.¹⁵ observaram que vacas com 4 ou mais partos tiveram mais chances de ter uma nova infecção mamária subclínica do que vacas primíparas. De acordo com Taponen²¹ o número de partos foi positivamente associado a infecção mamária causada por estafilococos não-*aureus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis* e *Escherichia coli*. Firth et al.²² também encontraram que o risco de mastite clínica aumentou em associação com o número de lactações (ou seja, idade).

O aumento dos dias em lactação foi associado a um risco aumentado de mastite (OR = 3,83; $p = 0,01$ para DEL > 300) neste estudo. O aumento da CCS no final da lactação pode ser devido ao aumento da resposta celular das vacas a lesões residuais de infecções anteriores que resultam em grandes danos ao tecido mamário. Além disso, à medida que a

lactação progride, a oportunidade de exposição a patógenos que causam infecção mamária aumenta¹⁵. O processo de ordenha acarreta um risco de transferência de patógenos contagiosos, portanto, à medida que os meses em lactação aumentam, também aumenta o número de vezes que as vacas são expostas ao processo de ordenha, criando maior probabilidade cumulativa de exposição a agentes contagiosos⁸.

Similarmente Ramírez et al.⁸ observaram que à medida que o mês de lactação progrediu, as vacas aumentaram as chances de ter casos de mastite subclínica no quarto mamário. O número de dias que uma vaca esteve em lactação também afetou o risco de infecção subclínica crônica, especialmente para vacas em lactação por mais de 200 dias¹⁵. De acordo com Tolosa et al.²³ as chances de infecção intramamária causada por qualquer patógeno foram maiores em vacas em lactação tardia do que em vacas em início de lactação. Em outro estudo, vacas com mais de 250 dias em lactação apresentaram mais chances de ter mastite subclínica a nível de quarto mamário²⁴.

Uma maior oportunidade de contaminação devido à conformação da glândula mamária (OR = 3,20; p = 0,01 para úbere abaixo do jarrete), afetando o risco de ocorrência de mastite, foi demonstrada pelos resultados do presente estudo. O úbere penduloso fica mais próximo ao solo o que facilita o contato com patógenos no esterco, além de ser mais provável de sofrer injúrias. Semelhantemente, de acordo com Cardozo et al.¹⁵ vacas com base do úbere na linha do jarrete e abaixo do jarrete apresentaram maior risco de novos casos de mastite subclínica em relação a vacas com úbere acima do jarrete.

5. CONCLUSÕES

Os principais fatores de risco para mastite subclínica nos rebanhos leiteiros avaliados foram maior número de partos, estágio de lactação avançado e úbere abaixo do jarrete (penduloso). Com base nestes achados a substituição de vacas velhas no rebanho e a seleção genética para a conformação de úbere contribuiriam como parte de um programa de estratégias de controle e prevenção de mastite em rebanhos leiteiros do Estado de Goiás.

REFERÊNCIAS

1. Tomazi T, Ferreira GC, Orsi AM, Gonçalves JL, Ospina PA, Nydam DV, et al. Association of herd-level risk factors and incidence rate of clinical mastitis in 20 Brazilian dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 2018;161:9-18.
2. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa trimestral do leite. [acesso 17 set 2019]. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1086>.
3. Busanello M, Rossi RS, Cassoli LD, Pantoja JCF, Machado PF. Estimation of prevalence and incidence of subclinical mastitis in a large population of Brazilian dairy herds. *J. Dairy Sci.* 2017;100(8):6545-53.
4. Rocha LS, Silva DM, Silva MP, Vidigal PMP, Silva JCF, Guerra ST. Comparative genomics of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical and clinical bovine mastitis. *PLOS ONE*. 2019;14(8):1-19.
5. Pinedo PJ, Fleming C, Risco CA. Events occurring during the previous lactation, the dry period, and peripartum as risk factors for early lactation mastitis in cows receiving 2 different intramammary dry cow therapies. *J. Dairy Sci.* 2012;95(12):7015-26.
6. Keshavarzi H, Sadeghi-Sefidmazgi A, Stygar AH, Kristensen AR. Abortion and other risk factors for mastitis in Iranian dairy herds. *Livest. Sci.* 2019;219:40-4.
7. Santman-Berends IMGA, Swinkels JM, Lam TJGM, Keurentjes J, van Schaik G. Evaluation of udder health parameters and risk factors for clinical mastitis in Dutch dairy herds in the context of a restricted antimicrobial usage policy. *J. Dairy Sci.* 2016;99(4):2930-9.
8. Ramirez NF, Keefe G, Dohoo I, Sanchez J, Arroyave O, Ceron J, et al. Herd- and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in dairy farms from the High Plains of the northern Antioquia, Colombia. *J. Dairy Sci.* 2014;97(7):4141-50.
9. Canadian Bovine Mastitis and Milk Quality Research Network. [acesso 10 oct 2019]. Disponível em: https://www.medvet.umontreal.ca/rcrmb/en/page.php?p=12&tm=s#Practical_Illustrated_Sheets
10. Coentrão CM, Souza GN, Brito JRF, Paiva e Brito MAV, Lilenbaum W. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras. *Arq. bras. med. vet. zootec.* 2008;60:283-8.
11. Schreiner DA, Ruegg PL. Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 2003;86(11):3460-5.

12. Mein G, Neijenhuis F, Morgan W, Reinemann D, Hillerton E, Baines J, et al. Evaluation of Bovine Teat Condition in Commercial Dairy Herds: 1. Non-Infectious Factors. 2001.
13. Dohoo IR, Leslie KE. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. *Prev. Vet. Med.* 1991;10(3):225-37.
14. R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing, reference index version 3.6.1 (2019-07-05). "Action of the Toes". Copyright (C) 2019.
15. Cardozo LL, Thaler Neto A, Souza GN, Picinin LC, Felipus NC, Reche NL, et al. Risk factors for the occurrence of new and chronic cases of subclinical mastitis in dairy herds in southern Brazil. *J. Dairy Sci.* 2015;98(11):7675-85.
16. Santos MV, Fonseca LFL. Controle da Mastite e Qualidade do Leite: Desafios e Soluções. Pirassununga(SP);2019. 301p.
17. da Costa LB, Rajala-Schultz PJ, Schuenemann GM. Management practices associated with presence of *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk from Ohio dairy herds. *J. Dairy Sci.* 2016;99(2):1364-73.
18. Jamali H, Barkema HW, Jacques M, Lavalley-Bourget EM, Malouin F, Saini V, et al. Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2018;101(6):4729-46.
19. Cunha RPL, Molina LR, Carvalho AU, Facury Filho EJ, Ferreira PM, Gentilini MB. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. *Arq. bras. med. vet. zootec.* 2008;60:19-24.
20. Derakhshani H, Fehr KB, Sepehri S, Francoz D, De Buck J, Barkema HW, et al. Invited review: Microbiota of the bovine udder: Contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. *J. Dairy Sci.* 2018;101(12):10605-25.
21. Taponen S, Liski E, Heikkilä AM, Pyörälä S. Factors associated with intramammary infection in dairy cows caused by coagulase-negative staphylococci, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis*, or *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.* 2017;100(1):493-503.
22. Firth CL, Laubichler C, Schleicher C, Fuchs K, Käsbohrer A, Egger-Danner C, et al. Relationship between the probability of veterinary-diagnosed bovine mastitis occurring and farm management risk factors on small dairy farms in Austria. *J. Dairy Sci.* 2019;102(5):4452-63.

23. Tolosa T, Verbeke J, Ayana Z, Piepers S, Supre K, De Vliegher S. Pathogen group specific risk factors for clinical mastitis, intramammary infection and blind quarters at the herd, cow and quarter level in smallholder dairy farms in Jimma, Ethiopia. *Prev. Vet. Med.* 2015;120(3-4):306-12.
24. Mekonnen SA, Koop G, Melkie ST, Getahun CD, Hogeveen H, Lam T. Prevalence of subclinical mastitis and associated risk factors at cow and herd level in dairy farms in North-West Ethiopia. *Prev. Vet. Med.* 2017;145:23-31.

CAPÍTULO 3 – RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA FENOTÍPICA EM PATÓGENOS GRAM POSITIVOS CAUSADORES DE MASTITE CLÍNICA E SUBCLÍNICA EM VACAS LEITEIRAS

RESUMO

A mastite bovina é a doença mais comum e a principal razão do uso de antimicrobianos em vacas leiteiras em todo o mundo. No âmbito do uso responsável de antibióticos, o monitoramento da resistência antimicrobiana é enfatizado como uma ferramenta fundamental para se detectar e acompanhar o surgimento de resistência. Diante disso, objetivou-se com o presente estudo, determinar os perfis de resistência antimicrobiana de bactérias gram-positivas isoladas de casos de mastite clínica e subclínica. Foram coletadas amostras de leite de vacas em lactação de 27 propriedades leiteiras no Estado de Goiás, Brasil. Com base nos resultados de contagem de células somáticas (CCS) foram selecionadas amostras de animais com CCS > 200.000 células/mL, para análise de identificação bacteriana e posterior teste de sensibilidade aos antimicrobianos. A identificação dos micro-organismos causadores de mastite foi realizada utilizando o equipamento VITEK® 2 Compact e o teste de sensibilidade a antimicrobianos foi realizado pela técnica de disco difusão em ágar. Foi realizada a estatística descritiva dos dados, apresentando as frequências de distribuição dos patógenos e de resistência antimicrobiana. Foram identificados 113 micro-organismos, cocos gram-positivos, causadores de mastite subclínica e 103 causadores de mastite clínica em vacas leiteiras. *Staphylococcus* spp. (53,10%), particularmente *S. aureus* (30,09%), destacou-se como um dos agentes mais comuns envolvidos na etiologia da mastite subclínica bovina. Já entre os patógenos causadores de mastite clínica, *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. apresentaram a mesma frequência (45,63%), sendo o *S. aureus* (15,53%) e o *S. uberis* (15,53%) as principais espécies. No geral, os patógenos gram-positivos causadores de mastite bovina foram suscetíveis à maioria dos antimicrobianos testados. As maiores taxas de resistência antimicrobiana foram de *Staphylococcus aureus* à penicilina (76%) e ampicilina (74%), *Streptococcus* spp. à neomicina (65,08%), gentamicina (46,03) e tetraciclina (43,66%) e *Enterococcus* spp. à tetraciclina (52,38%). Tais resultados demonstram que o problema da resistência bacteriana é uma realidade, reforçando a necessidade do uso racional de antimicrobianos.

Palavras-chave: disco difusão; micro-organismos; resistência antimicrobiana; *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Bovine mastitis is a more common disease and the main reason for the use of antimicrobials in dairy cows worldwide. In the context of responsible use of antibiotics, monitoring of antimicrobial resistance is emphasized as a fundamental tool for detecting and monitoring or operating resistance. Therefore, this study aims to determine the antimicrobial resistance profiles of Gram-positive bacteria isolated from cases of clinical and subclinical mastitis. Twenty-seven dairy cows were collected with lactation from 27 dairy farms in the State of Goiás, Brazil. Based on the somatic cell count (SCC) results, animals with $SCC > 200,000$ cells / mL were selected for analysis of bacterial identification and subsequent sensitivity testing for antimicrobials. The identification of mastitis-causing microorganisms was performed using the VITEK[®] 2 Compact equipment and the antimicrobial sensitivity test was performed using the agar diffusion disc technique. Descriptive statistics of the data was performed, displayed as frequencies of pathogen distribution and antimicrobial resistance. One hundred thirteen microorganisms, gram-positive cocci, causing subclinical mastitis and 103 causing clinical mastitis in dairy cows were used. *Staphylococcus* spp. (53.10%), particularly *S. aureus* (30.09%), stood out as one of the most common agents involved in the etiology of bovine subclinical mastitis. Among the pathogens that cause clinical mastitis, *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. presented the same frequency (45.63%), with *S. aureus* (15.53%) and *S. uberis* (15.53%) as the main species. Overall, gram-positive pathogens that cause bovine mastitis were susceptible to most of the tested antimicrobials. The highest rates of antimicrobial resistance were *Staphylococcus aureus* to penicillin (76%) and ampicillin (74%), *Streptococcus* spp. to neomycin (65.08%), gentamicin (46.03) and tetracycline (43.66%) and *Enterococcus* spp. tetracycline (52.38%). These results demonstrate that the problem of bacterial resistance is a reality, reinforcing the need for rational use of antimicrobials.

Keywords: antimicrobial resistance; disc diffusion; microorganisms; *Staphylococcus aureus*.

1. INTRODUÇÃO

A mastite pode ocorrer na forma clínica ou subclínica, sendo a última forma a mais frequente. A mastite subclínica é caracterizada pela falta de sintomas ou alterações aparentes no leite, no entanto, ocorre redução na qualidade e na produção de leite¹.

A mastite pode ser causada por diversos micro-organismos, que apresentam patogenicidade e ocorrência diferentes entre os rebanhos leiteiros. Os estafilococos (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* spp. não-*aureus*) são os agentes causadores de mastite mais frequentemente isolados de amostras de leite assepticamente coletadas². *Staphylococcus aureus* pode causar mastite clínica em bovinos, mas está associado principalmente à infecção subclínica, que geralmente é persistente¹.

Um dos fatores agravantes da infecção mamária por *S. aureus* é a capacidade desta bactéria de evasão do sistema imunológico do hospedeiro e da atividade dos antimicrobianos, resultando em infecções persistentes e recorrentes³. *S. aureus* possui alta capacidade de invasão do tecido da glândula mamária e algumas cepas apresentam capacidade de produção de toxinas e de formação de biofilmes. Pode ocorrer formação de tecido fibroso e microabscessos, o que reduz o acesso de antimicrobianos ao local da infecção e diminui a chance de cura⁴. Portanto, a principal medida para evitar a disseminação dessa bactéria para todo o rebanho é segregar ou eliminar os animais infectados¹.

Os micro-organismos causadores de mastite podem ser classificados, com base na via de transmissão, em predominantemente contagiosos ou ambientais. *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* foram relatados como os patógenos predominantemente contagiosos mais importantes que causam mastite em vacas leiteiras. Patógenos contagiosos continuam sendo um desafio em países com uma cadeia produtiva de leite em desenvolvimento, como o Brasil, onde práticas conhecidas de controle de mastite ainda não são amplamente adotadas⁵.

A fonte de microrganismos causadores de mastite ambiental é o próprio local onde a vaca vive, especialmente onde há acúmulo de matéria orgânica e umidade. Os microrganismos predominantemente ambientais são considerados agentes oportunistas, dentre eles os *Streptococcus uberis* e *Enterococcus* spp.⁴.

O aumento da resistência de micro-organismos a antimicrobianos é um problema mundial e o uso não responsável de antimicrobianos em humanos e animais produtores de alimentos é um importante contribuinte para este aumento⁶. O uso não criterioso de antimicrobianos para o tratamento de mastite em bovinos leiteiros tem sido associado ao

aumento da resistência antimicrobiana e cepas resistentes causadoras de mastite bovina têm sido relatadas⁷.

O uso adequado de antimicrobianos em fazendas leiteiras contribui para melhorar o bem-estar dos animais e a sustentabilidade das fazendas leiteiras, mas nem todos os casos de mastite se beneficiarão da terapia antimicrobiana. Alguns casos de mastite não severas são negativas na cultura bacteriológica ou são causadas por patógenos com altas taxas de cura bacteriológica espontânea, como os coliformes, portanto nestes casos o tratamento com antimicrobiano pode ser desnecessário⁸.

Dados da Vigilância Europeia de Consumo Antimicrobiano Veterinário, da Agência Europeia de Medicamentos, mostraram que tetraciclina, penicilinas e sulfonamidas foram as três classes de antimicrobianos mais vendidas para uso veterinário. As vendas de tetraciclina, penicilinas e sulfonamidas, representaram 66,5% do total das vendas em 31 países europeus no ano de 2017⁹. Nos Estados Unidos, tetraciclina e penicilinas representaram 76% dos antimicrobianos aprovados para uso em animais destinados à produção de alimentos comercializados no ano de 2017¹⁰. No Brasil faltam dados nacionais do consumo de antimicrobianos. O registro uniforme do consumo nacional de antibióticos na medicina veterinária é altamente valioso. Faltam dados de consumo por espécie animal e/ou por indicação clínica para ajudar a explicar as diferenças de suscetibilidade a antimicrobianos entre os países¹¹.

No âmbito do uso responsável de antimicrobianos, o monitoramento da resistência antimicrobiana é enfatizado como uma ferramenta fundamental para detectar e acompanhar o surgimento de resistência, além de fornecer dados aos veterinários e indústrias farmacêuticas que possam otimizar a terapia antimicrobiana. Os dados podem ajudar a fornecer um tratamento racional para tratar animais doentes e garantir seu bem-estar. Além disso, os dados gerados pelos estudos de vigilância de resistência antimicrobiana podem ter impacto no desenvolvimento de políticas futuras do uso de antimicrobianos¹¹.

No Brasil não há monitoramento da suscetibilidade antimicrobiana de patógenos isolados de vacas com mastite que seja realizado e publicado regularmente e em nível nacional, como ocorre em outros países¹², o que aumenta a importância dos estudos pontuais realizados. Diante disso, objetivou-se com o presente estudo determinar os perfis de resistência antimicrobiana das bactérias gram-positivas isoladas de casos de mastite clínica e subclínica no Estado de Goiás, Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo desse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CEP (Anexo 1) da Universidade Federal de Goiás (UFG), sob número de Parecer 3.306.634 e pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA (Anexo 2) da Universidade Federal de Goiás (UFG), registrado com o protocolo nº 027/19.

2.1. Coleta de amostras de leite de mastite subclínica

Foram coletadas amostras de leite de 1.034 vacas em lactação de 27 propriedades leiteiras localizadas no Estado de Goiás, em sete municípios Goianos (Anápolis, Goianápolis, Piracanjuba, Bela Vista, Silvânia, Gameleira de Goiás e Jaupaci).

Foi realizada a coleta de duas amostras individuais compostas de leite de uma ordenha (40 mL cada). Uma amostra foi acondicionada em frasco plástico contendo um conservante bronopol (D&F Control Systems Inc., Dublin, EUA). A outra amostra foi acondicionada em frasco plástico esterilizado sem conservante. As amostras foram transportadas em caixa isotérmica contendo gelo reciclável até o Centro de Pesquisa em Alimentos (CPA), da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG). As amostras com conservante foram encaminhadas ao Laboratório de Qualidade do Leite (LQL) para análise de Contagem de Células Somáticas. As amostras sem conservante foram mantidas congeladas (-18°C) até a obtenção do resultado de CCS das amostras correspondentes (em média sete dias). A partir dos resultados de CCS foram selecionadas 10% de amostras de cada propriedade, dos animais com CCS > 200.000 CS/mL, para análise de identificação bacteriana e posterior teste de sensibilidade aos antimicrobianos.

2.2. Coleta de amostras de leite de mastite clínica

As amostras de leite de mastite clínica, coletadas pelos próprios produtores, técnicos ou médicos veterinários, foram provenientes de 37 propriedades leiteiras localizadas no Estado de Goiás, em 16 municípios Goianos (Rio Verde, Corumbá de Goiás, Jandaia, Jataí, Montevídiu, Aparecida do Rio Doce, Quirinópolis, Santa Helena de Goiás, Mineiros, Santo Antônio da Barra, Uruana, Hidrolândia, Silvânia, Alexânia, Bela Vista e Piracanjuba).

Os coletores foram instruídos a realizar a coleta asséptica de amostras de leite de quartos mamários com mastite clínica em frascos plásticos esterilizados. Após a coleta, as

amostras foram congeladas e encaminhadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável para o Centro de Pesquisa em Alimentos (CPA/EVZ/UFG) para análise de identificação bacteriana e posterior teste de sensibilidade aos antimicrobianos.

2.3. Isolamento bacteriano

Para realização do isolamento e identificação dos micro-organismos causadores de mastite clínica e subclínica, as amostras de leite (10 µL) foram semeadas em placas de Petri contendo ágar triptona de soja (TSA - Tryptic Soy Agar) usando alças esterilizadas, e incubadas aerobicamente a 37°C por 24 a 48 horas. Após a incubação, foi observado o tipo de colônia predominante em cada placa e uma colônia deste tipo foi selecionada para realização da coloração de Gram, permitindo a caracterização morfológica por meio da microscopia óptica (objetiva 100 x). Placas com três tipos de colônias distintas foram consideradas contaminadas e descartadas. Optou-se por selecionar para identificação apenas placas contendo cocos Gram-positivos. As colônias selecionadas foram repicadas em ágar TSA a 37°C por 18 a 24 horas em condições de aerobiose¹³.

Após a incubação, transferiu-se, com auxílio de alça esterilizada, um número suficiente de colônias morfológicamente idênticas (cerca de 2 a 5) para um tubo de ensaio contendo 3 mL de solução salina 0,45% esterilizada até atingir concentração equivalente a um padrão 0,50 a 0,63 na escala McFarland, usando o calibrador DensiCHEK™ Plus (BioMérieux®, Marcy l'Etoile, França). Colocou-se o tubo de vidro contendo a suspensão homogênea de micro-organismos e o cartão VITEK® 2GP em um cassete e introduziu-se no equipamento VITEK® 2 Compact (BioMérieux®, Marcy l'Etoile, França) para identificação bacteriana a nível de espécie por meio de testes bioquímicos¹³.

No total, foram realizadas 216 análises microbiológicas para identificações bacterianas (103 de mastite clínica e 113 de mastite subclínica).

2.4. Teste de sensibilidade a antimicrobianos

O teste de sensibilidade a antimicrobianos foi realizado pela técnica de disco difusão em ágar, de acordo com as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)¹⁴. Os isolados foram classificados como resistentes, intermediários ou sensíveis aos antimicrobianos. Os critérios interpretativos estão apresentados no Quadro 1. A multirresistência foi definida como resistência a três ou mais grupos antimicrobianos⁽¹⁵⁾. Os grupos antimicrobianos testados foram os seguintes: penicilina (ampicilina, cefoxitina e

penicilina G); cefalosporina (ceftiofur); macrolídeo (eritromicina); fluoroquinolona (enrofloxacina e ciprofloxacina); aminoglicosídeo (gentamicina e neomicina); inibidor da via do folato (sulfametoxazol/ trimetoprim); e tetraciclina (tetraciclina).

Para o teste, utilizou-se colônias provenientes de cultura recente em ágar TSA. Com uma alça bacteriológica esterilizada suspendeu-se a colônia a ser testada em solução salina esterilizada (NaCL 0,85%) até obter-se uma turvação equivalente a 0,5 na escala MacFarland, equivalente a uma concentração de 1×10^8 UFC/mL do inóculo. Utilizou-se o instrumento DensiCHEK™ Plus (BioMérieux®, Marcy l'Etoile, França) para medir a densidade óptica da suspensão bacteriana. Introduziu-se um swab esterilizado na suspensão bacteriana e semeou-se em seguida de forma suave, em pelo menos cinco direções, na placa de Petri contendo ágar Mueller Hinton, ou Mueller Hinton com 5% de sangue de carneiro desfibrinado no caso de *Streptococcus* spp., abrangendo toda a superfície. Após 3 a 5 minutos, para a superfície do ágar secar, colocou-se os discos de antibióticos sobre a superfície do meio inoculado, com auxílio de uma pinça flambada e resfriada, exercendo uma leve pressão com a ponta da pinça para uma boa adesão dos discos. Utilizou-se no máximo cinco discos em placas de 90x15mm. Incubou-se a placa com os discos em estufa bacteriológica a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas, em condições de aerobiose. Utilizou-se para controle de qualidade cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

2.5. Análise dos dados

Foi realizada a estatística descritiva dos dados, apresentando tabelas de frequência de distribuição dos patógenos e de resistência antimicrobiana.

Quadro 1 - Critérios interpretativos do diâmetro de inibição de acordo com os gêneros bacterianos.

Gênero bacteriano	Classe de antibióticos	Antibióticos	Conteúdo do disco	R (mm)	I (mm)	S (mm)	Referência
<i>Staphylococcus</i> spp.	Aminoglicosídeo	Gentamicina	10 µg	≤12	13-14	≥15	CLSI ¹
		Neomicina	30 µg	≤12	13-16	≥17	CLSI
	Cefalosporina	Ceftiofur	10 µg	≤17	18-20	≥21	CLSI
	Fluoroquinolona	Ciprofloxacina	5 µg	≤15	16-20	≥21	CLSI
		Enrofloxacin	5 µg	≤16	17-22	≥23	CLSI
	Inibidor da via do folato	Sulfametoxazol/Trimetoprim	25 µg	≤10	11-15	≥16	CLSI
	Macrolídeo	Eritromicina	15 µg	≤13	14-22	≥23	CLSI
	Penicilina	Ampicilina	10 µg	≤28	-	≥29	CLSI
		Cefoxitina	30 µg	≤21 aureus ≤24 SCN	-	≥22 aureus ≥25 SCN	CLSI
		Penicilina	10 UI	≤28	-	≥29	CLSI
	Tetraciclina	Tetraciclina	30 µg	≤14	15-18	≥19	CLSI
<i>Streptococcus</i> spp.	Aminoglicosídeo	Gentamicina	10 µg	≤12	13-14	≥15	CLSI
		Neomicina	30 µg	≤12	13-16	≥17	CLSI
	Cefalosporina	Ceftiofur	30 µg	≤17	18-20	≥21	CLSI
	Fluoroquinolona	Ciprofloxacina	5 µg	≤15	16-20	≥21	CLSI
		Enrofloxacin	5 µg	≤16	17-22	≥23	CLSI
	Inibidor da via do folato	Sulfametoxazol/Trimetoprim	25 µg	<15	15-17	≥18	BrCast ²
	Macrolídeo	Eritromicina	15 µg	≤15	16-20	≥21	CLSI
	Penicilina	Ampicilina	10 µg	-	-	≥24	CLSI
		Cefoxitina	30 µg	-	-	-	-
		Penicilina	10 UI	-	-	≥24	CLSI
	Tetraciclina	Tetraciclina	30 µg	≤18	19-22	≥23	CLSI
<i>Enterococcus</i> spp.	Fluoroquinolona	Ciprofloxacina	5 µg	≤15	16-20	≥21	CLSI
		Enrofloxacin	5 µg	-	-	-	-
	Macrolídeo	Eritromicina	15 µg	≤13	14-22	≥23	CLSI
	Penicilina	Penicilina	10 UI	≤14	-	≥15	CLSI
		Ampicilina	10 µg	≤16	-	≥17	CLSI
	Tetraciclina	Tetraciclina	30 µg	≤14	15-18	≥19	CLSI

R = resistente, I = intermediário, S = sensível

¹ Clinical and Laboratory Standards Institute¹⁴² Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing¹⁶

3. RESULTADOS

Na tabela 1 estão apresentadas as amostras de leite de mastite clínica e subclínica que foram analisadas.

Tabela 1 - Amostras de leite de mastite clínica e subclínica analisadas e classificadas de acordo com a coloração de Gram das colônias, ausência de crescimento e contaminação (três ou mais colônias distintas na mesma placa).

Amostras analisadas	Mastite clínica		Mastite subclínica	
	n	%	n	%
Gram-positivas	165	69.3	164	85.9
Gram-negativas	34	14.3	23	12.0
Sem crescimento	33	13.9	4	2.1
Contaminadas	6	2.5	0	0.0
Total	238	100	191	100

n = número de amostras plaqueadas

Foram identificados 113 micro-organismos, cocos gram-positivos, causadores de mastite subclínica (CCS > 200.000 CS/mL) e 103 causadores de mastite clínica. Os principais agentes envolvidos na etiologia da mastite subclínica foram *Staphylococcus* spp. (53,10%), principalmente *S. aureus* (30,09%) e *S. chromogenes* (7,08%), seguido de *Streptococcus* spp. (22,12%) e *Enterococcus* sp (16,81%) (Tabela 2).

Os principais agentes envolvidos na etiologia da mastite clínica foram *Staphylococcus* spp. (45,63%) e *Streptococcus* spp., (45,63%). As espécies predominantes de *Staphylococcus* spp. foram *S. aureus* (15,53%) e *S. chromogenes* (11,65%), e de *Streptococcus* spp. foram *S. uberis* (15,53%), *S. agalactiae* (12,62%) e *S. dysgalactiae* (12,62%) (Tabela 3).

Tabela 2 - Distribuição dos isolados bacterianos, cocos Gram-positivos, de amostras de leite de vacas com mastite subclínica.

Espécies	Número	%
Estafilococos	60	53,10
<i>Staphylococcus aureus</i>	34	30,09
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	8	7,08
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4	3,54
<i>Staphylococcus lentus</i>	4	3,54
<i>Staphylococcus spp.</i>	3	2,66
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	2	1,77
<i>Staphylococcus simulans</i>	2	1,77
<i>Staphylococcus hominis hominis</i>	1	0,89
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	0,89
<i>Staphylococcus xylosus</i>	1	0,89
Estreptococos	25	22,12
<i>Streptococcus agalactiae</i>	13	11,50
<i>Streptococcus uberis</i>	9	7,97
<i>Streptococcus pluranimalium</i>	1	0,89
<i>Streptococcus alactolyticus</i>	1	0,89
<i>Streptococcus spp.</i>	1	0,89
Enterococos	19	16,81
<i>Enterococcus faecium</i>	9	7,96
<i>Enterococcus faecalis</i>	7	6,19
<i>Enterococcus avium</i>	1	0,89
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1	0,89
<i>Enterococcus spp.</i>	1	0,89
Outros	9	7,96
<i>Lactococcus spp.</i>	2	1,77
<i>Lactococcus garviae</i>	1	0,89
<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	1	0,89
<i>Aerococcus viridans</i>	1	0,89
<i>Alloiococcus otitis</i>	1	0,89
<i>Gemella morbilorum</i>	1	0,89
<i>Kocuria spp.</i>	1	0,89
<i>Turicella otitidis</i>	1	0,89
TOTAL	113	100,00

Tabela 3 - Distribuição dos isolados bacterianos, cocos Gram-positivos, de amostras de leite de vacas com mastite clínica.

Espécies	Número	%
Estafilococos	47	45,63
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	15,53
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	12	11,65
<i>Staphylococcus</i> sp	6	5,83
<i>Staphylococcus xylosus</i>	4	3,88
<i>Staphylococcus arlettae</i>	2	1,94
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2	1,94
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	0,97
<i>Staphylococcus hominis hominis</i>	1	0,97
<i>Staphylococcus simulans</i>	1	0,97
<i>Staphylococcus sciuri</i>	1	0,97
<i>Staphylococcus warneri</i>	1	0,97
Streptococos	47	45,63
<i>Streptococcus uberis</i>	16	15,53
<i>Streptococcus agalactiae</i>	13	12,62
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	13	12,62
<i>Streptococcus</i> spp.	2	1,94
<i>Streptococcus gal. gallolyticus</i>	1	0,97
<i>Streptococcus mitis</i>	1	0,97
<i>Streptococcus pseudoporcinus</i>	1	0,97
Enterococos	2	1,94
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	0,97
<i>Enterococos faecium</i>	1	0,97
Outros	7	6,80
<i>Aerococcus viridans</i>	1	0,97
<i>Kocuria kristinae</i>	4	3,88
<i>Kocuria</i> spp.	1	0,97
<i>Lactococcus garviae</i>	1	0,97
TOTAL	103	100,00

Os isolados de *S. aureus* apresentaram alta taxa de resistência à penicilina (76%) e ampicilina (74%). *Staphylococcus* spp. (não *S. aureus*) também apresentaram alta resistência à penicilina (56,14%) e ampicilina (45,61%). Em relação à cefoxitina, 8,33% dos isolados de *S. aureus* e 12,28% dos isolados de *Staphylococcus* spp. (não aureus) foram resistentes (Tabelas 4 e 5).

Os isolados de *Streptococcus* spp. apresentaram alta suscetibilidade à ampicilina (98,53%), penicilina (95,71%), ceftiofur (98,59%) e sulfazotrim (76,19%). As maiores taxas de resistência antimicrobiana foram observadas para gentamicina (46,03%), neomicina

(65,08%), tetraciclina (43,66%) e eritromicina (23,19%) (Tabela 6). Os isolados de *Enterococcus* spp. apresentaram maiores taxas de resistência à tetraciclina (52,38%), eritromicina (19,05%), ciprofloxacina (9,52%) e penicilina (9,52%) (Tabela 7).

Tabela 4 - Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados (n = 50) de amostras de leite de vacas leiteiras com mastite clínica ou subclínica.

Antimicrobianos	Suscetibilidade antimicrobiana					
	R		I		S	
	n	%	n	%	n	%
Ampicilina	37	74,00	-	-	13	26,00
Cefoxitina	4	8,33	-	-	44	91,67
Ceftiofur	-	-	-	-	48	100,00
Ciprofloxacina	-	-	1	2,00	49	98,00
Enrofloxacin	-	-	2	4,17	46	95,83
Eritromicina	1	2,00	4	8,00	45	90,00
Gentamicina	1	2,13	-	-	46	97,87
Penicilina	38	76,00	-	-	12	24,00
Neomicina	-	-	-	-	47	100,00
Sulfazotrim	-	-	-	-	47	100,00
Tetraciclina	3	6,00	-	-	47	94,00

R = resistente, I = intermediário, S = sensível, n = número de isolados.

Tabela 5 - Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. (não *aureus*) isolados (n = 57) de amostras de leite de vacas leiteiras com mastite clínica ou subclínica.

Antimicrobianos	Suscetibilidade antimicrobiana					
	R		I		S	
	n	%	n	%	n	%
Ampicilina	26	45,61	-	-	31	54,39
Cefoxitina	7	12,28	-	-	50	87,72
Ceftiofur	-	-	2	3,51	55	96,49
Ciprofloxacina	-	-	-	-	54	100,00
Enrofloxacin	-	-	-	-	57	100,00
Eritromicina	5	8,93	5	8,93	46	82,14
Gentamicina	1	1,89	-	-	52	98,11
Penicilina	32	56,14	-	-	25	43,86
Neomicina	-	-	-	-	52	100,00
Sulfazotrim	1	1,85	-	-	53	98,15
Tetraciclina	7	12,28	-	-	50	87,72

R = resistente, I = intermediário, S = sensível, n = número de isolados.

Tabela 6 - Suscetibilidade antimicrobiana de *Streptococcus* spp. isolados (n = 72) de amostras de leite de vacas leiteiras com mastite clínica ou subclínica.

Antimicrobianos	Suscetibilidade antimicrobiana					
	R		I		S	
	n	%	n	%	n	%
Ampicilina	1	1,47	-	-	67	98,53
Cefoxitina	-	-	-	-	-	-
Ceftiofur	-	-	1	1,41	70	98,59
Ciprofloxacina	1	1,45	23	33,33	45	65,22
Eritromicina	16	23,19	3	4,35	50	72,46
Enrofloxacina	3	4,23	26	36,62	42	59,15
Gentamicina	29	46,03	11	17,46	23	36,51
Penicilina	3	4,29	-	-	67	95,71
Neomicina	41	65,08	15	23,81	7	11,11
Sulfazotrim	5	7,94	10	15,87	48	76,19
Tetraciclina	31	43,66	5	7,04	35	49,30

R = resistente, I = intermediário, S = sensível, n = número de isolados.

Tabela 7 - Suscetibilidade antimicrobiana de *Enterococcus* spp. isolados (n = 21) de amostras de leite de vacas leiteiras com mastite clínica ou subclínica.

Antimicrobianos	Suscetibilidade antimicrobiana					
	R		I		S	
	n	%	n	%	n	%
Ampicilina	1	4,76	-	-	20	95,24
Cefoxitina	-	-	-	-	-	-
Ciprofloxacina	2	9,52	15	71,43	4	19,05
Eritromicina	4	19,05	6	28,57	11	52,38
Enrofloxacina	-	-	-	-	-	-
Penicilina	2	9,52	-	-	19	90,48
Tetraciclina	11	52,38	-	-	10	47,62

R = resistente, I = intermediário, S = sensível, n = número de isolados.

Tabela 8 - Proporções de isolados multisensíveis, resistentes a uma ou duas classes de antimicrobianos e multirresistentes.

Espécies bacterianas	Total de isolados	Padrões de suscetibilidade dos isolados	Número de isolados	Proporção (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	50	Multisuscetível	10	20,00
		Intermediário	1	2,00
		Resistente a 1 classe de ATB	35	70,00
		Resistente a 2 classes de ATB	4	8,00
		Multirresistente	0	0,00
<i>Staphylococcus</i> spp. (não aureus)	57	Multisuscetível	17	29,82
		Intermediário	3	5,26
		Resistente a 1 classe de ATB	24	42,11
		Resistente a 2 classes de ATB	11	19,30
		Multirresistente	2	3,51
<i>Streptococcus</i> spp.	72	Multisuscetível	3	4,17
		Intermediário	15	20,83
		Resistente a 1 classe de ATB	26	36,11
		Resistente a 2 classes de ATB	15	20,83
		Multirresistente	13	18,06
<i>Enterococcus</i> spp.	21	Multisuscetível	1	4,76
		Intermediário	6	28,57
		Resistente a 1 classe de ATB	8	38,10
		Resistente a 2 classes de ATB	6	28,57
		Multirresistente	0	0,00

4. DISCUSSÃO

***Staphylococcus* spp.**

Entre os *S. aureus* as maiores taxas de resistência foram para as penicilinas, sendo 76% para penicilina e 74% para ampicilina. A produção de enzimas beta-lactamases, codificadas pelo gene *blaZ*, que hidrolisam o anel beta-lactâmico ou a produção de proteínas de ligação à penicilina de baixa afinidade, codificadas pelo gene *mecA*, são as prováveis causas da resistência¹⁷. As penicilinas são amplamente utilizadas no tratamento intramamário da mastite bovina, e isso pode estar relacionado ao aumento da resistência¹⁸.

Resultados semelhantes foram encontrados por Dorneles et al.⁷ no Estado de Minas Gerais, também utilizando o método de disco difusão, em que 76,1% e 78,9% dos *S. aureus* foram resistentes a ampicilina e penicilina, respectivamente. Por outro lado, DeJong et al.¹², analisando amostras de mastite clínica de nove países europeus, observaram que apenas 25% dos *S. aureus* foram resistentes à penicilina. Essa diferença sugere que a suscetibilidade dos estafilococos à penicilina varia de acordo com o país ou região.

Assim como os *S. aureus*, as maiores taxas de resistência dos *Staphylococcus* spp. (não *aureus*) foram para penicilina (56,14%) e ampicilina (45,61%). A taxa de resistência para tetraciclina (12,28%) foi semelhante à encontrada por Nobrega et al.¹⁹ (12%) para estafilococos não *aureus* isolados de leite de vaca de rebanhos canadenses.

No presente estudo, 8,33% dos isolados de *S. aureus* e 12,28% dos isolados de *Staphylococcus* spp. (não *aureus*) foram resistentes à cefoxitina/oxacilina. No estudo de Santos et al.¹⁸, em seis Estados brasileiros, 100% dos isolados de *S. aureus* foram suscetíveis à oxacilina, enquanto (47%) dos isolados de estafilococos não-*aureus* foram resistentes à oxacilina. No estudo de Dorneles et al.⁽⁷⁾, em Minas Gerais, a porcentagem de resistência à oxacilina foi maior entre as cepas de SCN (75%), em comparação com isolados de *S. aureus* (2,81%).

No presente estudo não foram observados isolados de *S. aureus* multirresistentes e apenas 3,51% de *Staphylococcus* spp. (não *aureus*) apresentaram multirresistência. Diferentemente do estudo de Dorneles et al.⁽⁷⁾, em que 16,9% das cepas de *S. aureus* e 50% dos isolados de SCN foram classificadas como multirresistentes.

***Streptococcus* spp.**

No presente estudo observou-se que a resistência dos *Streptococcus* spp. à eritromicina foi de 23,19%. A resistência à eritromicina em isolados de *Streptococcus* spp.

também foi relatada em outros estudos. Duarte et al.²⁰ relataram 10,5% de resistência à eritromicina em isolados de *Streptococcus agalactiae* do leite de vacas com mastite clínica ou subclínica na região Sudeste do Brasil. Tomazi et al.²¹, utilizando o método de microdiluição em caldo, encontraram frequências de resistência para eritromicina de 29,1% em isolados de *S. agalactiae* de mastite clínica na região Sudeste do Brasil. No estudo de Thomas et al.¹¹, em oito países europeus, a taxa de resistência de *S. uberis* a eritromicina foi de 18,8%.

Em relação à tetraciclina, 43,66% dos isolados de *Streptococcus* spp. do presente estudo apresentaram resistência. A baixa eficácia da tetraciclina tem sido relatada em todo o mundo e pode ser atribuída ao uso excessivo desse antimicrobiano no passado^{22, 23}.

A alta prevalência de *Streptococcus* spp. resistentes à tetraciclina também foi relatada em outros estudos. A resistência à tetraciclina foi descrita para 44,7% dos isolados de *S. agalactiae* no estudo de Duarte et al.²⁰, no Brasil, e 44% em estudo realizado na Polônia²². Além disso, um estudo realizado em Portugal relatou uma porcentagem de 64,8% de resistência à tetraciclina em *Streptococcus* spp. isolados de mastite subclínica em vacas leiteiras²³. No estudo de deJong et al.¹², em nove países europeus, a taxa de resistência de *S. uberis* à tetraciclina foi de 36,7%.

As bactérias do gênero *Streptococcus* spp. mostraram a maior resistência à neomicina (65,08%) e gentamicina (46,03%), ambos aminoglicosídeos. As bactérias do gênero *Streptococcus* spp. mostram suscetibilidade naturalmente menor aos aminoglicosídeos, o que é uma consequência da permeação limitada desses antimicrobianos através da parede celular. Porém, o aumento da resistência de *Streptococcus* spp. à gentamicina, como no caso da tetraciclina, provavelmente foi estimulado pelo uso excessivo deste antimicrobiano^{22, 23}.

Semelhantemente, Rato et al.²³ relataram 80,6% de resistência à gentamicina em isolados de *Streptococcus* spp. No estudo de Kaczorek et al.²², 100% dos *S. agalactiae* provenientes de amostras de leite bovinos leiteiros com mastite clínica foram resistentes à gentamicina.

Em relação à enrofloxacin, 36,62% dos isolados de *Streptococcus* spp. apresentaram resistência intermediária. Devido à sua resistência intrínseca às quinolonas, os isolados de estreptococos podem parecer fenotipicamente intermediários usando o método de difusão em disco, apesar da falta de resistência adquirida²⁴.

A alta suscetibilidade dos isolados de *Streptococcus* spp. aos antimicrobianos beta-lactâmicos (ceftiofur (98,59%), ampicilina (98,53%) e penicilina (95,71%)) está de acordo com os resultados relatados em outros estudos^{11, 12}. Os antimicrobianos beta-lactâmicos ainda são a primeira escolha para o tratamento de infecções causadas por *Streptococcus* spp.^{21, 22}.

No presente estudo, 18,06% das cepas de *Streptococcus* spp. foram classificadas como multirresistentes. Resultado semelhante ao encontrado por Boireau et al.²⁴, na França, que observaram 14,5% de multirresistência para *Streptococcus uberis* (n=5.867).

***Enterococcus* spp.**

As bactérias do gênero *Enterococcus* spp. tiveram maior resistência à tetraciclina (52,38%) e eritromicina (19,05%), seguido por ciprofloxacina (9,52%) e penicilina (9,52%). A alta resistência à tetraciclina e à eritromicina pode ser devida ao uso prolongado e generalizado desses antimicrobianos em fazendas leiteiras²⁵.

No estudo de Yang et al.²⁵, na China, isolados de *Enterococcus faecalis* também apresentaram maior resistência contra tetraciclina e eritromicina, porém com taxas maiores de resistência, 87,7% e 79,0%, respectivamente, e resistência semelhante à ciprofloxacina (11,1%). Estudos anteriores também relataram alta resistência à tetraciclina e à eritromicina em *Enterococcus* spp. isolados de animais produtores de alimentos²⁶.

Não foi observado *Enterococcus* spp. multirresistente, diferentemente do estudo de Yang et al.²⁵, na China, que encontraram 18,5% de isolados de *Enterococcus faecalis* multirresistentes.

A comparação de resultados de diferentes estudos que avaliam a suscetibilidade antimicrobiana deve ser feita com cautela, devido às diferenças nas técnicas utilizadas (teste de difusão em disco ou diluição em caldo), bem como às diferenças nos critérios interpretativos utilizados para a categorização dos isolados como resistentes ou suscetíveis. Além disso, variação da suscetibilidade antimicrobiana entre estudos pode ser por mecanismos genéticos de resistência, como diferentes frequências de genes de resistência antimicrobiana²¹.

5. CONCLUSÕES

O patógeno mais frequentemente envolvido na etiologia da mastite subclínica foi *Staphylococcus* spp. (53,10%), particularmente *S. aureus* (30,09%). Na mastite clínica, *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. apresentaram a mesma frequência (45,63%), sendo o *S. aureus* (15,53%) e o *S. uberis* (15,53%) as principais espécies. De forma geral, os patógenos gram-positivos causadores de mastite bovina foram suscetíveis à maioria dos antimicrobianos testados. As maiores taxas de resistência antimicrobiana foram de *Staphylococcus aureus* à penicilina (76%) e ampicilina (74%), *Streptococcus* spp. à neomicina (65,08%), gentamicina (46,03) e tetraciclina (43,66%) e *Enterococcus* spp. à tetraciclina (52,38%).

Tais resultados demonstram que o problema da resistência bacteriana é uma realidade, reforçando a necessidade do uso racional de antimicrobianos e do monitoramento da resistência antimicrobiana. Mais estudos avaliando as características genômicas dos microrganismos devem ser conduzidos para determinar a distribuição dos genes de resistência antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

1. Rocha LS, Silva DM, Silva MP, Vidigal PMP, Silva JCF, Guerra ST, et al. Comparative genomics of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical and clinical bovine mastitis. PLOS ONE. 2019;14(8):1-19.
2. Cote-Gravel J, Malouin F. Symposium review: Features of *Staphylococcus aureus* mastitis pathogenesis that guide vaccine development strategies. J. Dairy Sci. 2019;102(5):4727-40.
3. Grunert T, Stessl B, Wolf F, Sordelli DO, Buzzola FR, Ehling-Schulz M. Distinct phenotypic traits of *Staphylococcus aureus* are associated with persistent, contagious bovine intramammary infections. Scie Rep. 2018;8(1):1-10.
4. Santos MV, Fonseca LFL. Controle da Mastite e Qualidade do Leite: Desafios e Soluções. Pirassununga(SP);2019. 301p.
5. Tomazi T, Ferreira GC, Orsi AM, Gonçalves JL, Ospina PA, Nydam DV, et al. Association of herd-level risk factors and incidence rate of clinical mastitis in 20 Brazilian dairy herds. Prev Vet Med. 2018;161:9-18.
6. WHO guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals. 2017. https://www.who.int/foodsafety/publications/cia_guidelines/en/.
7. Dorneles EMS, Fonseca M, Abreu JAP, Lage AP, Brito M, Pereira CR, et al. Genetic diversity and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* isolates from bovine mastitis in Minas Gerais, Brazil. Microbiologyopen. 2019;8(5):1-7.
8. Ruegg PL. Making Antibiotic Treatment Decisions for Clinical Mastitis. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2018;34(3):413-25.
9. European Medicines Agency (EMA). [acesso 10 set 2019]. Disponível em: https://europa.eu/european-union/about-eu/agencies/ema_pt
10. USA. Food and Drug Administration (FDA). [acesso 10 set 2019]. Disponível em: <https://www.fda.gov/>
11. Thomas V, de Jong A, Moyaert H, Simjee S, El Garch F, Morrissey I, et al. Antimicrobial susceptibility monitoring of mastitis pathogens isolated from acute cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. Int J Antimicrob Agents. 2015;46(1):13-20.

12. de Jong A, Garch FE, Simjee S, Moyaert H, Rose M, Youala M, et al. Monitoring of antimicrobial susceptibility of udder pathogens recovered from cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. *Vet Microbiol.* 2018;213:73-81.
13. BioMerieux Vitek 2 Compact. Manual – Ref – 414532.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Twelfth Edition. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: CLSI; 2018.
15. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268-81.
16. BRCAST. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – BrCAST. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. 2019. Disponível em: <http://brcast.org.br/documentos/>.
17. Marques VF, Motta CCd, Soares BdS, Melo DAd, Coelho SdMdO, Coelho IdS, et al. Biofilm production and beta-lactamic resistance in Brazilian *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. *Braz J Microbiol.* 2017;48:118-24.
18. Fernandes dos Santos F, Mendonça LC, Reis DRdL, Guimarães AdS, Lange CC, Ribeiro JB, et al. Presence of *mecA*-positive multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis* in bovine milk samples in Brazil. *J. Dairy Sci.* 2016;99(2):1374-82.
19. Nobrega DB, De Buck J, Barkema HW. Antimicrobial resistance in *non aureus* staphylococci isolated from milk is associated with systemic but not intramammary administration of antimicrobials in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 2018;101(8):7425-36.
20. Duarte RS, Miranda OP, Bellei BC, Brito MA, Teixeira LM. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2004;42(9):4214-22.
21. Tomazi T, de Souza Filho AF, Heinemann MB, Santos MVd. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus agalactiae* isolated from clinical mastitis in dairy cattle. *PLOS ONE.* 2018;13(6):1-18.
22. Kaczorek E, Malaczewska J, Wojcik R, Rekawek W, Siwicki AK. Phenotypic and genotypic antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus* spp. isolated from cases of clinical mastitis in dairy cattle in Poland. *J. Dairy Sci.* 2017;100(8):6442-53.

23. Rato MG, Bexiga R, Florindo C, Cavaco LM, Vilela CL, Santos-Sanches I. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of streptococci from bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 2013;161(3-4):286-94.
24. Boireau C, Cazeau G, Jarrige N, Calavas D, Madec JY, Leblond A, et al. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from mastitis in dairy cattle in France, 2006-2016. *J. Dairy Sci.* 2018;101(10):9451-62.
25. Yang F, Zhang S, Shang X, Wang X, Yan Z, Li H, et al. Short communication: Antimicrobial resistance and virulence genes of *Enterococcus faecalis* isolated from subclinical bovine mastitis cases in China. *J. Dairy Sci.* 2019;102(1):140-4.
26. Seputiene V, Bogdaite A, Ruzauskas M, Suziedeliene E. Antibiotic resistance genes and virulence factors in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from diseased farm animals: pigs, cattle and poultry. *Pol J Vet Sci.* 2012;15(3):431-8.
27. Canadian Bovine Mastitis and Milk Quality Research Network. [acesso 10 oct 2019]. Disponível em: https://www.medvet.umontreal.ca/rcrmb/en/page.php?p=12&tm=s#Practical_Illustrated_Sheets.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A mastite bovina é uma doença muito importante em rebanhos leiteiros, do ponto de vista econômico, de saúde pública e bem-estar animal. O gerenciamento eficaz do rebanho, a higiene e a biossegurança são essenciais para garantir a saúde do úbere. Para controle e tratamento eficientes da mastite, é necessário conhecer os agentes causadores da infecção intramamária e os fatores de risco associados.

No presente estudo, os principais fatores de risco associados com a ocorrência de mastite subclínica em vacas leiteiras foram idade avançada, úbere penduloso e estágio de lactação avançado. A identificação desses fatores de risco sugere que medidas como substituir vacas velhas e fazer seleção genética para a conformação de úbere diminuem as chances de ocorrência de mastite subclínica. Como a mastite é uma doença multifatorial, essas medidas devem ser implementadas como parte de um programa integrado de saúde do úbere e levar em consideração todos os aspectos do manejo do rebanho.

Staphylococcus aureus foi o patógeno gram-positivo causador de mastite bovina mais frequente. As infecções causadas por *S. aureus* apresentam baixa taxa de cura com tratamento com antimicrobianos, portanto, segregar ou descartar as vacas com mastite crônica é uma medida de controle importante nestes casos.

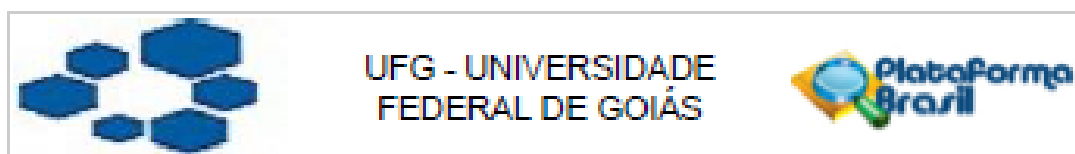
A alta frequência de *Streptococcus agalactiae* revela uma deficiência nas medidas de controle de mastite contagiosa, o que é comum no Brasil. Diferentemente da infecção por *S. aureus*, a taxa de cura do tratamento com antimicrobianos a base de beta-lactâmicos é elevada para *S. agalactiae*, o que foi confirmado pelos resultados do teste de sensibilidade antimicrobiana do presente estudo.

As maiores taxas de resistência observadas foram de *Staphylococcus* spp. contra penicilina e ampicilina, *Streptococcus* spp. contra neomicina, gentamicina e tetraciclina e *Enterococcus* spp. contra tetraciclina. Os dados de monitoramento da resistência antimicrobiana podem ajudar a tratar os animais doentes e garantir seu bem-estar com escolhas antimicrobianas mais apropriadas.

Os resultados obtidos no presente estudo contribuem para fornecer uma linha de base para testar a eficácia de medidas de controle da resistência antimicrobiana. Além disso, podem ajudar os veterinários na seleção do agente antimicrobiano mais apropriado para a terapia inicial e, portanto, fazem parte de uma estratégia abrangente de combate à resistência antimicrobiana. Porém, outros fatores também são importantes para reduzir a carga de bactérias resistentes nas fazendas leiteiras, como biossegurança adequada, melhor higiene e

minimização da exposição a antimicrobianos. Além disso, é necessário estabelecer redes nacionais de vigilância que possam monitorar a resistência antimicrobiana de patógenos isolados em bovinos leiteiros e, de forma mais ampla, em animais de produção de alimentos.

ANEXO I



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA MASTITE BOVINA E PESQUISA DE GENES DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Pesquisador: THAMARA VENANCIO DE ALMEIDA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 67994717.2.0000.5083

Instituição Proponente: Escola de Veterinária e Zootecnia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.306/634

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma tese de doutorado da Escola de veterinária e Zootecnia da UFG, que visa estudar os diversos fatores que podem estar associados à ocorrência de mastite, e conhecer estes fatores é importante para a elaboração e implementação de programas de controle e prevenção desta doença. A mastite é uma das doenças mais prevalentes em rebanhos leiteiros, gerando muitos prejuízos econômicos.

O presente protocolo refere-se a uma emenda que solicita prorrogação de prazo até dezembro de 2019 para a conclusão dos resultados.

Objetivo da Pesquisa:

Realizar um estudo sobre os aspectos epidemiológicos da mastite bovina nos municípios Bela Vista de Goiás, Hidrolândia (mesorregião Centro Goiano), Piracanjuba e Orizona (mesorregião Sul Goiano), no Estado de Goiás.

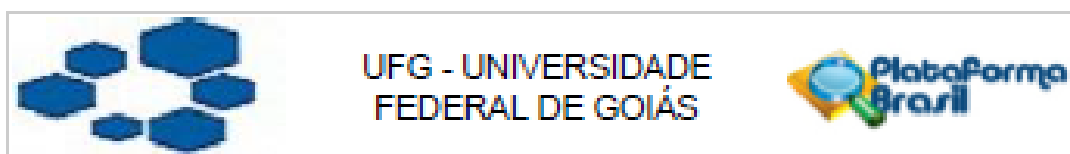
Objetivos específicos

Determinar a prevalência de mastite subclínica nos municípios Bela Vista de Goiás, Hidrolândia, Piracanjuba e Orizona.

Identificar os microrganismos causadores de mastite subclínica e determinar a sensibilidade destes microrganismos frente a antimicrobianos.

Identificar os fatores associados à mastite subclínica.

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação - Agência UFG de Inovação, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2
 Bairro: Campus Samambaia, UFG CEP: 74.690-970
 UF: GO Município: GOIÂNIA
 Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep-prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.306.834

Identificar os microrganismos causadores de mastite clínica e determinar a sensibilidade destes microrganismos frente a antimicrobianos.

Identificar a presença de genes de resistência à antimicrobianos nos isolados de *Staphylococcus aureus*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com a pesquisadora "Um risco para a execução deste projeto seria a aceitação dos produtores em participar da pesquisa, bem como a disposição dos mesmos em colaborar com a coleta de amostras de leite e informações. Para superar esta dificuldade explicaremos a importância da realização da pesquisa e os benefícios que os próprios produtores terão com os resultados e também buscaremos apoio dos laticínios para aumentar a credibilidade com os produtores". No entanto, isso não se traduz em um risco para o participante. O questionário a ser aplicado não apresenta nenhuma questão que cause desconforto ou constrangimento ao participante, portanto, o risco é mínimo ou quase inexistente para esta pesquisa. Benefícios: A pesquisadora espera com os resultados desta pesquisa aprimorar os programas de controle e prevenção de mastite, contribuindo para a melhoria da qualidade do leite produzido, maior produtividade dos animais e, consequentemente, maior lucratividade da atividade leiteira.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo que visa investigar os fatores causadores da mastite bovina nos municípios Bela Vista de Goiás, Hidrolândia, Piracanjuba e Orizona, no Estado de Goiás. Mil amostras serão destinadas à análise de contagem de células somáticas e 200 amostras serão destinadas às análises de identificação bacteriana e teste de sensibilidade a antimicrobianos. Destas 200 amostras, 100 serão provenientes de quartos mamários com mastite clínica e 100 provenientes de quartos mamários com mastite subclínica. Será aplicado um questionário ao produtor para obtenção de dados sobre os animais, a propriedade e o manejo higiênico e sanitário do rebanho. Estes dados serão obtidos por meio de observação e entrevista ao proprietário e/ou ordenhador. Serão colhidas informações relacionadas às características individuais das vacas, como raça, hiperqueratose nas extremidades dos tetos, limpeza do úbere, profundidade do úbere, paridade, dias em lactação e produção de leite por dia; informações relacionadas ao manejo de ordenha e controle de mastite, como tipo de ordenha, ordenha de vacas com mastite por último, utilização de luvas descartáveis, lavagem dos tetos antes da ordenha, eliminação dos três primeiros jatos de leite (teste da caneca), realização do pré-dipping, secagem dos tetos, realização do pós-dipping, realização do CMT, tratamento imediato da mastite clínica, escolha do antibiótico, realização de

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação - Agência UFG de Inovação, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício IQ2
Bairro: Campus Samambaia, UFG CEP: 74.690-970
UF: GO Município: GOIÂNIA
Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



UFG - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE GOIÁS



Continuação do Parecer: 3.300.604

cultura e antibiograma, alimentação durante a ordenha, fornecimento de alimento após a ordenha, tratamento com antibiótico na secagem, uso de selante no teto, utilização de vacinas para mastite, descarte de animais com mastite, utilização de água quente para limpeza, utilização de detergente alcalino, utilização de detergente ácido e utilização de sanitizante; e informações relacionadas à estrutura da fazenda, como volume de produção de leite por dia, número de vacas em lactação, sistema de criação, assistência técnica e manutenção dos equipamentos de ordenha. O presente protocolo solicita a prorrogação de prazo para coleta de amostras e aplicação do questionário aos produtores rurais, classificada como segunda etapa do projeto e prevista para início em julho de 2019. Nenhuma outra alteração foi feita no projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados, conforme consta em anexo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Parecer aprovado, s.m.j. deste Comitê.

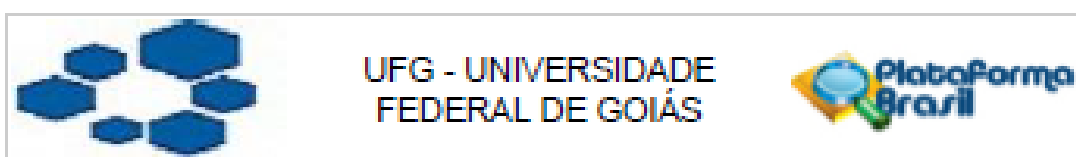
Considerações Finais a critério do CEP:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa/CEP-UFG considera o presente protocolo APROVADO, o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar ao CEP-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Resolução CNS n. 466/12 e Resolução CNS n. 510/16. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para março de 2020.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PE_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1333067_E1.pdf	09/04/2019 18:09:57		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa_Thamara_2019.pdf	09/04/2019 18:00:55	THAMARA VENANCIO DE ALMEIDA	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso.pdf	06/05/2017 09:29:47	THAMARA VENANCIO DE ALMEIDA	Aceito
Outros	Termo_de_anuência.pdf	06/05/2017	THAMARA	Aceito

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação - Agência UFG de Inovação, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2
Bairro: Campus Samambaia, UFG CEP: 74.690-970
UF: GO Município: GOIÂNIA
Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 3.308.604

Outros	Termo_de_anuencia.pdf	09:29:19	VENANCIO DE ALMEIDA	Aceito
Outros	Questionario_de_Pesquisa.pdf	06/05/2017 09:28:49	THAMARA VENANCIO DE ALMEIDA	Aceito
Outros	Carta_CEP.pdf	06/05/2017 09:26:44	THAMARA VENANCIO DE ALMEIDA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	06/05/2017 09:25:39	THAMARA VENANCIO DE ALMEIDA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	06/05/2017 09:23:32	THAMARA VENANCIO DE ALMEIDA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

GOIANIA, 07 de Maio de 2019

Assinado por:
Gelsa Mozzer
(Coordenador(a))

ANEXO II



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 08 de julho de 2019.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ATENDIMENTO DE PENDÊNCIA DO PROTOCOLO Nº. 027/19

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Pesquisa

II - Identificação:

- Data de apresentação a CEUA: 12/04/2019
- Data do atendimento da pendência: 24/06/2019
- Título do projeto: Aspectos epidemiológicos da mastite bovina e pesquisa de genes de resistência microbiana
- Pesquisador Responsável/ Unidade: Thamara Venâncio de Almeida / EVZ.
- Pesquisadores Participantes: Clarice Gebara Murano Serrate Cordeiro Tenório.
- Médico Veterinário/CRMV: Thamara Venâncio de Almeida CRMV 6157 - GO
- Unidade onde será realizado: Laboratório de Especialidades Biológicas (LEB) do Centro de Pesquisa em Alimentos (CPA), Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

III – Respostas as pendências:

- ✓ Não ficou claro quem fará a coleta de amostra. Esclarecer quem fará a coleta no momento da ordenha ou se as amostras serão recebidas no laboratório.
Resposta do pesquisador: A coleta de amostras de leite no momento da ordenha será realizada pelos pesquisadores responsáveis;
- ✓ Caso a obtenção do material seja por coleta diretamente no animal pelos pesquisadores, descrever os cuidados para minimizar e/ou evitar a dor e sofrimento dos animais, haja vista que os animais podem apresentar este quadro em razão da mastite; desconsidera esta pendência, caso as amostras sejam recebidas diretamente no laboratório.
Resposta do pesquisador: Uma vez detectados sinais inflamatórios no úbere do animal (edema, rubor, calor, dor ao toque), febre e apatia, o animal receberá o tratamento apropriado com antibióticos e anti-inflamatórios (intramamários e/ou sistêmicos) para aliviar a dor e o desconforto e promover a cura do animal;
- ✓ O planejamento estatístico descrito refere-se aos resultados do experimento e não ao delineamento experimental. Justificar o número de animais utilizados na pesquisa. Justificar o N da amostra com artigos específicos ou testes estatísticos.
Resposta do pesquisador: O N da amostra foi calculado com base na fórmula para o cálculo do tamanho da amostra para uma proporção: $n = (z^2 \times p \times q) / e^2$, onde z é a estatística que, na tabela da curva normal, abrange proporção da área sob a curva correspondente ao percentual indicado pela margem de confiança (no caso 95%, portanto $z=1,96$); e é o erro amostral (± 3 pontos percentuais); p é a porcentagem com que se verifica o fenômeno (50%); q é a porcentagem complementar de p. Com

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



isso, $n = (1,96^2 \times 0,5 \times 0,5) / 0,03^2$, resultando em $n=1.067$, somando 15% a este valor (considerando perda de amostras) temos $n=1.227,05$, arredondando para 1.200 amostras coletadas;

✓ **Adequação do cronograma:**

A coleta e análise das amostras de leite terá início em setembro de 2019, e o final do projeto está previsto para agosto de 2020.

VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, o projeto foi considerado **APROVADO** pela *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás.

Informação aos pesquisadores:

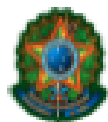
Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(s) pesquisador(es) responsável(is) deverá(ão) encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações até 31 de agosto de 2020.

VII - Data da reunião: 08/07/2019.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada “Aspectos epidemiológicos da mastite bovina e pesquisa de genes de resistência microbiana”, registrada com o protocolo nº 027/19, sob a responsabilidade de **Thamara Venâncio de Almeida e Edmar Soares Nicolau**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG), em reunião de 08/07/2019.

- ☐ Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa Científica
- ☐ Vigência da autorização (início e fim): 08/07/2019 a 31/08/2020
- ☐ Espécie/linhagem/raça: bovino
- ☐ Nº de animais autorizados: 1200 animais no total
- ☐ Peso/Idade: 600 kg, > 2 anos
- ☐ Sexo: fêmeas
- ☐ Origem (fornecedor): propriedades leiteiras do estado de Goiás

Dra. Marina Pacheco Miguel
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Alameda Flamboyant, QM. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com

ANEXO III



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



CHECKLIST DE PESQUISA PARA PRODUTOR

Nome do(a) Produtor(a): _____
Nome da Propriedade: _____
Município: _____
Telefone para contato: _____
E-mail para contato: _____
Data: ____/____/____

1 ORDENHA E CONTROLE DE MASTITE**1.1 Quantas vezes ao dia os animais são ordenhados?**

- ☐ 1
☐ 2
☐ 3

1.2 Qual o número de ordenhadores?

- ☐ 1
☐ 2
☐ 3
☐ Outro: _____

1.3 Qual é o tipo de ordenha?

- ☐ Manual
☐ Mecânica (balde ao pé)
☐ Mecânica (canalizada)

1.4 Possui quantos conjuntos de ordenha? _____**1.5 Qual o material das teteiras?**

- ☐ Borracha
☐ Silicone

1.6 Possui extração automática das teteiras?

- ☐ Sim
☐ Não

1.7 Faz manutenção do equipamento de ordenha?

- ☐ Periódica
☐ Eventual (quando tem algum problema)
☐ Nunca

1.8 Faz linha de ordenha, isto é, ordenha as vacas com mastite por último ou separadamente?

- ☐ Sempre
☐ Às vezes
☐ Nunca

1.9 O(s) ordenhador(es) utiliza(m) luvas descartáveis para realizar a ordenha?

- ☐ Sim
☐ Não

1.10 Faz a lavagem dos tetos com água?

- ☐ Sempre
☐ Quando muito sujo
☐ Nunca

1.11 Faz o teste da caneca (eliminação dos três primeiros jatos de leite)?

- ☐ Sim
☐ Não

1.12 Faz pré-dipping?

- ☐ Sim
☐ Não

1.13 Faz secagem dos tetos?

- ☐ Sim. ☐ Papel toalha ☐ Pano
☐ Não

1.14 Faz pós-dipping?

- ☐ Sim
☐ Não

1.15 Fornece alimento para as vacas durante a ordenha?

- ☐ Sim
☐ Não

1.16 Fornece alimento para as vacas imediatamente após a ordenha?

- ☐ Sim
☐ Não

1.17 Faz o teste CMT (Califórnia Mastite Teste)?

- ☐ Sim, regularmente
- ☐ Sim, ocasionalmente
- ☐ Não

1.18 Faz contagem de células somáticas (CCS) individual das vacas em lactação?

- ☐ Sim, regularmente
- ☐ Sim, ocasionalmente
- ☐ Não

1.19 Faz o tratamento imediato da mastite clínica?

- ☐ Sim.
Qual(ais) critério(s) para tratar? _____
Qual(ais) produto(s)? _____
- ☐ Não

1.20 Faz tratamento de mastite subclínica durante a lactação?

- ☐ Sim.
Qual(ais) critério(s) para tratar? _____
Qual(ais) produto(s)? _____
- ☐ Não

1.21 Como escolhe o antibiótico para tratamento da mastite?

- ☐ Indicação do vendedor
- ☐ Indicação do médico veterinário
- ☐ Rodízio
- ☐ Resultado da cultura e antibiograma
- ☐ Outro: _____

1.22 Faz cultura bacteriológica e antibiograma do leite?

- ☐ Sim, regularmente.
- ☐ Sim, ocasionalmente
- ☐ Não

1.23 Faz tratamento com antibiótico na secagem das vacas (antibiótico vaca seca)?

- ☐ Sim, de todas as vacas secas. Qual(ais) produto(s)? _____
- ☐ Sim, de algumas vacas secas. Qual(ais) critério(s)? _____
- ☐ Não

1.24 Utiliza selante interno de teto nas vacas secas?

- ☐ Sim, em todas as vacas secas. Qual(ais) produto(s)? _____
- ☐ Sim, em algumas vacas secas. Qual(ais) critério(s)? _____
- ☐ Não

1.25 Utiliza vacina para mastite?

- ☐ Sim. Qual? _____
- ☐ Não

1.26 Faz descarte de animais por mastite?

- ☐ Sim. Qual(ais) critério(s)? _____

() Não

1.27 Utiliza água morna para enxágue da ordenhadeira após ordenha?

() Sim

() Não

1.28 Utiliza detergente alcalino para limpeza da ordenhadeira?

() Sim, com água quente

() Sim, com água à temperatura ambiente

() Não

1.29 Utiliza detergente ácido para limpeza da ordenhadeira?

() Sim

() Não

1.30 Faz sanitização da ordenhadeira com solução de cloro antes da ordenha?

() Sim

() Não

2 DADOS DA FAZENDA

2.1 Produção de leite diária (litros/dia): _____

2.2 Número de vacas em lactação no rebanho: _____

2.3 Contagem de células somáticas (CCS) do leite do tanque: _____

2.4 Contagem bacteriana total (CBT) do leite do tanque: _____

2.5 Para quem vende o leite: _____

() Laticínio sob Serviço de Inspeção Federal

() Laticínio sob Serviço de Inspeção Estadual

() Cooperativa

() Queijeiro

2.6 O pagamento do leite é de acordo com a qualidade?

() Sim

() Não

2.7 Sistema de alojamento das vacas em lactação

() Free stall

() Tie stall

() Compost barn

() Piquetes

() Outro: _____

2.8 Assistência técnica

() Sim

() Laticínio

() Particular

() Outra: _____

() Não

ANEXO IV

FIGURAS COMPARATIVAS PARA AVALIAÇÃO VISUAL DOS ANIMAIS



Figura 1 - Escores de hiperqueratose na extremidade dos tetos: (1) sem anel, (2) pequena formação de anel sem rugosidade, (3) formação de anel rugoso e (4) grande formação de anel rugoso.

Fonte: *Canadian Bovine Mastitis Research Network*²⁷



Figura 2 - Escores de limpeza do úbere: (1) totalmente limpo, (2) pouco sujo, (3) sujo e (4) completamente sujo.

Fonte: *Canadian Bovine Mastitis Research Network*²⁷

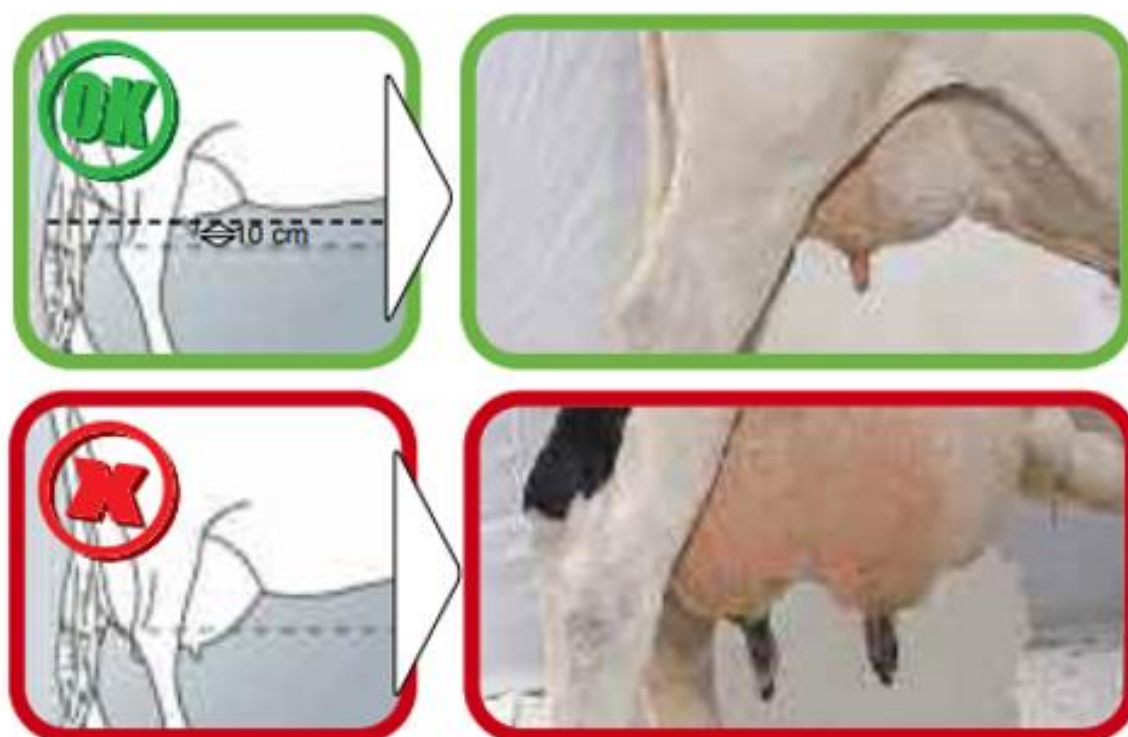


Figura 3 - Profundidade do úbere. Base do úbere acima do jarrete (ideal) e base do úbere abaixo do jarrete.

Fonte: *Canadian Bovine Mastitis Research Network*²⁷