

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

**IMPACTO DA MASTITE SUBCLÍNICA NA CHANCE DE CURA DURANTE O
PERÍODO SECO DE VACAS LEITEIRAS**

William Marota Barbosa

Orientadora: Prof^a Dr^a. Ozana de Fátima Zacaroni

GOIÂNIA

2019

**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.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

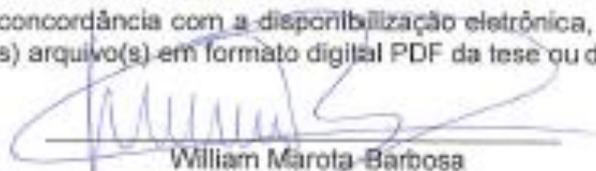
Nome completo do autor: William Marota Barbosa

Título do trabalho: IMPACTO DA MASTITE SUBCLÍNICA NA CHANCE DE CURA DURANTE O PERÍODO SECO DE VACAS LEITEIRAS

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



William Marota Barbosa

Ciente e de acordo:


Ozana de Fátima Zacaroni

Data: 10/10/19

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados 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.

WILLIAM MAROTA BARBOSA

**IMPACTO DA MASTITE SUBCLÍNICA NA CHANCE DE CURA DURANTE O
PERÍODO SECO DE VACAS LEITEIRAS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Zootecnia junto à Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás..

Área de concentração:

Produção animal

Linha de pesquisa:

Nutrição e produção de ruminantes

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Ozana de Fátima Zacaroni-
EVZ/UFG

Comitê de orientação:

Prof^a. Dr^a Cíntia Silva Minafra e Rezende
EVZ- UFG

Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos

FMVZ-USP

GOIÂNIA

2019

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

Barbosa, William Marota

Impacto da mastite subclínica na chance de cura durante o período seco de vacas leiteiras [manuscrito] / William Marota Barbosa. - 2019. xii, 43 f.

Orientador: Profa. Dra. Ozana de Fátima Zacaroni; co-orientadora Dra. Cíntia Silva Minafra e Rezende; co-orientador Dr. Marcos Veiga dos Santos Santos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Goiânia, 2019.

Bibliografia.

Inclui abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de tabelas.

1. Contagem de células somáticas. 2. Dinâmica. 3. Leite. 4. Secagem. I. Zacaroni, Ozana de Fátima, orient. II. Título.

CDU 635

1 ATA NÚMERO 64 DA SESSÃO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
2 MESTRADO DO (A) ALUNO **William Marota Barbosa** do Programa de Pós-Graduação em
3 Zootecnia da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. Aos
4 **09/09/2019**, a partir das **14h00min**, na sala de Reuniões do Departamento de Zootecnia da
5 Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, nesta Capital, realizou-se
6 a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada "**Impacto da cronicidade da mastite
7 subclínica na chance de cura durante o período seco de vacas leiteiras**", apresentado para
8 obtenção do título de **Mestre em Zootecnia**, junto à área de Concentração: Produção Animal.
9 Os trabalhos foram instalados pelo (a) Presidente da Comissão Julgadora, Orientador (a) **Profa.
10 Dra. Ozana de Fátima Zacaroni**, com a participação dos demais membros da Banca
11 Examinadora, **Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade -EVZ/UFV e Prof. Dr. Paulo
12 Henrique Jorge da Cunha -EVZ/UFV**. Iniciando os trabalhos, a Presidente concedeu a
13 palavra ao (a) candidato (a) **William Marota Barbosa**, para exposição em **QUARENTA
14 MINUTOS** do seu trabalho. A seguir, o senhor Presidente concedeu a palavra, pela ordem, aos
15 demais membros da banca, os quais passaram a arguir o (a) candidato (a), durante o prazo
16 máximo de **VINTE MINUTOS**, assegurando-se ao mesmo, igual prazo para responder aos
17 Senhores Membros da Banca Examinadora. Ultimada a arguição, que se desenvolveu nos
18 termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o
19 (a) candidato (a) APROVADO (aprovado/reprovado) pelos seus membros.
20 Proclamados os resultados da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para
21 constar lavrou-se a presente ata que, após lida e achada conforme vai assinada pelos membros
22 da Banca Examinadora.

23 A Banca Examinadora aprovou a seguinte modificação no título da dissertação:

24 IMPACTO DA MASTITE SUBCLÍNICA NA CHANCE DE CURA DURANTE
25 O PERÍODO SECO DE VACAS LEITEIRAS
26 _____
27 _____
28 _____
29 _____
30 _____

Prof. Dra. Ozana de Fátima Zacaroni
(Presidente da Banca)

Prof. Dra. Maria Auxiliadora Andrade -EVZ/UFV

Prof. Dr. Paulo Henrique Jorge da Cunha -EVZ/UFV

Dedico

A minha esposa, Jane e minha filha Luísa,

Aos meus pais, João e Serva (IM),

Aos meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela dom da vida e por me dar forças para superar tamanho desafio.

À minha esposa Jane Alice Maciel Fontes Barbosa e filha Luísa Fontes Barbosa pelo apoio e compreensão pela minha ausência provocada pelo desafio e esforço para cumprir este sonho.

Ao meu pai que mesmo distante sempre apoiou e acreditou. A minha mãe por tudo.

À Morgana, Ana Paula e Camila pelo auxílio nas coletas de campo;

À minha orientadora professora Dr.^a Ozana de Fátima Zacaroni pelo acolhimento da proposta do estudo, pela paciência e pela oportunidade de orientação.

Aos professores do comitê de orientação Dr.^a Cíntia Silva Minafra e Rezende e Dr. Marcos Veiga dos Santos pelo apoio e sugestões.

Aos professores das bancas de qualificação e defesa Dr.^a Clarice Gebara Serrate Muraro Cordeiro Tenório, Dr. Milton Luiz Moreira Lima, Dr.^a Maria Auxiliadora Andrade e Dr. Paulo Henrique Jorge da Cunha pelos importantes ensinamentos e sugestões.

Aos produtores de leite e funcionários das propriedades e todos que contribuíram para realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Goiás, ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela oportunidade e aos colegas de curso, servidores e professores do PPGZ pelo convívio, ensinamentos e colaboração.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 A glândula mamária	3
2.2 Secagem	3
2.3 Mastite e processo inflamatório	4
2.4 Uso da contagem de células somáticas como indicativo de infecções intramamárias	6
2.5 Causas da mastite	7
2.6 Infecções crônicas	9
2.7 Novo caso de mastite subclínica durante o período seco	11
2.8 Cura da mastite subclínica.....	11
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
CAPÍTULO 2 – ARTIGO	20
RESUMO	20
ABSTRACT	21
INTRODUÇÃO	22
MATERIAL E MÉTODOS	23
RESULTADOS	28
<i>Modelo1: Chance de mastite subclínica no primeiro teste pós parto.</i>	28
<i>Modelo2. Chance de novo caso de mastite subclínica através do período seco.</i>	29
<i>Modelo3: Chance de cura da mastite subclínica através do período seco.</i>	30
DISCUSSÃO	30
CONCLUSÕES.....	34
REFERÊNCIAS.....	35
TABELAS.....	38
CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	41

LISTAS DE TABELAS

- TABELA 1** - Informação dos rebanhos avaliados, total de lactações avaliadas, lactações elegíveis para cura e para novas mastites subclínicas através do período seco.....38
- TABELA 2** - Modelo para chance de mastite clínica pós-parto. Frequências observadas, razão de chances (OR) e limites do intervalo de confiança (IC 95%).....39
- TABELA 3** - Chance de novo caso (NC) de mastite subclínica através do período seco. Frequências observadas, razão de chances (OR) e limites do intervalo de confiança (IC 95%).....39
- TABELA 4** - Modelo para chance de cura de mastite subclínica através do período seco. Frequências observadas, razão de chances (OR) e limites do intervalo de confiança (IC 95%).....40

LISTAS DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

CCS	- contagem de células somáticas
CEM	- células epiteliais mamárias
IIM	- infecção intramamária
MALDI-TOF	- espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-voo
mL	- mililitro
PAMP	- Padrões moleculares associados aos patógenos
PRRs	- Receptores de reconhecimento padrão
PMN	- leucócitos polimorfonucleares
SCN	- estafilococos coagulase negativo
TJ	- Tight junctions (junções apertadas)
TLRs	- receptores Toll-like

RESUMO

A mastite é o fator mais importante para o aumento da contagem de células somáticas (CCS) no leite das vacas; este aumento causa inúmeros prejuízos aos produtores e às indústrias de laticínios. Diversos estudos medindo taxas de cura de mastite subclínica durante a secagem vêm sendo realizados há várias décadas com diferentes resultados em função do tipo de patógeno envolvido na infecção, da idade e imunidade da vaca, duração do período seco e dos protocolos de medicamentos utilizados na terapia de vaca seca. Poucos estudos no Brasil consideraram o tempo de infecção e o nível da CCS antes da secagem pela dificuldade em acessar ou controlar esta informação. O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de mastite subclínica em vacas leiteiras antes da secagem, os valores da CCS neste período e as chances de mastite subclínica no primeiro teste da próxima lactação. Foram avaliadas 2.455 lactações de 2.064 vacas em 14 fazendas que incluíram 9.820 exames de CCS de vacas. As lactações foram agrupadas em quatro categorias com base na quantidade de exames de CCS acima de 200.000 células/mL nos três meses que antecederam a secagem. Também foram agrupadas pela média geométrica da CCS dos últimos três meses em cinco categorias. A variável resposta binária, baseada na primeira CCS após o parto, foi “Sadia” ($CCS < 200.000$ células/mL) ou “Subclínica” (≥ 200.000 células/mL). Foram criados três modelos de regressão logística mista: as variáveis ordem de lactação, duração do período seco, estação do ano para o parto e para a secagem também foram incluídas nos modelos. A avaliação do conjunto de dados (Modelo1) mostrou que 850 (34,5%) das lactações iniciaram com mastite subclínica, independentemente de como secaram anteriormente. Houve grande variação entre as propriedades e, com exceção da duração do período seco, todas as demais variáveis avaliadas influenciaram o resultado da CCS no pós-parto. A taxa de novos casos (Modelo2) foi de 20,9% (152/729) e foi mais influenciada pela ordem de lactação, nas quais vacas de quatro ou mais lactação tiveram mais de duas vezes chance de novo caso em relação às vacas de segunda lactação (OR=2,40 IC 95% 1,27~4,46). A estação da secagem não influenciou os novos casos. A taxa de cura (modelo 3) foi de 59,6% (1.028/1.726) e variou de 20,0 a 83,3% entre as propriedades. Vacas que secaram com média geométrica da CCS abaixo de 200.000 células/mL nos últimos três meses de lactação tiveram mais de seis vezes mais chance de cura em relação às vacas que secaram com média geométrica acima de 1,6 milhão de células/mL (OR=6,41 IC95% 3,17~13,15). A avaliação sistemática da CCS ao final da lactação pode ajudar os produtores a tomar decisões para prevenir a mastite crônica e também estabelecer recomendações de manejo para vacas crônicas com alta CCS na secagem, o descarte desses animais deve ser considerado.

Palavras-chave: contagem de células somáticas, dinâmica, leite, secagem.

ABSTRACT

Mastitis is the most important factor to increase somatic cell count (SCC) in cow milk; this increase causes numerous losses to dairy farmers and industries. Several studies measuring cure rates of subclinical mastitis during dry-off have been conducted for several decades with different results depending on the type of pathogen involved in the infection, the age and immunity of the cow, the duration of the dry period, and the protocols used in the dry cow therapy. Few studies in Brazil consider infection time and SCC level before dry-off because of the difficulty in accessing or controlling this information. The aim of this study was to evaluate the occurrence of chronic subclinical mastitis in dairy cows before dry-off, the somatic cell count (SCC) values in this period and the odds of subclinical mastitis in the first test day of a new lactation. 2,455 lactations from 2,064 cows were evaluated in 14 farms that included 9,820 individual tests. Lactations were grouped into four categories based on the number of test days $\geq 200,000$ cells/mL in the three months prior to dry-off, and were also grouped by the geometric mean SCC of the last three months into five categories. The binary response variable was based on the first test day of the next lactation and was grouped as “healthy” ($<200,000$ cells/mL) or “subclinical” ($\geq 200,000$ cells/mL). Three mixed logistic regression models were created, and also included the explanatory variables parity, duration of dry period, season of calving, season of dry-off. Data set evaluation (model1) showed that 850 (34.5%) of lactations returned with subclinical mastitis in the next lactation. There was a wide variation between the herds and, except for duration of dry period, all variables used influenced the postpartum SCC result. The rate of new cases (Model2) was 20.9% (152/729) and was more influenced by parity, where cows of four or more lactation were more than twice as likely to have a new case compared to second lactation cows (OR=2,40 IC 95% 1,27~4,46). The season of dry-off did not influence the new cases. The cure rate during the dry period was 59.6% (1,028 / 1,726) and ranged from 20.0 to 83.3% between herds. Cows that dry-off with geometric mean SCC below 200,000 cells / mL in the last three months of lactation were six times more likely to cure than cows that dry-off with geometric mean above 1,600,000 cells/mL (OR = 6.41-95% CI). 3.17-13,15). Systematic evaluation of the end lactation SCC can help farmers to make decisions to prevent chronic mastitis and also to establish protocols for management for chronic cows at dry-off, culling must be considered. Keywords: dynamics, dry-off, milk, somatic cell count.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

A mastite é uma das doenças de maior importância na indústria leiteira devido à alta prevalência e aos prejuízos financeiros e sanitários provocados¹. Vários fatores de risco estão envolvidos e são relacionados à vaca (raça, idade, dias em lactação, produção, condição imune e conformação de úbere), ao ambiente (instalações e época do ano) e ao manejo (rotinas de ordenha, higiene e manutenção do equipamento de ordenha)¹⁻³.

O controle da mastite traz benefícios para a saúde do úbere, diminui o risco de transmissão de agentes patogênicos aos trabalhadores das fazendas e diminui o risco potencial que os resíduos de antimicrobianos usados no tratamento da doença poderiam trazer aos consumidores de produtos lácteos⁴⁻⁶. Os benefícios para a indústria de laticínios constituem na melhoria do rendimento de produtos derivados de leite, melhoria da estabilidade dos produtos acabados e a diminuição do risco de descarte de leite por contaminação de resíduos de antimicrobianos⁶.

A mastite subclínica é uma condição em que o úbere e o leite estão visualmente normais, embora a glândula mamária esteja inflamada⁷. O aumento da contagem de células somáticas (CCS) no leite é um indicativo de uma resposta inflamatória à uma infecção intramamária (IIM). O limite de 200.000 células/mL é amplamente utilizado para associar a presença ou não de mastite subclínica em vacas⁷⁻¹⁰. A mastite subclínica provocada por patógeno contagioso é uma fonte de transmissão de microrganismos e contribui para a persistência da mastite nos rebanhos leiteiros⁷.

A CCS do conjunto do leite das propriedades é usada pela indústria de laticínios há mais de 50 anos como um indicador de saúde da glândula mamária de vacas e da qualidade de leite das fazendas em todo o mundo⁸⁻¹⁰. A CCS em tanque de leite tem correlação positiva com o percentual de vacas e tetos acometidos com mastite subclínica nas propriedades¹⁰.

Vários países estabeleceram limites legais de CCS para o leite cru. Em abril de 1992, a União Europeia estabeleceu o limite de 400.00 células por mL para o leite fluido e, em 1998, para qualquer derivado utilizado para consumo humano⁸. Nos Estados Unidos, o limite de CCS para tanque foi reduzido de 1 milhão para 750.00 células/mL em julho de 1993¹¹. Apesar deste limite, a média geométrica anual de CCS dos rebanhos norte americanos em 2013 foi de 199.000 células/mL com 11,6 % dos rebanhos acima de 400.000 células / mL¹².

Em um estudo recente realizado na região sudeste do Brasil foram avaliadas entre 12 e 16 mil fazendas durante os anos de 2006 a 2014. Os autores, Rodrigues et al.¹², usaram uma série temporal de dados de CCS de tanque e reportaram média geométrica anual de 518.000 células/mL nas propriedades, com 54,7% delas acima de 400.000 células/mL (limite legal que entraria em vigor no Brasil ano de 2016 para a região estudada¹³). Durante os nove anos avaliados, as propriedades não apresentaram tendência de melhora. Segundo os autores, “se não houver um descarte intenso de vacas crônicas, a média geométrica anual e o percentual de fazendas com CCS acima de 400.000 células/mL não diminuirão de repente”.

O período seco da vaca é o momento no qual a interrupção da produção do leite permite a involução do tecido mamário, a regeneração do tecido secretor, o início da produção de colostro e interfere positivamente na produção do leite na próxima lactação. Além disto, a secagem é uma grande oportunidade para otimizar a saúde da glândula mamária pois permite melhorar as taxas de cura de infecções existentes e de prevenir a ocorrência de novas infecções¹⁴⁻¹⁶.

Diversos estudos medindo taxas de cura de mastite subclínica durante a secagem vêm sendo realizados há várias décadas com diferentes resultados. Isso se dá em função do tipo de patógeno envolvido na infecção já existente, da duração do período seco, do número de lactações, dos protocolos de medicamentos utilizados na terapia de vaca seca e do nível de células somáticas nas vacas antes da secagem. Normalmente esses estudos são complexos e caros, devido à natureza multifatorial da doença¹⁴⁻²².

Existe uma carência de estudos abrangentes que abordem este tema no Brasil, principalmente levando em conta a cronicidade que as vacas apresentam no momento da secagem e os valores de CCS apresentados ao final da lactação, independente do patógeno envolvido e dos protocolos de tratamento utilizados por ocasião da secagem.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A glândula mamária

A principal função da glândula mamária é dar suporte ao recém-nascido pela produção de colostro e leite e, ao mesmo tempo, tem o desafio de equilibrar a homeostase materna enquanto produz quantidades adequadas de leite²³. A glândula mamária é um dos poucos órgãos do corpo que passam por ciclos repetidos de desenvolvimento estrutural, diferenciação funcional, regressão e regeneração: esta capacidade regenerativa é impulsionada pelas alterações hormonais associadas à prenhez e lactação^{24,25}.

As glândulas mamárias de ruminantes são constituídas por um tecido que contém várias populações de células, incluindo fibroblastos, adipócitos, células mioepiteliais e células epiteliais mamárias (CEM). Estas são as principais células presentes na glândula mamária em lactação e o número e a atividade secretora destas células são fatores-chave que regulam a produção de leite²⁶. O número de CEM é regulado pelo balanço entre proliferação celular e apoptose. Além dos mecanismos endócrinos de regulação, o tecido mamário é regulado localmente por vários mecanismos autócrinos e parácrinos afetados por fatores de manejo, stress, nutrição e inflamação²³⁻²⁹.

As junções apertadas (TJ) são estruturas moleculares com duas grandes famílias de proteínas estruturais que são ligadas por meio de proteínas específicas ao citoesqueleto das CEM fazendo a junção entre elas. Elas impedem o transporte paracelular de íons e pequenas moléculas entre os compartimentos de sangue e leite nos alvéolos³⁰. A formação da TJ intacta no início da lactação é importante para o estabelecimento da lactação. Por outro lado, a perda de integridade da TJ foi associada à redução da secreção do leite, secagem e inflamação que são detectados pelo aumento do transporte paracelular de componentes sanguíneos para o leite e vice-versa^{30,31}.

2.2 Secagem

O início do período seco é caracterizado por uma rápida diminuição na expressão de genes envolvidos na síntese do leite pelas CEM e genes de sobrevivência celular. Há também uma regulação positiva da expressão de genes envolvidos na morte celular²⁹. Ocorre uma maior permeabilidade da TJ, indicada pela alteração de Na⁺ e K⁺ no leite alveolar, presença de lactose no plasma e aumento da passagem de leucócitos do sangue para o lúmen alveolar³⁰.

A migração dos leucócitos para os tecidos mamários permite a depuração das células apoptóticas e a remoção dos componentes residuais do leite^{29,30}. A remodelação do tecido

mamário também está ligada à destruição da matriz extracelular. Durante a involução mamária, o sistema metaloproteinase (MMP) é ativado e induz a proteólise dos componentes da matriz extracelular³².

As concentrações de lactoferrina no leite flutuam durante o ciclo de lactação e suas maiores concentrações ocorrem na glândula mamária totalmente involuída.^{23,26,29}. A lactoferrina é a proteína de ligação ao ferro, mais comumente encontrada nas secreções exócrinas dos mamíferos e está entre as proteínas antimicrobianas mais bem caracterizadas³³. Na presença de bicarbonato, a lactoferrina se liga ao ferro solúvel e reduz sua disponibilidade para a multiplicação de bactérias. A lactoferrina também é conhecida por desempenhar um papel nas funções normais de linfócitos e macrófagos³⁴.

O citrato é um tampão natural produzido pelo epitélio mamário; seus níveis no leite tendem a ser muito baixos durante a involução mamária e período seco, mas aumentam substancialmente no parto. Existe uma correlação direta entre o aumento na relação de citrato e lactoferrina nas secreções lácteas e a suscetibilidade a novas IIMs. As propriedades antibacterianas da lactoferrina são deprimidas na presença de citrato que deixa o ferro em uma forma que as bactérias possam utilizar³³.

Todas estas alterações, além de acelerar a involução mamária, contribuem para aumentar as defesas antimicrobianas no úbere em um momento no qual as vacas são especialmente suscetíveis a uma nova IIM uma vez que o tampão de queratina demora em torno de três semanas para ocluir o canal do teto^{29,35}.

Em estudo recente utilizando cabergolina, um potente agonista da dopamina e inibidor da prolactina, relata, pela primeira vez, uma esfoliação maciça das CEM nas secreções mamárias após a secagem com aumento nas atividades de MMP2 e MMP9, sugerindo um maior grau de remodelação do tecido mamário. Os autores ainda confirmaram o aumento do conteúdo de lactoferrina nos tecidos mamários durante o período inicial de secagem. Além disto, a cabergolina acelerou ligeiramente a abertura da TJ e causou modestas modificações na expressão de alguns genes de redução da síntese de leite e de aumento de morte celular²⁹.

2.3 Mastite e processo inflamatório

Independente do agente causador, a mastite é definida como inflamação da glândula mamária, no entanto a maioria dos casos de mastite resulta da penetração microbiana do canal do teto^{34,36}. Na década de 1940 foi estabelecido um processo de três fases para o desenvolvimento de mastite: invasão de um organismo, estabelecimento da bactéria na

glândula mamária e inflamação³⁷. No entanto, desde o fim do século XIX sanitaristas e veterinários associaram a presença de leucócitos com a inflamação da glândula mamária³⁸⁻⁴⁰.

Em sua palestra do Nobel de 1908, o zoólogo russo Elie Metchnikoff⁴⁰ descreveu assim a doença:

“... é uma batalha entre um agente mórbido, o micro-organismo externo e as células móveis do próprio organismo. A cura representaria a vitória das células, e a imunidade seria o sinal de uma atividade suficientemente grande para impedir uma invasão de micro-organismos...”

Na mesma palestra, ele relata que um especialista em veterinária suíço, Zschokke, foi o primeiro a usar estes conceitos quando observou que a fagocitose abundante de estreptococos seria um bom sinal para a evolução da mastite infecciosa em vacas⁴⁰.

Uma vez que um patógeno tenha penetrado na extremidade do teto, uma sequência de eventos é geralmente iniciada, desencadeando o sistema imune inato e adaptativo, em um esforço para impedir a infecção antes que um dano grave seja feito ao tecido mamário³⁶. A função do sistema imune não é apenas prevenir invasão bacteriana mas também eliminar infecções existentes e restaurar a função normal do tecido³³.

A pele do teto, o músculo do esfíncter, o epitélio escamoso estratificado do revestimento do canal do teto e o tampão de queratina derivado das células epiteliais fornecem uma barreira física e um impedimento químico à colonização bacteriana. O processo de ordenha deixa o esfíncter do teto em estado flácido que pode exigir vários minutos para que o tônus do músculo liso retorne a uma condição para fechar a extremidade do teto e permitir um novo acúmulo de queratina³⁴⁻³⁶.

Após a penetração de um patógeno no canal do teto, a capacidade de detectar a presença de bactérias na glândula mamária é essencial para o início da resposta imune inata. Populações localizadas de células mamárias são capazes de facilitar o reconhecimento de patógenos e podem estimular os vários processos imunológicos. Tanto as células imunes e não imunes na glândula mamária possuem receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) que podem interagir com uma matriz diversificada de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs)³⁶.

Os receptores Toll-like (TLRs) são uma família de proteínas transmembrana expressas não apenas em populações de leucócitos, mas também em células endoteliais, células epiteliais e fibroblastos que se distribuem pelos tecidos mamários³³. Tanto o TLR-2 quanto o TLR-4 são de particular importância para a defesa mamária. Os TLR-2 reconhecem os PAMPs associados à parede celular de bactérias gram-positivas (peptidoglicanos e ácido

lipotecóico) e os TLR-4 reconhecem o lipopolissacarídeo (LPS), que é uma conhecida endotoxina e um dos principais constituintes da parede celular das bactérias gram-negativas^{31,33}.

Após o reconhecimento e ligação do patógeno, as vias de sinalização intracelulares são ativadas, incluindo vários mediadores solúveis que desencadeiam o início da cascata inflamatória³⁴. Através de um gradiente quimiotático, os agentes de fase aguda da inflamação têm efeitos sobre as vênulas pós-capilares e induzem uma série de moléculas de adesão e ligantes a serem reguladas ou ativadas, criando uma via de saída dos leucócitos para a glândula mamária infectada³⁶.

Os leucócitos são produzidos na medula óssea e após diferentes etapas de maturação e diferenciação são mobilizados para o sangue periférico. O ciclo de vida dos leucócitos polimorfonucleares (PMN) nos bovinos requer de 10 a 14 dias para maturação na medula óssea, depois entram no seio vascular através dos endotélios e circulam no fluxo sanguíneo com meia vida de oito a nove horas; deixam o fluxo sanguíneo pela diapedese entre as células endoteliais e penetram nos tecidos onde funcionam como fagócitos por 1 a 2 dias⁴¹.

A produção e a destruição dos PMN são rigidamente reguladas para manter seu número no sangue, leite e tecidos. O fluxo de PMN para a glândula mamária ocorre em um nível baixo para a vigilância imunológica, mas aumenta rapidamente em resposta à invasão bacteriana⁴¹. O processo pode exigir apenas 2 horas após a infecção para neutrófilos começarem a deixar vênulas pós-capilares e mais 2 a 4 horas para alcançar os seios do teto³⁶.

2.4 Uso da contagem de células somáticas como indicativo de infecções intramamárias

As principais células presentes no leite são os leucócitos, que incluem macrófagos, linfócitos e leucócitos PMN, principalmente neutrófilos. As células do epitélio mamário também estão presentes no leite, mas correspondem a menos de 7% do total de células⁴³.

Em um estudo recente realizado em vacas holandesas com baixa CCS, média de 36.000 células/mL, Herve et al. acompanharam a CCS e a contagem de células epiteliais do leite em cinco momentos durante a ordenha e reportaram que a concentração de células epiteliais mamárias variou entre 3.300 e 7.500 células/mL durante a ordenha, ainda que aproximadamente a metade destas células eram células viáveis de descamação.

O fator mais importante para o aumento da CCS no leite é a presença de uma IIM^{10,42}. O uso do teste de CCS sozinho, sem a identificação do patógeno, para identificar um quarto mamário ou uma vaca com infecção pode levar a falsos positivos e falsos negativos em função do limite utilizado, dos patógenos envolvidos e de outros fatores como idade e estágio de lactação, fração do leite coletada e variações diárias na CCS^{22,42-44}.

A contagem diferencial das células somáticas presentes no leite vem sendo pesquisada há alguns anos e tem melhorado a sensibilidade do diagnóstico em comparação a CCS total. Alterações relativas entre os leucócitos têm indicado melhor a presença de processo inflamatório⁴⁵⁻⁴⁷. As técnicas iniciais para contagem diferencial exigiam tempo para preparação e análise em laboratório, mas vêm evoluindo e atualmente pode ser feita por equipamento comercial de citometria de fluxo^{7,48}. No entanto, mais pesquisas são necessárias para validar as aplicações práticas sugeridas pelo novo método⁴⁸.

Alguns estudos utilizaram um número muito grande de dados de CCS para acompanhar a dinâmica da mastite subclínica através do período seco^{14,19,22,49}. Todos estes estudos utilizaram amostras do leite, nível vaca, e o limite de CCS de 200.000 células/mL para avaliar as taxas aparentes de cura e novos casos de mastite subclínica entre a secagem e a lactação seguinte.

2.5 Causas da mastite

Embora em torno de 200 espécies microbianas já tenham sido identificadas em casos de mastite, o seu controle é considerado mais efetivo quando os programas são direcionados para o controle dos agentes mais prevalentes⁵⁰. Durante décadas, a atenção para o controle da mastite foi dada a patógenos que eram conhecidos por serem transmitidas entre as vacas de maneira contagiosa, quando os tetos eram expostos a bactérias do leite originado de uma glândula mamária infectada³⁷. *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus* foram considerados os mais importantes patógenos contagiosos até o final da década de 1970; a partir daí maior ênfase foi dada aos microrganismos gram-negativos como causa de mastite³⁷.

Os patógenos de mastite tradicionalmente são classificados como patógenos principais e patógenos secundários⁵¹⁻⁵³. Os patógenos principais como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* e coliformes são geralmente considerados mais virulentos e causam maiores danos ao úbere do que os patógenos menores como *Corinebacterium bovis* e estafilococos coagulase negativo (SCN)^{51,54-56}.

No Brasil, Souza et al.⁵⁷ avaliaram os efeitos dos patógenos de mastite sobre a CCS do leite em vacas. Os autores coletaram 3.749 amostras compostas dos quatro tetos de todas as 2.657 vacas em lactação de 24 fazendas nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. Em 69,7% de todas as amostras foi identificada a presença de pelo menos um patógeno da mastite e 15,5% das amostras apresentaram infecções mistas. Os patógenos secundários representaram 43,3% das amostras com crescimento bacteriano. A média geométrica da CCS foi de 22.000 células/mL para as amostras sem crescimento bacteriano; 94.000 e 125.000 células/mL para *Corynebacterium* spp. e SCN (patógenos secundários) respectivamente, e 482.000 células/mL para os patógenos primários. Os patógenos mais isolados foram *Corynebacterium* spp. (31,6%) e *Staphylococcus aureus* (30,2%).

Ainda no Brasil, Brito et al.⁵² realizaram exames microbiológicos e CMT em 6.315 amostras de leite obtidas de todos os quartos mamários de 1.609 vacas em lactação, originárias de 48 rebanhos localizados no Estado de Minas Gerais. Dos quartos mamários houve crescimento bacteriano em 62% deles; destes, em 7,2% o crescimento foi misto. Os agentes mais isolados também foram *Corynebacterium* sp. (55,2%) e *Staphylococcus aureus* (19,2%) e SCN (12,4%). As porcentagens de tetos com reação positiva no CMT foram de 32% para *Corynebacterium* sp.; 66% para *Staphylococcus aureus* e 48% para SCN. Os autores comentam que a alta prevalência encontrada de *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium* sp. sugere que os rebanhos estudados não estão aplicando corretamente as medidas de controle para as mastites contagiosas.

Os estafilococos coagulase negativos (SCN) têm sido reportados como a classe de bactéria mais frequentemente encontrada em IIMs em vários países^{5,51,54,56}. Tradicionalmente os SNC eram considerados como patógenos menores, oportunistas, que fazem parte da microbiota da pele e que ocasionalmente causam mastite^{51,56}.

Vakkamäki et al.⁵, utilizando um banco de dados do laboratório da maior empresa de leite da Finlândia, avaliaram os resultados de 240.067 amostras de quartos mamários com mastite. As amostras foram analisadas por PCR em tempo real entre os anos de 2010 e 2012. Os autores reportaram que 12,4% das amostras não continham DNA de nenhuma espécie-alvo de mastite e 87,6% das amostras apresentaram algum DNA; destes, 49%, 25,2% e 13,4% apresentaram DNA para uma, duas e três (ou mais) espécies alvos, respectivamente. Uma das amostras de leite continha DNA de 10 espécies ou grupo de espécies.

Neste estudo, os autores reportaram que em 69% do total de amostras houve crescimento bacteriano e as espécies mais encontradas foram os SCN (43%), seguido por *Staphylococcus aureus* (21%), *Streptococcus uberis* (9%), *Streptococcus dysgalactiae* (8%),

Corynebacterium bovis (7%) e *Escherichia coli* (5%). O tamanho do banco de dados avaliado demonstra a importância dos SCN como causa de mastite naquele país.

Os efeitos dos patógenos menores na mastite são objetos de pesquisa no Brasil e no mundo e as conclusões são conflitantes quanto a sua capacidade de causar danos ao tecido mamário, alterar a CCS e qualidade do leite ou exercer um efeito protetor na glândula mamária contra o estabelecimento de patógenos maiores^{51,54,55,58-63}. Este tema é controverso no meio científico⁶¹⁻⁶³.

Os métodos clássicos de microbiologia clínica baseiam-se na importância de uma cultura pura de um microrganismo para provar sua patogenicidade⁶⁴. As técnicas mais comumente utilizadas para identificação microbiológica são realizadas em meios de cultura não seletivos e seletivos, complementadas por testes bioquímicos e morfológicos nas quais são feitas as identificações de gênero, espécies e subespécies microbianas⁶⁵.

Além de demorados, os resultados de testes bioquímicos utilizados para identificação podem apresentar variabilidade pela ação de fatores ambientais sobre a expressão gênica das bactérias. Existem outras desvantagens, como o baixo poder discriminatório em microrganismos com pouca variabilidade genética e o risco de interpretações errôneas, quando se utiliza um número limitado de testes⁶⁵⁻⁶⁶.

Nas últimas duas décadas, uma ampla gama de técnicas de fenotipagem e genotipagem foi desenvolvida⁶⁷. Técnicas como PCR e sequenciamento de genomas, espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-voo (MALDI-TOF), aliadas ao desenvolvimento de métodos moleculares para uso em medicina humana estão em foco e têm facilitado os estudos dos microrganismos no contexto da mastite bovina⁶⁴⁻⁷⁰.

2.6 Infecções crônicas

Bactérias como *Staphylococcus aureus* têm baixa chance de cura relacionada a resistência a antibióticos³⁷; seja por expressão de genes de resistência⁷¹, por invasão intracelular do tecido mamário ou por produção de biofilme^{72,73}.

A formação de biofilme é um componente integrante do ciclo de vida das bactérias; uma comunidade bacteriana se estrutura e cria uma matriz polimérica que se adere a uma superfície inerte ou viva⁷⁴. Avanços recentes mostram que os biofilmes são sistemas dinâmicos, estruturalmente complexos, com atributos tanto de organismos multicelulares

quanto de ecossistemas, com o objetivo de sobreviver em ambientes hostis e se dispersar para colonizar novos nichos⁷⁵.

A maior parte dos estudos acontece na medicina humana, na qual várias doenças crônicas estão relacionadas a formação de biofilme^{74,75}. Vários estudos em bovinos já identificaram *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* e *Prototheca* spp. como produtores de biofilme^{71-73,76-80}. *Streptococcus agalactiae* é capaz de crescer em superfícies bióticas e abióticas formando biofilmes; cepas de origem bovina foram identificadas por pesquisadores de universidades Francesas em conjunto com um investigador do Instituto Pasteur⁸¹.

Em relação à vaca, o risco de infecções se tornarem crônicas aumenta com o aumento do número de lactações, com o avançar dos dias em lactação e com o aumento da profundidade do úbere¹. Estes riscos estão relacionados a exposição da vaca aos patógenos que têm menores chances de cura e a possíveis “traumas” no tecido secretor, provocados por infecções prévias¹⁻³.

Green et al.¹⁵ avaliaram 6.852 lactações no reino unido e reportaram que vacas crônicas, que secaram com mais de 200.000 células/ mL em cada um dos três meses antes da secagem, apresentaram mais chance (OR 1,26 e 1,39) de desenvolverem mastite clínica após o parto em comparação com vacas que secaram sadias para os sistemas de pastagem e confinamento, respectivamente.

Whist e Østera¹⁶ reportaram em um estudo com 15.000 lactações em que vacas que secaram com média geométrica das três últimas CCS entre 400.000 e 800.000 células/mL apresentaram razão de risco (HR) para mastite clínica durante a segunda lactação 2,8 vezes maior em comparação com o grupo de referência onde a média foi de 10.000 a 20.000 células/mL, mas não avaliaram mastite subclínica no pós-parto como resposta.

No mesmo estudo, em um “subset” de dados, os autores usaram a CCS no primeiro e segundo exame pós-parto para prever o risco de uma mastite clínica e reportaram que vacas com CCS acima de 800.000 células/mL na primeira CCS pós-parto tiveram razão de risco para mastite clínica no restante da lactação de 6,9 (4,2) quando comparado a vacas que iniciam lactação com CCS menor que 10.000 células/mL.

Dados de outros estudos ajudam a demonstrar o risco associado à mastite clínica em função das vacas iniciarem uma lactação com mastite subclínica^{2,3,17}.

2.7 Novo caso de mastite subclínica durante o período seco

Estudos realizados com grande amostragem de propriedades mostram grande variação nas taxas de novos casos entre as propriedades^{19,22,49}. As variações estão relacionadas ao peso diferenciado dos diversos fatores genéticos, de composição do rebanho, ambientais e de manejo^{1,2,19}.

Fauteux et al.⁴⁹, em um estudo com mais de 38 mil vacas em 949 rebanhos no Canadá, reportaram que as taxas de novas mastites subclínicas considerando o final do período seco da vaca e o início da lactação seguinte foi de 15% em rebanhos com CCS de tanque menor que 200.000 células/mL e 27% para rebanhos com CCS de tanque > 400.000 células/mL. Madouasse et al.¹⁹ encontraram taxa de 17,0% (variando de 6% a 33% entre as propriedades) e Lipkens et al.²² reportaram taxa de 12,6% de novas infecções.

A estação do ano em que ocorre o parto está associada à taxa de surgimento de novos casos. Vacas que têm parto na estação das chuvas estão sujeitas às condições de umidade e temperatura mais altas que favorecem a multiplicação bacteriana e, na maioria dos rebanhos, piora a condição de alojamento das vacas. O stress térmico também interfere na imunidade da vaca seca e em início de lactação⁸²⁻⁸⁴. Fauteux et al.⁴⁹ encontraram taxas de novos casos de 21% e 17% para o verão e o inverno respectivamente, e relataram que mesmo no Canadá estas condições estão presentes.

Vacas com maior número de lactações têm maior chance de uma nova infecção por terem alguns mecanismos de defesa inata afetados com a idade tais como, conformação de úbere, risco maior de lesões de tetos como hiperqueratose, falha no sistema imune provocada por diversos fatores como, por exemplo, estresse oxidativo^{1,14,15,33}. Maior produção de leite durante a secagem pode levar a vazamento de leite, atraso na formação do tampão de queratina e aumentar o risco de mastite⁸⁵.

Henderson et al.¹⁴ encontraram um risco menor para uma vaca de segunda lactação apresentar um novo caso de mastite subclínica em relação as vacas de quinta lactação OR 0,65 (0,59-0,71).

2.8 Cura da mastite subclínica

Os fatores que interferem nas taxas de cura estão relacionados à capacidade imune das vacas para eliminar infecções, ao patógeno envolvido, ao tempo de infecção às terapias utilizadas e ao número de tetos acometidos⁸⁶.

A terapia de vacas secas é um componente importante dos programas de controle de mastites e tem o objetivo de eliminar IIMs existentes no final da lactação e impedir o

desenvolvimento de novas durante o período seco²⁸. A estratégia de tratamento de todas as vacas em lactação com antimicrobianos durante a secagem foi proposta no final da década de 1960⁸⁷. Entretanto, ela vem sendo discutida em função do uso indiscriminado de antibióticos, particularmente em vacas com baixa expectativa de cura e vacas sadias por ocasião da secagem^{21,28,88}.

Estudos de levantamento das dinâmicas de mastite subclínica avaliadas pela CCS ao nível de vaca em diferentes rebanhos mostram a grande variação nas taxas de cura durante o período seco. Fauteux et al.⁴⁹ reportaram 65% de taxa de cura em 949 rebanhos. As 10% melhores fazendas em taxas de cura apresentaram cura média de 88%; as 10% piores, apresentaram 40% de cura. Madouasse et al.¹⁹ reportaram 74% de cura (variando de 53 a 90%) e Lipkens et al.²² reportaram 66,9%.

Henderson et al.¹⁴ avaliaram mais de 20 mil lactações em 114 rebanhos no Reino Unido e reportaram taxa de cura de 71%. A chance de cura foi maior para uma vaca que entrou na segunda lactação (OR=2,0~1,79-2,25) em relação à vacas que entraram na quinta lactação. Em relação à cronicidade, os mesmos autores reportaram chance de cura duas vezes maior (OR 1,99~1,56-2,53) para vacas que não tiveram CCS acima de 199.000 células/mL na lactação comparadas as vacas que tiveram quatro ou cinco exames acima de 199.000 células/mL na lactação anterior.

Osterås et al.⁸⁸ avaliaram os motivos de falha na cura de patógenos maiores através da secagem de vacas. Vacas que secaram com média geométrica da CCS de 623.000 células/mL tiveram de 2,6 a 5,4 vezes mais chance de não curar do que vacas que secaram com média de 167.000 células/mL. Os autores comentaram que a média geométrica da CCS realizada nos três últimos meses da lactação reflete melhor a condição de cronicidade ao final da lactação do que a média de toda a lactação.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cardozo LL, Thaler Neto A, Souza GN, Picinin LCA, Felipus NC, Reche NLM, Schmidt FA. Risk factors for the occurrence of new and chronic cases of subclinical mastitis in dairy herds in southern Brazil, *J. Dairy Sci.* 2015;98:1-11.
2. Oliveira CSF, Hogeveenc H, Botelhod AM, Maia PV, Coelho SG, Haddad JPA. Cow-specific risk factors for clinical mastitis in Brazilian dairy cattle. *Prev. Vet. Med.* 2015;121(3-4):297-305.
3. Pantoja JCF, Almeida AP, dos Santos B, Rossi RS. An investigation of risk factors for two successive cases of clinical mastitis in the same lactation. *Livest. Sci.* 2016;194:10-16.
4. Dalia AH, Dorgham SM, Arafa A. Coagulase Gene Typing with Emphasis on Methicillin-Resistance Staphylococci: Emergence to Public Health. *Advances in Infectious Diseases.* 2015;5(4):196.
5. Vakkamäki J, Taponen S, Heikkilä AM, Pyörälä S. Bacteriological etiology and treatment of mastitis in Finnish dairy herds. *Acta Vet. Scand.* 2017;59:33. <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0301-4>.
6. Ruegg PL, Tabone TJ. The relationship between antibiotic residues violations and somatic cell counts in Wisconsin dairy herds. *J Dairy Sci.* 2000;83:2805-2809.
7. Damm M, Holm C, Blaabjerg M, Bro MN, Schwarz D. Differential somatic cell count – A novel method for routine mastitis screening in the frame of Dairy Herd Improvement testing programs. *J. Dairy Sci.* 2017;100:1-15.
8. Schukken YH, Wilson DJ, Welcome F, Garrison-Tikofsky L, Gonzalez RN. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet. Res.* 2003;34:579-596.
9. Fauteux V, Bouchard E, Haine D, Scholl D, Roy J. Prediction of bulk tank somatic cell count violations based on monthly individual cow somatic cell count data. *J. Dairy Sci.* 2015;98(4):2312-2321.
10. Eberhart RJ, Hutchinson LJ, Spencer SB. Relationships of Bulk Tank Somatic Cell Counts to Prevalence of Intramammary Infection and to Indices of Herd Production. *J Food Prot.* 1982;45(12):1125-1128.
11. Norman HD, Lombard JE, Wright JR, Koprál CA, Rodriguez JM, Miller RH. Consequence of alternative standards for bulk tank somatic cell count of dairy herds in the United States. *J. Dairy Sci.* 2011;94(12):6243-6256.
12. Rodrigues LG, de Aquino MHC, Silva MR, Mendonça LC, de Mendonça JFM, de Souza GN. A time series analysis of bulk tank somatic cell counts of dairy herds located in Brazil and the United States. *Cienc. Rural* 2017;47(4):1-6.

13. BRASIL. Instrução Normativa n.º 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial da União, Brasília, 30 dez. 2011. Seção 1.
14. Henderson AC, Hudson CD, Bradley AJ, Sherwin VE, Green MJ. Prediction of intramammary infection status across the dry period from lifetime cow records. *J. Dairy Sci.* 2016;99(7):5586-5595.
15. Green MJ, Bradley AJ, Medley GF, Browne WJ. Cow, Farm, and Management Factors During the Dry Period that Determine the Rate of Clinical Mastitis After Calving. *J. Dairy Sci.* 2007;90:3764-3776.
16. Whist AC, Østera O. Associations between somatic cell counts at calving or prior to drying-off and clinical mastitis in the remaining or subsequent lactation. *Journal of Dairy Research.* 2007;74:66-73.
17. Pantoja JCF, Hulland C, Ruegg PL. Somatic cell count status across the dry period as a risk factor for the development of clinical mastitis in the subsequent lactation. *J. Dairy Sci.* 2009;92:139-148.
18. Pantoja JCF, Hulland C, Ruegg PL. Dynamics of somatic cell counts and intramammary infections across the dry period. *Prev. Vet. Med.* 2009;90:43-54.
19. Madouasse A, Browne WJ, Huxley JN, Toni F, Bradley AJ, Green M. Risk factors for a high somatic cell count at the first milk recording in a large sample of UK dairy herds. *J. Dairy Sci.* 2012;95:1873-1884.
20. Dufour S, Dohoo IR. Monitoring dry period intramammary infection incidence and elimination rates using somatic cell count measurements. *J. Dairy Sci.* 2012;95(12):7173-7185.
21. Rabiee AR, Lean IJ. The effect of internal teat sealant products (Teatseal and Orbeseal) on intramammary infection, clinical mastitis, and somatic cell counts in lactating dairy cows: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 2013;96:6915-6931.
22. Lipkens Z, Piepers S, Verbeke J, De Vliegher S. Infection dynamics across the dry period using Dairy Herd Improvement somatic cell count data and its effect on cow performance in the subsequent lactation. *J. Dairy Sci.* 2019;102:640-651.
23. Weaver SR, Hernandez LL. Autocrine-paracrine regulation of the mammary gland. *J. Dairy Sci.* 2016;99(1):842-853.
24. Pai VP, Hernandez LL, Stull MA, Horseman ND. The type 7 serotonin receptor, 5-HT₇, is essential in the mammary gland for regulation of mammary epithelial structure and function. *Biomed. Res. Int.* 2015;(2015):1-8. <https://doi.org/10.1155/2015/364746>.
25. Hurley WL, Loor JJ, Lacasse P. This is an update of Hurley WL, Loor JJ. Mammary Gland: Growth Development and Involution. Reference Module in Food Science Encyclopedia of Dairy Sciences. 2011;2:338-345.

26. Stefanon B, Colitti M, Gabai G, Knight CH, Wilde CJ. Mammary apoptosis and lactation persistency in dairy animals. *J. of Dairy Res.* 2002;69:37-52.
27. Laporta, J, Moore SAE, Weaver SR, Cronick CM, Olsen M, Prichard AP, Schnell BP, Crenshaw TD, Peñagaricano F, Bruckmaier RM, Hernandez LL. Increasing serotonin concentrations alter calcium and energy metabolism in dairy cows. *J. Endocrinol.* 2015;226:43-55.
28. Herve L, Quesnel H, Lollivier V, Boutinaud M. Regulation of cell number in the mammary gland by controlling the exfoliation process in milk in ruminants. *J. Dairy Sci.* 2016;99(1):854-863.
29. Boutinaud M, Isaka N, Gandemer E, Lamberton P, Wiart S, De Prado Taranilla AI, Sordill LM, Lollivier V. Inhibiting prolactin by cabergoline accelerates mammary gland remodeling during the early dry period in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2017;100(12):9787-9798.
30. Stelwagen K, Singh K. The Role of Tight Junctions in Mammary Gland Function. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2014;19(1):131-138.
31. Kobayashi K, Oyama S, Numata A, Rahman MM, Kumura H. Lipopolysaccharide Disrupts the Milk-Blood Barrier by Modulating Claudins in Mammary Alveolar Tight Junctions. 20013;8(4):62187. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062187>.
32. Ryman, V, Packiriswamy N, Sordillo, LM. Role of endothelial cells in bovine mammary gland health and disease. *Animal Health Research Reviews.* 2015;16(2):135-149. <https://doi.org/10.1017/S1466252315000158>.
33. Sordillo LM. Mammary gland Immunobiology and resistance to mastitis. *Vet Clin Food anim.* 2018;34:507-523.
34. Aitken SL, Corl CM, Sordillo LM. Immunopathology of Mastitis: Insights into Disease Recognition and Resolution. *J Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 2011;16:291-304.
35. Nickerson SC. Mammary resistance mechanisms |Anatomical, Editor(s): John W. Fuquay, *Encyclopedia of Dairy Sciences.* 2011; 2: 381-385. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00296-X>.
36. Kehrl Jr M, Harp JA. Immunity in the mammary gland. In *Veterinary clinics of north america: Food animal practice.* 2001;17(3):495-516. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30003-7](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30003-7).
37. Ruegg PL. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *J. Dairy Sci.* 2017;100(12):10381-10397.
38. Delepine S. The examination of cow's milk for the detection of pathogenic properties. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics.* 1897;10(3):150-156.
39. Prescott SC, Breed RS. The Determination of the Number of Body Cells in Milk by a Direct Method. *J. Infectious Diseases.* 1910;7(5):632-640.

40. Mechnikov I. – Nobel Lecture. NobelPrize.org. Nobel Media AB 2019. Thu. 15 Aug 2019. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1908/mechnikov/lecture/>
41. Paape, M, Mehrzad, J, Zhao, X, Dettleux J, Burvenich C. Defense of the Bovine Mammary Gland by Polymorphonuclear Neutrophil Leukocytes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* . 2002;7(2):109-121. <https://doi.org/10.1023/A:1020343717817>.
42. Harmon RJ. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 1994;77:2103-2112.
43. Herve L, Quesnel H, Lollivier V, Portanguen J, Bruckmaier RM, Boutinaud M. Mammary epithelium disruption and mammary epithelial cell exfoliation during milking in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2017;100(2):9824-9834.
44. Bach KD, Sipka A, McArt JAA. Case study: Evaluating quarter and composite milk sampling for detection of subclinical intramammary infections in dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine.* 2019;163:51-57.
45. Pilla R, Schwarz D, König S, Piccinini R. Microscopic differential cell counting to identify inflammatory reactions in dairy cow quarter milk samples. *J. Dairy Sci.* 2012;95(8):4410-4420. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5331>.
46. Pilla R, Malvisi M, Snel GGM, Schwarz D, König S, Czerny CP, Piccinini R. Differential cell count as an alternative method to diagnose dairy cow mastitis. *J. Dairy Sci.* 2013;96(3):1653-1660. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6298>.
47. Gonçalves J, Lyman R, Hockett M, Rodriguez R, dos Santos M, Anderson K. Using milk leukocyte differentials for diagnosis of subclinical bovine mastitis. *Journal of Dairy Research.* 2017 84(3):309-317. <https://doi.org/10.1017/S0022029917000267>.
48. Wall SK, Wellnitz O, Bruckmaier RM, Schwarz D. Differential somatic cell count in milk before, during, and after lipopolysaccharide- and lipoteichoic-acid-induced mastitis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2018;101(6):5362-5373. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14152>.
49. Fauteux V, Roy JP, Scholl DT, Bouchard E. Benchmarks for evaluation and comparison of udder health status using monthly individual somatic cell count. *Can Vet J.* 2014;55:741-748.
50. Angeliki A, Holohan R, Rea MC, Warda AK, Hill C, Ross RP. Bovine mastitis is a polymicrobial disease requiring a polydiagnostic approach. *International Dairy Journal.* 2009. 104539. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.104539>.
51. Pyörälä S, Taponen S. Coagulase-negative staphylococci: Emerging mastitis pathogens. *Vet. Microbiol.* 2009;134:3-8.
52. Brito, MAVP, Brito, JRF, Ribeiro MT, Veiga VMO. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 1999;51(2):129-135. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09351999000200001>.
- 53 Winckler JPP. Prevalência da mastite subclínica em rebanhos brasileiros e o efeito sobre a composição do leite. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2019.

<https://doi.org/10.11606/T.11.2019.tde-01082019-102128>.

54. Tomazi T, Gonçalves JL, Barreiro JR, Braga PAC, Prada e Silva LF, Eberlin MN, dos Santos MV. Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine intramammary infection by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2014;52:1658-1663.
55. Reyher KK, Haine D, Dohoo IR, Revie CW. Examining the effect of intramammary infections with minor mastitis pathogens on the acquisition of new intramammary infections with major mastitis pathogens—A systematic review and meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 2012;95:6483-6502.
56. Goetz C, Tremblay YDN, Lamarche D, Blondeau A, Gaudreau AM, Labrie J, Malouin F, Jacques M. Coagulase-negative staphylococci species affect biofilm formation of other coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci. *J. Dairy Sci.* 2017;100(8):6454-6464.
57. Souza GN, Brito JRF, Moreira EC, Brito MAVP, Silva MVGB. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2009;61(5):1015-1020.
58. Gonçalves JL. Produção e composição do leite de vacas com mastite causada por *Corynebacterium* spp [Dissertação]. Pirassununga: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; 2012. <https://doi.org/10.11606/D.10.2012.tde-07062013-112423>.
59. 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* and *Escherichia coli*. *J Dairy Sci.* 2017;100:493-503.
60. Heikkilä AM, Liski E, Pyörälä S, Taponen S. Pathogen-specific production losses in bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 2018; 101(10):1-12. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14824>.
61. Tomazi, T, Gonçalves JL, Barreiro JR, Arcari MA, dos Santos MV. Bovine subclinical intramammary infection caused by coagulase-negative staphylococci increases somatic cell count but has no effect on milk yield or composition. *J. Dairy Sci.* 2015;98(5):3071-3078.
62. Silanikove N, Merin U, Leitner G. Letter to the editor: Do coagulase-negative staphylococci have no effect on the milk composition of infected mammary gland? A comment on Tomazi et al. *J. Dairy Sci.* 2015;98(11):7421-7422.
63. Tomazi T, Gonçalves JL, Barreiro JR, Arcari MA, dos Santos MV. Letter to the editor: A response to the comments of Silanikove et al. *J. Dairy Sci.* 2015;98(11):7423–7425 <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10195>.
64. Amrane S, Lagier JC. Metagenomic and clinical microbiology. *Human Microbiome Journal.* 2018;9:1-6.

65. Gandra EA, Gandra TKV, de Mello WS, Godoi HS. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. *Acta Sci. Technol.* 2008;30(1):09-118.
66. Friendship C, Kelton D, van de Water D, Slavic D, Koskinen M. Field evaluation of the Pathoproof mastitis PCR assay for the detection of *Staphylococcus aureus* infected cows using DHI samples. *NMC Annual Meeting Proceedings.* 2010;226-227.
67. Zadoks RN, Middleton JR, McDougall S, Katholm J, Schukken YH. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2011;16(4):357-372. <https://doi.org/10.1007/s10911-011-9236-y>.
68. Pasternak J. Novas metodologias de identificação de micro-organismos: MALDI-TOF. *einstein.* 2012;10(1):118-119.
69. Gonçalves, JL, Tomazi T, Barreiro JR, Braga PA.C, Ferreira CR, Araújo Junior JP, dos Santos, MV. Identification of *Corynebacterium* spp. isolated from bovine intramammary infections by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Veterinary Microbiology.* 2014;173(1-2):147-151.
70. Dhoble AS, Ryan KT, Lahiri P, Chen M, Pang X, Cardoso FC, Bhalerao KD. Cytometric fingerprinting and machine learning (CFML): A novel label-free, objective method for routine mastitis screening. *Computers and Electronics in Agriculture.* 2019;162:505-513. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2019.04.029>.
- 71 Rossi BF, Bonsaglia ECR, Castilho IG, Dantas STA, Salina A, Langoni H, Pantoja JCF, Budri PE, Fitzgerald-Hughes D, Júnior AF, Rall VLM. Genotyping of long term persistent *Staphylococcus aureus* in bovine subclinical mastitis, *Microbial Pathogenesis.* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.031>.
72. Melchior MB, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *Vet J.* 2006;171(3):398-407.
73. Grunert T, Stess B, Wolf F, Sordelli DO, Buzzola FR, Ehling-Schulz M. Distinct phenotypic traits of *Staphylococcus aureus* are associated with persistent, contagious bovine intramammary infections. *Nature | Scientific reports.* 2018;(8):1596 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34371-1>
74. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004;(2):95-108.
75. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999;(284):1318-1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>.
76. Prenafeta A, March R, Foix A, Casals I, Costa L. Study of the humoral immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilm-embedded bacterin in dairy cows: Possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2010;134:208-217.

77. Guimarães G, de França CA, Krug FS, Peixoto RM, Krewer CC, Lazzari AM, da Costa MM. Caracterização fenotípica, produção de biofilme e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de casos de mastite em bovinos e bubalinos. *Pesq. Vet. Bras.* 2012;32(12):1219-1224.
78. Dieser AS, Fessia AS, Zanotti AR, Raspanti CG, Odierno LM. Fibronectin and laminin induce biofilm formation by *Streptococcus uberis* and decrease its penicillin susceptibility. *Microbial Pathogenesis.* 2019;136.
- 79 Varhimo E, Varmanen P, Fallarero A, Skogman M, Pyörälä S, Iivanainen A, Sukura A, Vuorela P, Savijoki K. Alpha- and b-casein components of host milk induce biofilm formation in the mastitis bacterium *Streptococcus uberis*. *Vet. Microb.* 2011;149(3-4):381-389.
- 80 Morandi S, Cremonesi P, Capra E, Silveti T, Decimo M, Bianchini V, Alves AC, Vargas AC, Costa GM, Ribeiro MG, Brasca M. Molecular typing and differences in biofilm formation and antibiotic susceptibilities among *Prototheca* strains isolated in Italy and Brazil. *J. Dairy Sci.* 2016;8(99):6436-6445. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-10900>.
- 81 Chuzeville S, Dramsi S, Madec JY, Haenni M, Payot S. Antigen I/II encoded by integrative and conjugative elements of *Streptococcus agalactiae* and role in biofilm formation. *Microb Pathog.* 2015;88:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.07.018>.
82. Elvinger, F, Hansen PJ, Natzke RP. Modulation of function of bovine polymorphonuclear leukocytes and lymphocytes by high temperature in vitro and in vivo. *Am. J. Vet. Res.* 1991;52:1692-1698.
83. Elvinger F, Natzke RP, Hansen PJ. Interactions of heat stress and bovine somatotropin affecting physiology and immunology of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 1992;75:449-462.
84. do Amaral BC, Connor EE, Tao S, Hayen MJ, Bubolz JW, Dahl GE. Heat stress abatement during the dry period influences prolactin signaling in lymphocytes. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2010;38:38-45.
85. Gott PN, Rajala-Schultz PJ, Schuenemann GM, Proudfoot KL, Hogan JS. Effect of gradual or abrupt cessation of milking at dry off on milk yield and somatic cell score in the subsequent lactation. *J. Dairy Sci.* 2017;100(3):2080-2089.
86. Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN. Invited Review: The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis. *J. Dairy Sci.* 2006;89:1877-1895.
87. Dodd FH, Westgarth DR, Neave FK, Kingwill RG. Mastitis – The strategy of control. *J. Dairy Sci.* 1969;52:689-695.
88. Osterås O, Edge VL, Martin SW. Determinants of success or failure in the elimination of major mastitis pathogens in selective dry cow therapy. *J. Dairy Sci.* 1999;82:1221-1231. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75345-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75345-2).

CAPÍTULO 2 – ARTIGO

Artigo conforme as normas da revista Journal of Dairy Science

Efeito da mastite subclínica crônica antes da secagem na primeira contagem de células somáticas no pós-parto de vacas leiteiras

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de mastite subclínica em vacas leiteiras antes da secagem, os valores da CCS neste período e as chances de mastite subclínica no primeiro teste da próxima lactação. Foram avaliadas 2.455 lactações de 2.064 vacas em 14 fazendas que incluíram 9.820 exames de CCS de vacas. As lactações foram agrupadas em quatro categorias com base na quantidade de exames de CCS acima de 200.000 células/mL nos três meses que antecederam a secagem. Também foram agrupadas pela média geométrica da CCS dos últimos três meses em cinco categorias. A variável resposta binária, baseada na primeira CCS após o parto, foi “Sadia” ($CCS < 200.000$ células/mL) ou “Subclínica” (≥ 200.000 células/mL). Foram criados três modelos de regressão logística mista; as variáveis ordem de lactação, duração do período seco, estação do ano para o parto e para a secagem também foram incluídas nos modelos. A avaliação do conjunto de dados (Modelo1) mostrou que 850 (34,5%) das lactações iniciaram com mastite subclínica, independentemente de como secaram anteriormente. Houve grande variação entre as propriedades e, com exceção da duração do período seco, todas as demais variáveis avaliadas influenciaram o resultado da CCS no pós-parto. A taxa de novos casos (Modelo2) foi de 20,9% (152/729) e foi mais influenciada pela ordem de lactação, onde vacas de quatro ou mais lactação tiveram mais de duas vezes chance de novo caso em relação às vacas de segunda lactação (OR=2,40 IC 95% 1,27~4,46). A estação da secagem não influenciou os novos casos. A taxa de cura (modelo 3) foi de 59,6% (1.028/1.726) e variou de 20,0 a 83,3% entre as propriedades. Vacas que secaram com média geométrica da CCS abaixo de 200.000 células/mL nos últimos três meses de lactação tiveram mais de seis vezes mais chance de cura em relação às vacas que secaram com média geométrica acima de 1,6 milhão de células/mL (OR=6,41 IC95% 3,17~13,15). A avaliação sistemática da CCS ao final da lactação pode ajudar os produtores a tomar decisões para prevenir a mastite crônica e também estabelecer recomendações de manejo para vacas crônicas com alta CCS na secagem, o descarte desses animais deve ser considerado.

Palavras-chave: dinâmica, leite, período seco, taxa de cura.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the occurrence of chronic subclinical mastitis in dairy cows before dry-off, the somatic cell count (SCC) values in this period and the odds of subclinical mastitis in the first test day of a new lactation. 2,455 lactations from 2,064 cows were evaluated in 14 farms that included 9,820 individual tests. Lactations were grouped into four categories based on the number of test days $\geq 200,000$ cells/mL in the three months prior to dry-off, and were also grouped by the geometric mean SCC of the last three months into five categories. The binary response variable was based on the first test day of the next lactation and was grouped as “healthy” ($<200,000$ cells/mL) or “subclinical” ($\geq 200,000$ cells/mL). Three mixed logistic regression models were created, and also included the explanatory variables parity, duration of dry period, season of calving, season of dry-off. Data set evaluation (model1) showed that 850 (34.5%) of lactations returned with subclinical mastitis in the next lactation. There was a wide variation between the herds and, except for duration of dry period, all variables used influenced the postpartum SCC result. The rate of new cases (Model2) was 20.9% (152/729) and was more influenced by parity, where cows of four or more lactation were more than twice as likely to have a new case compared to second lactation cows (OR=2,40 IC 95% 1,27~4,46). The season of dry-off did not influence the new cases. The cure rate during the dry period was 59.6% (1,028 / 1,726) and ranged from 20.0 to 83.3% between herds. Cows that dry-off with geometric mean SCC below 200,000 cells / mL in the last three months of lactation were six times more likely to cure than cows that dry-off with geometric mean above 1,600,000 cells/mL (OR = 6.41-95% CI). 3.17-13,15). Systematic evaluation of the end lactation SCC can help farmers to make decisions to prevent chronic mastitis and also to establish protocols for management for chronic cows at dry-off, culling must be considered.

Keywords: cure rate , dry period, dynamics, milk

INTRODUÇÃO

O período seco da vaca é o momento fisiológico onde a interrupção da produção de leite permite a involução do tecido mamário, a regeneração do tecido secretor, o início da produção de colostro e interfere positivamente na produção na próxima lactação (Hurley et al., 2016; Weaver e Hernandez, 2016). Além disto, este momento representa também uma grande oportunidade para otimizar a saúde da glândula mamária pois permite melhorar as taxas de cura de infecções existentes e de prevenir a ocorrência de novas infecções (Green et al., 2007; Dufour e Dohoo, 2012, Henderson et al., 2016).

Vacas com mastite subclínica crônica são importantes fontes de infecção por micro-organismos contagiosos para vacas sadias e contribuem muito para as altas contagens de células somáticas no tanque (Zadoks et al., 2003, Rodrigues et al. 2017). Durante anos, estudos que acompanharam a dinâmica de infecções durante um ano ou mais mostraram que um número considerável de vacas nos rebanhos apresenta mastite subclínica crônica (Dodd et al., 1969; Zadoks et al., 2003; Rossi et al., 2019).

Zadoks et al. (2003) acompanharam dois rebanhos na Holanda durante 18 meses com amostras de todos os quartos mamário de todas as vacas em lactação a cada 3 semanas. Estes autores reportaram que 75% das infecções provocadas por *Streptococcus uberis* foram subclínicas e aproximadamente um quarto delas durou mais que 72 dias. Uma das cepas dominantes apresentou mediana da duração dos casos de 248 dias, com infecções persistentes até 309 dias. Os autores não acompanharam o desfecho das infecções após a secagem das vacas.

Tradicionalmente as avaliações de novos casos e curas de infecções IMMs são realizadas por quarto mamário e patógeno causador de mastite (Dodd et al., 1969; Dufour e Dohoo, 2013). Estes estudos são caros, complexos; sujeitos às variações do método de identificação do patógeno envolvido e muitas vezes não acompanham o histórico da infecção

por longos períodos (Dohoo e Leslie, 1991; Reyher et al., 2011; Dufour e Dohoo, 2012;; Bradley et al., 2015; Bach et al.,2019).

A CCS é largamente utilizada pelo setor leiteiro para monitorar a qualidade do leite nos tanques de fazendas (Eberhart et al., 1982; Ruegg e Taboni, 2000; Norman et al., 2011, Fauteux et al.,2015), o estado de saúde da glândula mamária das vacas (Fateaux et al., 2014; Damm et al., 2017; Hiitiö et al., 2017; Ruegg et al., 2017) e subsidiar programas de melhoramento genético (Barkema et al., 2015; Martin et al., 2018).

Alguns estudos utilizaram um número muito grande de dados de CCS para acompanhar a dinâmica da mastite subclínica através do período seco (Cook et al., 2002; Madouasse et al., 2012, Fauteux et al., 2015; Henderson et al. 2016, Lipkens et al. 2019). Todos estes estudos utilizaram o limite de CCS de 200.000 células/mL para avaliar as taxas aparentes de cura e novos casos de mastite subclínica entre a secagem e o parto na lactação seguinte. Existem poucos estudos sobre esse tema no Brasil (Oliveira et al. 2015).

O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de mastite subclínica crônica em vacas leiteiras antes da secagem, os valores da CCS neste período e as chances de mastite subclínica no primeiro teste da próxima lactação.

MATERIAL E MÉTODOS

Durante os anos de 2017 e 2018 iniciamos um estudo observacional longitudinal retrospectivo e prospectivo em 14 fazendas de leite no estado de Goiás, escolhidas por conveniência a um raio máximo de 120 km do município de Goiânia. As propriedades possuíam em média 260 vacas em lactação (60 a 1.100 vacas) produzindo em média 19,7 kg de leite/dia (14,0 a 29,0 kg/dia). Oito destas propriedades realizavam acompanhamento de CCS mensal do rebanho e disponibilizaram o histórico dos exames, partos e secagens a partir do ano de 2015.

A partir do início do estudo, acompanhamos mensalmente todas as propriedades para coleta da CCS mensal e coleta dos dados de parição e secagem. Todas as propriedades realizavam terapia de vaca seca e pós-dipping e com exceção de duas propriedades, todas as demais realizavam teste dos primeiros jatos de leite antes de cada ordenha para identificação de mastite clínica.

Coleta das amostras para CCS

Amostras de leite compostas do leite dos quatro tetos foram coletadas mensalmente de todas as vacas em lactação, com auxílio de coletores de leite, após a ordenha completa de cada animal para que representasse bem o leite secretado durante a ordenha (Rueg e Pantoja 2013).

O acondicionamento das amostras foi feito diretamente em frascos próprios para coleta contendo uma pastilha do conservante Bronopol I® (Laborclin, Brasil). Cada frasco foi identificado, homogeneizado e encaminhado imediatamente para o laboratório ou mantidas em local fresco por até dois dias, no caso de impossibilidade de envio imediato (De Freitas et al., 2016).

O Laboratório de Qualidade de Leite do Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (LQL/EV/UFG) realizou as análises pelo método de Citometria de Fluxo em equipamentos automatizados (Fossomatic™ 5000 Basic, FOSS ou DELTA Somascope™) de acordo com o ISO/IDF.

Preparação dos dados coletados

Após a coleta dos dados de parição, secagem e resultados dos exames de CCS os dados foram avaliados para selecionar as vacas e as lactações que atendiam aos seguintes critérios: Possuir os três últimos resultados da CCS nos três meses que antecederam a

secagem; possuir o primeiro resultado de CCS da lactação seguinte entre os dias quarto e 50 após o parto (Fauteaux et al., 2014) e período seco mínimo de 40 dias e máximo de 210 dias.

Um total de 2.455 lactações de 2.064 vacas nas 14 fazendas, que incluíram 9.820 exames de CCS (três antes da secagem e um após o parto de cada lactação) atendeu aos critérios estabelecidos e foram selecionadas para o estudo. Deste total de lactações 644 tiveram dados históricos resgatados entre 2015 e 2016, e 1.811 lactações foram acompanhadas entre 2017 e 2018.

Variáveis avaliadas

O primeiro resultado da CCS de cada vaca após o parto determinou a variável de resposta binária: “sadia” ($CCS < 200.000$ células/mL) ou “mastite subclínica” ($CCS \geq 200.000$ células/mL); que foi avaliada segundo as variáveis explicativas: Ano de parto, ano de secagem, estação do parto, estação da secagem, ordem de lactação, duração do período seco e resultados dos três últimos exames de CCS da lactação anterior. Todas as variáveis explicativas foram categóricas.

Para ano do parto foram criadas quatro categorias, uma para cada ano. Os dados dos anos 2015 e 2016 foram todos resgatados do histórico de oito das 14 propriedades participantes do estudo. Já os dados dos anos 2017 e 2018 foram obtidos durante o estudo e incluíam dados de todas as propriedades. As estações do ano para secagem e parição foram categorizadas em “Seca” (Abril a Setembro) e “Chuvas” (Outubro a Março).

Para ordem de lactação foram criadas quatro categorias (2, 3, 4 e 5 ou+ lactações). As categorias se referem à lactação que se inicia após o período seco avaliado; por exemplo, as vacas de primeira lactação foram avaliadas a partir dos três últimos meses antes da secagem, portanto o resultado da secagem será visto na lactação seguinte e ela é classificada como lactação “2”.

Para duração do período seco da vaca foram criadas três categorias (40 a 90 dias, 91 a 150 dias e 151 a 210 dias). Períodos secos com duração inferior a 40 dias (muito curtos) não foram avaliados porque não eram programados pelas propriedades e poderiam ter ocorrido em função de aborto ou falhas no controle reprodutivo. Períodos secos maiores que 210 dias são muito longos, pouco frequentes e poderiam expor um mesmo período seco a duas mesmas estações do ano em anos distintos.

Para os resultados dos três últimos exames de CCS da lactação anterior foram criados dois grupos de variáveis categóricas: Para o primeiro grupo, com quatro categorias, cada lactação foi classificada como tendo zero (0) ou um (1) ou dois (2) ou três (3) resultados de $CCS \geq 200.000$ células/mL.

Por fim cada lactação teve a média geométrica dos três últimos exames calculada e distribuída em uma das cinco categorias: CCSg1 (<200.000 células/mL), CCSg2 (de 200.000 a 399.000 células/mL), CCSg3 (de 400.000 a 799.000 células/mL), CCSg4 (800.000 a 1,599.000 células/mL) e CCSg5 ($\geq 1.600.000$ células/mL).

Análises descritivas e estatísticas

Os dados coletados nas fazendas bem como os laudos com resultados dos exames de CCS foram organizados e tabulados em Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2010).

Para as análises estatísticas utilizamos a função glm do pacote lme4 (Bates et al. 2014) do software R (R Core Team, 2018). Todas as variáveis foram avaliadas em três modelos de regressão logística. Como existem repetições de animais avaliados em lactações diferentes, as lactações foram aninhadas dentro de vacas que foram aninhadas dentro do rebanho.

A variável resposta foi considerada, como sucesso (1) ou fracasso (0) (Cox 1958) de forma diferente para os modelos conforme será mostrado abaixo. Para selecionar as variáveis a serem retidas utilizamos o procedimento “stepwise” em cada um dos modelos.

As variáveis ano de parto, ano de secagem e duração do período seco não foram significativamente associadas ($p>0,05$) com as variáveis resposta e foram retiradas dos três modelos.

As variáveis estação da secagem da vaca e média geométrica dos três últimos exames de CCS não foram associadas significativamente ($p>0,05$) com a ocorrência de novos casos e foram retiradas apenas deste modelo.

Modelo1: Chance de mastite subclínica no primeiro teste pós parto.

Todas as lactações disponíveis que atenderam aos critérios estabelecidos para o estudo entraram neste modelo, foram avaliadas todas as variáveis já mencionadas sem restrições. A variável resposta foi “1” para mastite subclínica e “0” para sadia.

Modelo2. Chance de novo caso de mastite subclínica através do período seco

Foram selecionadas para este modelo apenas as lactações elegíveis para novo caso no início da lactação seguinte, isto é, vacas que secaram com a última CCS < 200.000 células/mL (“sadias por ocasião da secagem”) independente de como foram os resultados dos dois exames anteriores. A variável resposta também foi “1” para mastite subclínica e “0” para sadia.

Durante a exploração dos dados verificamos que apenas 24 vacas possuíam cinco ou mais lactações elegíveis para novos casos. Por isso, apenas neste modelo, a variável ordem de lactação ficou agrupada em três categorias (2, 3 e 4 ou mais lactações).

Modelo3: Chance de cura da mastite subclínica através do período seco

Para este modelo foram selecionadas apenas as lactações elegíveis para cura isto é, vacas que secaram com a última CCS ≥ 200.000 células/mL (“mastite subclínica por ocasião

da secagem”). Neste caso como a variável resposta de sucesso foi cura, a variável resposta foi invertida, sendo “1” para sadia e “0” para mastite subclínica no primeiro exame após o parto.

RESULTADOS

Modelo1: Chance de mastite subclínica no primeiro teste pós parto.

Do total de 2.455 lactações, 850 (34,6%) apresentaram mastite subclínica no início da lactação seguinte. A mediana e os quartis (Q1 e Q3) do percentual de vacas que iniciam uma nova lactação com mastite subclínica entre as propriedades foram 34,1% (29,5%-68,2%), respectivamente (Tabela1). Os dados da regressão logística estão sumarizados na Tabela 2.

Vacas que secaram nas estações das chuvas tiveram mais chance de apresentar mastite subclínica no primeiro exame após o parto, comparadas com as vacas que secaram nas estações secas (OR=1,44 IC95% ~ 1,19-1,73). Os percentuais das lactações que tiveram o primeiro resultado de CCS \geq 200.000 células/mL foram de 39,1% e 31,6% para as vacas que secaram na estação das chuvas e estação seca respectivamente.

Vacas que pariram na estação das chuvas tiveram mais chance de apresentar mastite subclínica no primeiro exame após o parto (OR=1,60~1,32-1,94) em comparação as vacas que pariram na seca. Vacas de cinco ou mais lactações tiveram 2,26 vezes mais chance (1,63-3,13) de retornarem ao próximo parto com mastite subclínica comparado às vacas que iniciaram a segunda lactação.

A quantidade de exames acima do limite de 200.000 células/mL nos três últimos meses antes da secagem exibiu tendência (P=0,071) para aumentar a chance de mastite subclínica no pós-parto. As chances tenderam a aumentar em torno de 1,6 vezes quando dois ou três exames acima do limite ocorreram no final da lactação em comparação as vacas cujas todas as contagens estavam abaixo de 200.000 células/mL.

Vacas que secaram com média geométrica da CCS nos três últimos exames entre 800.000 e 1.599.000 células/mL e acima de 1.600.000 células/mL tiveram muito mais chance de apresentar mastite subclínica no início da próxima lactação (OR=2,93~1,73-4,99) e (OR=5,33~2,77 e 10,38), respectivamente, em relação ao grupo de vacas que secaram com média geométrica abaixo de 200.000 células/mL ($p < 0,0001$).

Modelo2. Chance de novo caso de mastite subclínica através do período seco.

As lactações elegíveis para novos casos foram originadas em 13 das 14 propriedades. Ao todo 729 lactações atenderam ao critério de apresentar o último resultado de CCS abaixo de 200.000 células/mL, elas representaram 29,7% do total das lactações estudadas. A taxa de novas mastites subclínicas do período seco para o parto subsequente foi de 20,9% (152/729). A mediana e os quartis (Q1-Q3) das taxas de novos casos entre as propriedades foi 23,1% (10,1%-32,4%) (Tabela 1). Os dados da regressão logística estão sumarizados na Tabela 3.

Vacas que pariram nos períodos das chuvas (Outubro a Março) tiveram mais chance OR=1,68 (IC95% 1,13-2,50), de apresentar um novo caso de mastite subclínica no primeiro exame após o parto. A taxa de novos casos para este grupo de vacas foi de 26,1% e a taxa de novos casos para vacas que pariram nas estações secas foi de 18,1%.

Vacas que pariram a partir da quarta lactação tiveram mais chance de apresentar um novo caso no pós-parto em comparação com as vacas que foram para a segunda lactação (OR=2,40~1,27-4,46).

Vacas que apresentaram dois exames de CCS \geq 200.000 células/mL, portanto no penúltimo e no antepenúltimo mês, tiveram quase três vezes mais chance (OR=2,91~1,52-5,50) de novo caso no início da próxima lactação em comparação com as vacas que secaram com os três últimos exames de CCS abaixo de 200.000 células/mL.

Modelo3: Chance de cura da mastite subclínica através do período seco

Todas as 14 propriedades apresentaram lactações elegíveis para cura. As lactações elegíveis para cura representaram 70,3% das lactações avaliadas. A taxa de cura de mastite subclínica nas lactações durante o período seco foi de 59,6% (1.028/1.726), portanto 40,4% (100%-59,6%) das vacas permaneceram com mastite subclínica através do período seco. Entre as propriedades a mediana da taxa de cura e os quartis (Q1-Q3) foram 62,8% (51,5%-65,9%) (Tabela 1). Os dados da regressão logística estão sumarizados na Tabela 4.

Vacas que secaram na estação seca tiveram mais chances de cura do que vacas que secaram na estação das chuvas (OR=1,5~1,21-1,86) e as vacas que pariram na estação seca tiveram mais chances de cura que vacas que pariram na estação das chuvas (OR=1,62~1,30-2,01).

Vacas que iniciaram a segunda lactação tiveram quase duas vezes mais chances de cura em comparação com as vacas que iniciaram a quinta lactação (OR=1,97~1,37-2,83). Vacas que apresentaram apenas um exame de CCS ≥ 200.000 células/mL antes da secagem também tiveram quase duas vezes mais chance de cura em relação às vacas que secaram com os três meses anteriores à secagem acima deste ponto de corte (OR=1,78 1,07-3,01).

Por fim vacas que mesmo secando com mastite subclínica, mas que apresentaram média geométrica da CCS nos últimos três meses anteriores à da secagem < 200.000 células/mL tiveram mais de seis vezes chance de cura em relação às vacas que secaram com CCS acima de 1.600.000 células/mL (OR=6,41~3,17-13,15). A taxa de cura no primeiro grupo foi de 80,9% e no último foi de 30,2%.

DISCUSSÃO

A prevalência de mastite subclínica avaliada pela CCS das vacas no início da lactação (34,6%) foi alta e está relacionada ao aparecimento de 20,9% de novos casos em 29,7% das

vacas que secaram sadias e à persistência de 40,4% de mastite subclínica em 70,3% das vacas que secaram com mastite subclínica. Está bem estabelecido o conceito de prevalência de mastite relacionado ao aparecimento de novos casos e à persistência das infecções (Dodd et al., 1969; Cook et al., 2002, Dofour e Dohoo 2012)

A taxa de novos casos variou bastante entre as propriedades e está relacionada às particularidades de cada propriedade quanto à exposição dos animais aos patógenos favorecidos pelo clima, ambiente, manejo de ordenha, presença de animais com infecção por patógenos contagiosos e imunidade do rebanho (Zadocks et al. 2003, Whist e Østera, 2007; Fauteux et al.,2014; Cardozo et al., 2015, Oliveira et al.,2015).

A taxa de cura observada também variou entre as propriedades. Outros estudos que avaliaram grande número de vacas reportaram grande variação nas taxas de cura entre as propriedades (Madouasse et al. 2012, Fauteux et al. 2014). Os fatores que interferem nas taxas de cura estão relacionados à capacidade imune das vacas para eliminar infecções, número de tetos acometidos, patógeno envolvido e terapias utilizadas (Barkema et al., 2006).

A estação do ano no momento da parição das vacas foi associada à maior ocorrência de mastite subclínica no primeiro exame de CCS após o parto (modelo 1), à maior ocorrência de novos casos (modelo 2) e a menor chance de cura (modelo 3). A estação chuvosa no Brasil é também a estação com maiores temperaturas (Tomazi et al., 2018). As maiores exposições aos patógenos ambientais e o stress térmico durante a estação chuvosa podem predispor a ocorrência de novas infecções (Elvinger et al., 1991, 1992; do Amaral et al., 2010, Fauteux et al., 2014; Cardozo et al. 2015; Tao et al. 2018).

A estação do ano no momento da secagem da vaca de secagem não foi associada a novos casos de mastite subclínica após o parto ($p>0,05$). A terapia de vaca seca, utilizada em todas as propriedades no momento da secagem, parece estar prevenindo bem novas infecções na fase inicial da secagem mesmo no estação das chuvas. .No entanto, a estação da secagem

foi associada à maior chance de cura para vacas que secaram na estação seca. Uma possível explicação é a de que vacas que secaram com mastite subclínica durante a estação das chuvas (quente e úmida) poderiam ter o sistema imune comprometido por stress térmico que resultaria em falhas na eliminação de infecções existentes (Elvinger et al., 1991, 1992; do Amaral et al., 2010).

A ordem de lactação crescente foi associada ao risco crescente de mastite subclínica no primeiro exame de CCS da lactação seguinte (modelo1). A partir da quarta lactação as vacas apresentaram maior chance de novo caso através do período seco (modelo 2). A chance de cura nas vacas que foram para a segunda lactação foi bem maior quando em relação às vacas de cinco ou mais lactação (modelo3). Os resultados confirmam os obtidos por Henderson et al. (2016) que avaliaram mais de 20 mil lactações e reportaram chance de cura (OR=2,0~1,79-2,25) para as mesmas categorias de lactação utilizadas em nosso estudo.

A conformação de úbere, o risco maior de lesões de tetos como hiperqueratose, maiores produções durante a secagem e falha no sistema imune provocada por diversos fatores como stress térmico e oxidativo contribuem para que animais com maior número de lactações sejam mais expostos ao risco de novas infecções e infecções persistentes (Green et al., 2007; Singh et al., 2014; Cardozo et al., 2015, Henderson et al., 2016; Sordillo 2018).

A quantidade de exames de CCS acima de 200.000 células por mL nos três meses que antecederam a secagem mostrou tendência ($P=0,071$) para influenciar as chances de uma vaca apresentar mastite subclínica no primeiro exame após o parto e as taxas de cura (modelos 1 e 3, respectivamente).

No modelo para cura, a presença de um exame de CCS acima de 200.00 células/mL, (obrigatoriamente no último mês), foi significativamente associada à maior chance de cura comparada a vacas que tiveram dois ou três exames acima do limite por ocasião da secagem. O resultado para cura foi semelhante ao reportado por Henderson et al. (2016).

A última CCS da lactação no modelo para novo caso foi, por definição, abaixo de 200.000 células/mL. Portanto o número de exames acima deste limite nos últimos três meses de lactação ficaram restritos aos resultados zero, um, ou dois exames para este modelo. Vacas com dois exames acima do limite de 200.000 células/mL antes da secagem tiveram muito mais chance de novo caso no início da lactação seguinte comparadas às vacas que secaram com as três últimas CCS abaixo deste limite de CCS. Esta situação ocorreu em 7,5% (55/729) das lactações elegíveis para novos casos.

Uma possível explicação para estes achados seria a de que uma IIM prévia deixaria a vaca mais suscetível a uma nova infecção por danos anatômicos à barreira do canal do teto ou tecidos mamários (Rainard e Riollet, 2006). Lipkens et al. (2019) reportaram que vacas curadas através do período seco (mas não antes da secagem) tiveram risco de mastite clínica significativamente maior em comparação com vacas saudáveis através do período seco, a razão de risco foi 2,23 (1,29–3,85).

Uma segunda hipótese, e a mais provável, seria a de que estas vacas não se curaram bacteriologicamente antes da secagem, mesmo com a CCS abaixo de 200.000 células/mL no último teste antes da secagem. A sensibilidade do teste de CCS para identificação de IIMs varia em função do agente envolvido na infecção e do número de quartos mamários acometidos (Bach et al., 2019; Lipkens et al., 2019).

Por fim a média geométrica da CCS nos últimos três meses da lactação apresentou uma importante associação com a taxa de cura neste modelo; à medida que a média geométrica aumenta diminuem drasticamente as taxas de cura e confirma observações de Osterås et al., (1999).

CONCLUSÕES

Vacas com mastite subclínica crônica com altas contagens de CCS no final de lactação têm muito mais chance de retornar com mastite subclínica na próxima lactação pelas baixas chances de cura através da secagem. A avaliação sistemática da CCS de vacas no final da lactação, incluindo a média geométrica da CCS nos últimos três meses de lactação, pode ajudar produtores e consultores nas tomadas de decisões para evitar que as vacas se tornem crônicas ainda no início de lactação e para definir sobre o manejo destes animais. O descarte deve ser considerado.

REFERÊNCIAS

- Bach, K.D., A. Sipka e J.A.A. McArt. 2019. Case study: Evaluating quarter and composite milk sampling for detection of subclinical intramammary infections in dairy cattle. *Prev. Vet. Med.* 163:51-57
- Barkema, H.W., Y.H. Schukken e R.N. Zadoks. 2006. Invited Review: The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis. *J. Dairy Sci.* 89:1877-1895
- Barkema, H.W., M.A.G. von Keyserlingk, J.P. Kastelic, T.J.G.M. Lam, C. Luby, J.P. Roy, S.J. LeBlanc, G.P. Keefe e D.F. Kelton. 2015. Invited review: Changes in the dairy industry affecting dairy cattle health and welfare. *J. Dairy Sci.* 98:7426-7445.
- Bates, D., M. Maechler, B. Bolker e S. Walker. 2014. lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. R package version 1.1-6. <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>
- Bradley, A. J., S. De Vliegheer, M.J. Green, P. Larrosa, B. Payne, E.S. van de Leemput, O. Samson, D. Valckenier, T. Van Werven, H.W.F. Waldeck, V. White. 2015. An investigation of the dynamics of intramammary infections acquired during the dry period on European dairy farms. *J. Dairy Sci.* 98, 6029-6047.
- Cardozo, L.L., A. Thaler Neto, G.N. Souza, L.C.A. Picinin, N.C. Felipus, N.L.M. Reche, F.A. Schmidt. 2015. Risk factors for the occurrence of new and chronic cases of subclinical mastitis in dairy herds in southern Brazil, *J. Dairy Sci.* 98:1–11.
- Cook, N. B., T. B. Bennett, K. M. Emery e K. V. Nordlund. 2002. Monitoring nonlactating cow intramammary infection dynamics using DHI somatic cell count data. *J. Dairy Sci.* 85:1119-1126. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74173-8](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74173-8).
- Cox, D. R. 1958. The Regression Analysis of Binary Sequences. *J. Royal Stat. Soc.: Series B (Methodological)*, 20:215-232. doi:10.1111/j.2517-6161.1958.tb00292.x
- Damm M., C. Holm, M. Blaabjerg, M.N. Bro, D. Schwarz. 2017. Differential somatic cell count - A novel method for routine mastitis screening in the frame of Dairy Herd Improvement testing programs. *J. Dairy Sci.* 100:1-15.
- de Freitas, L.N., L.D. Cassoli, J. Da Silva, J.C. de Figueiredo Pantoja, P.F. Machado. 2016. Do Milk Samples Stored for 12 Days after Collection Exhibit a Change in Composition Related to the Initial Bacterial Load? *J. Food Prot.* 79:816-820
- do Amaral, B. C., E. E. Connor, S. Tao, M. J. Hayen, J. W. Bubolz, e G. E. Dahl. 2010. Heat stress abatement during the dry period influences prolactin signaling in lymphocytes. *Domest. Anim. Endocrinol.* 38:38-45.
- Dodd, F. H., D. R. Westgarth, F. K. Neave, e R. G. Kingwill. 1969. Mastitis—The strategy of control. *J. Dairy Sci.* 1969, 52:689-695.
- Dufour S., I.R. Dohoo. 2012. Monitoring dry period intramammary infection incidence and elimination rates using somatic cell count measurements. *J. Dairy Sci.* 95:7173-7185.
- Dufour S., I.R. Dohoo. 2013. Monitoring herd incidence of intramammary infection in lactating cows using repeated longitudinal somatic cell count measurements. *J. Dairy Sci.* 96:1568-1580.
- Dohoo, I.R., K.E. Leslie. 1991. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. *Prev. Vet. Med.* 10:225-237.
- Eberhart R.J., L.J. Hutchinson, S.B. Spencer. 1982. Relationships of Bulk Tank Somatic Cell Counts to Prevalence of Intramammary Infection and to Indices of Herd Production. *J. Food Prot.* 45:1125-28.
- Elvinger, F., P. J. Hansen, R. P. Natzke. 1991. Modulation of function of bovine polymorphonuclear leukocytes and lymphocytes by high temperature in vitro and in vivo. *Am. J. Vet. Res.* 52:1692-1698.

- Elvinger, F., R. P. Natzke, P. J. Hansen. 1992. Interactions of heat stress and bovine somatotropin affecting physiology and immunology of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 75:449-462.
- Fauteux V., J.P. Roy, D.T. Scholl, E. Bouchard. 2014. Benchmarks for evaluation and comparison of udder health status using monthly individual somatic cell count. *Can Vet J* 55:741-748.
- Fauteux V., E. Bouchard, D. Haine, D. Scholl, J. Roy. 2015. Prediction of bulk tank somatic cell count violations based on monthly individual cow somatic cell count data. *J. Dairy Sci.* 98:2312-21.
- Gott P.N., P.J. Rajala-Schultz, G.M. Schuenemann, K.L. Proudfoot, J.S. Hogan. 2017. Effect of gradual or abrupt cessation of milking at dry off on milk yield and somatic cell score in the subsequent lactation. *J. Dairy Sci.* 100:2080-2089.
- Green M.J., A.J. Bradley, G.F. Medley, W.J. Browne. 2007. Cow, Farm, and Management Factors During the Dry Period that Determine the Rate of Clinical Mastitis After Calving. *J. Dairy Sci.* 90:3764–76.
- Hiitiö H., J. Vakkamäki¹, H. Simojoki, T. Autio, J. Junnila, S. Pelkonen e S. Pyörälä. 2017. Prevalence of subclinical mastitis in Finnish dairy cows: changes during recent decades and impact of cow and herd factors. *Acta Vet. Scand.* 59:22.
- Henderson A.C., C.D. Hudson, A.J. Bradley, V.E. Sherwin, M.J. Green. 2016. Prediction of intramammary infection status across the dry period from lifetime cow records. *J. Dairy Sci.* 99:5586-95.
- Hurley W.L., J.J. Looor, P. Lacasse. 2016. This is an update of Hurley W.L., J.J. Looor. Mammary Gland: Growth Development and Involution. Reference Module in Food. Science Encyclopedia of Dairy Sciences 2nd Edition. 2011. 338–345.
- Kandeel S. A., A.A. Megahed, M.H. Ebeid, e P.D. Constable. 2019. Evaluation of 3 esterase tests for the diagnosis of subclinical mastitis at dry-off and freshening in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 102:1402-1416.
- Leitner, G., O. Koren, S. Jacoby, U. Merin, e N. Silanikove. 2012. Options for Handling Chronic Subclinical Mastitis During Lactation in Modern Dairy Farms. *Israel Journal of Veterinary Medicine.* 67:162-169.
- Lipkens Z., S. Piepers, J. Verbeke, e S. De Vliegher. 2019. Infection dynamics across the dry period using Dairy Herd Improvement somatic cell count data and its effect on cow performance in the subsequent lactation. *J. Dairy Sci.* 102:640–651.
- Madouasse A., W.J. Browne, J.N. Huxley, F. Toni, A.J. Bradley e M.J. Green. 2012 Risk factors for a high somatic cell count at the first milk recording in a large sample of UK dairy herds. *J. Dairy Sci.* 95: 1873–1884.
- Martin, P., H.W. Barkema, L.F. Brito, S.G. Narayana, e F. Miglior. 2018. Symposium review: Novel strategies to genetically improve mastitis resistance in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 101:2724-2736.
- Norman H.D., J.E. Lombard, J.R. Wright, C.A. Kopral, J.M. Rodriguez, R.H. Miller. 2011. Consequence of alternative standards for bulk tank somatic cell count of dairy herds in the United States. *J. Dairy Sci.* 94:6243–56.
- Oliveira C.S.F., H. Hogeveenc, A.M. Botelhod, P.V. Maia, S.G. Coelho, J.P.A. Haddad. 2015. Cow-specific risk factors for clinical mastitis in Brazilian dairy cattle. *Prev. Vet. Med.* 121:297–305.
- Osterås, O., V.L. Edge, e S.W. Martin. 1999. Determinants of success or failure in the elimination of major mastitis pathogens in selective dry cow therapy. *J. Dairy Sci.* 82:1221–1231. [http:// dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75345-2](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75345-2)

- Pantoja, J.C.F., C. Hulland, e P.L. Ruegg. 2009a. Somatic cell count status across the dry period as a risk factor for the development of clinical mastitis in the subsequent lactation. *J. Dairy Sci.* 92:139–148.
- Pantoja, J.C.F., C. Hulland, e P.L. Ruegg. 2009b. Dynamics of somatic cell counts and intramammary infections across the dry period. *Prev. Vet. Med.* 90:43–54
- Rabiee A.R., I.J. Lean. 2013. The effect of internal teat sealant products (Teatseal and Orbeseal) on intramammary infection, clinical mastitis, and somatic cell counts in lactating dairy cows: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 96:6915–6931.
- Rainard, P., C. Riollet. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.* 37:369–400.
- Reyher, K.K., S. Dufour, H.W. Barkema, L. Des Côteaux, T.J. Devries, I.R. Dohoo, G.P. Keefe, J.P. Roy, e D.T. Scholl. 2011. The National Cohort of Dairy Farms—A data collection platform for mastitis research in Canada. *J. Dairy Sci.* 94:1616–1626.
- Rodrigues L.G., M.H.C. de Aquino, M.R. Silva, L.C. Mendonça, J.F.M. de Mendonça, G.N. de Souza. 2017. A time series analysis of bulk tank somatic cell counts of dairy herds located in Brazil and the United States. *Cienc. Rural* 47:1-6
- Rossi B.F., E.C.R. Bonsaglia, I.G. Castilho, S.T.A. Dantas, A. Salina, H. Langoni, J.C.F. Pantoja, P.E. Budri, D. Fitzgerald-Hughes, A.F. Júnior, V.L.M. Rall. 2019. Genotyping of long term persistent *Staphylococcus aureus* in bovine subclinical mastitis, *Microbial Pathogenesis* doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.031>.
- Ruegg P.L e J.C.F. Pantoja. 2013. Understanding and using somatic cell counts to improve milk quality. *Irish J. Agr. Food Res.* 52:101-17.
- Ruegg P.L, T.J. Tabone. 2000. The relationship between antibiotic residues violations and somatic cell counts in Wisconsin dairy herds. *J Dairy Sci.* 83:2805-09.
- Ruegg P.L. 2017. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *J. Dairy Sci.* 100:10381–10397.
- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Schukken Y.H., D.J. Wilson, F. Welcome, L. Garrison-Tikofsky, R.N. Gonzalez. 2003. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet. Res.* 34:579–96.
- Singh, R.S., B.K. Bansal, e D.K. Gupta. 2014. Udder health in relation to udder and teat morphometry in Holstein Friesian × Sahiwal crossbred dairy cows. *Trop. Anim. Health Prod.* 46:93–98.
- Sordillo L. 2018. Mammary Gland Immunobiology and Resistance to Mastitis. *Vet. Clin. Food. Anim.* 34:507-523.
- Tomazi T., G.C. Ferreira, A.M. Orsi, J.L. Gonçalves, P.A. Ospina, D.V. Nydam, P. Moroni, M.V. dos Santos. 2018. Association of herd-level risk factors and incidence rate of clinical mastitis in 20 Brazilian dairy herds. *Prev. Vet. Med.* Disponível online: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.10.007>
- Weaver S.R.e L.L Hernandez. 2016. Autocrine-paracrine regulation of the mammary gland. *J. Dairy Sci.* 99:842–853.
- Whist A.C. e O. Osteras. 2007. Associations between somatic cell counts at calving or prior to drying-off and clinical mastitis in the remaining or subsequent lactation. *J Dairy Res.* 74:66–73.
- Zadoks, R.N., B.E. Gillespie, H.W. Barkema, O.C. Sampimon, S.P. Oliver e Y.H. Schukken. 2003. Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. *Epidemiology & Infection.* 130:335-349.

TABELAS

Tabela 1. Informação dos rebanhos avaliados, total de lactações avaliadas, lactações elegíveis para cura e para novas mastites subclínicas através do período seco

Faz.	Lactações avaliadas ¹	% subclínica pós parto ²	Elegíveis p/ cura ³	Taxa de cura ⁴	Elegíveis nova ⁵	Taxa de novas ⁶
1	741	35,0%	485	58,6%	256	22,7%
2	193	44,0%	122	49,2%	71	32,4%
3	118	31,4%	104	66,3%	14	14,3%
4	45	35,6%	31	64,5%	14	35,7%
5	759	28,9%	541	63,6%	218	10,1%
6	298	33,2%	193	62,7%	105	25,7%
7	84	67,9%	77	31,2%	7	57,1%
8	86	36,0%	70	62,9%	16	31,3%
9	51	23,5%	38	76,3%	13	23,1%
10	22	68,2%	22	31,8%		
11	18	27,8%	12	83,3%	6	50,0%
12	14	57,1%	10	20,0%	4	0,0%
13	14	21,4%	11	72,7%	3	0,0%
14	12	33,3%	10	60,0%	2	0,0%
Total (%) ⁷	2.455 (100%)		1.726 (70,3%)		729 (29,7%)	
Médias lact. ⁸		34,6%		59,6%		20,9%
Médiana Faz.		34,1%		62,8%		23,1%
(Q1-Q3) ⁹ .		(29,5-68,2)		(51,5-65,9)		(10,1-32,4)

¹Total de lactações avaliadas desde 2015 (fazendas 1,2,4,6,7 e 8 tiveram juntas 644 lactações avaliadas entre 2015 e 2016. As demais lactações foram avaliadas entre 2017 e 2018).

² Percentual do total das lactações avaliadas que apresentaram mastite subclínica no primeiro teste de CCS após o parto seguinte.

³ Lactações que encerraram com mastite subclínica (último teste da lactação com CCS acima de 200 mil) e portanto elegíveis para cura durante o período seco.

⁴ Taxa de cura da mastite subclínica entre a secagem e o primeiro exame no pós parto (primeiro exame abaixo de 200.000 células por mL).

⁵ Lactações que encerraram sadias (último teste da lactação anterior com CCS abaixo de 200 mil) e portanto elegíveis para novo caso de mastite subclínica no pós parto).

⁶ Taxa de novos casos da mastite subclínica entre a secagem e o primeiro exame no pós parto (primeiro exame acima de 200.000 células por mL).

⁷ Total e percentual de lactações sobre o total de lactações avaliadas.

⁸ Percentual médio dos resultados das lactações em função de cada modelo.

⁹ Medianas e quartis 1 e 3 dos percentuais dos resultados das fazendas em função de cada modelo.

Tabela 2. Modelo para chance de mastite clínica pós-parto. Frequências observadas, razão de chances (OR) e limites do intervalo de confiança (IC 95%)

Variáveis Preditoras	Categorias	Subcl./Total (%) ¹	OR ²	2,5%	97,5%	Valor p
Estação secagem	Seca ³	463/1.466 (31,6%)				<0,001
	Agua	387/989 (39,1%)	1,44	1,19	1,73	
Estação partição	Seca ³	470/1.536 (30,6%)				<0,0001
	Agua	380/919 (41,3%)	1,60	1,32	1,94	
Ordem de lactação	2 ³	239/979 (24,4%)				<0,0001
	3	272/794 (34,3%)	1,20	0,95	1,51	
	4	176/388 (45,4)	1,60	1,21	2,13	
	5 ou mais	163/294 (55,4%)	2,26	1,63	3,13	
Nº de exames de CCS ≥ 200.000 células/mL nos três meses antes secagem	0 ³	97/ 531 (18,3)				0,071
	1	89/ 435 (20,5)	0,95	0,67	1,34	
	2	159/ 446 (35,7)	1,61	0,99	2,60	
	3	505/1043 (48,4)	1,65	0,97	2,81	
Média geométrica da CCS nos três meses anteriores à secagem (x 1.000 células/mL)	<200 ³	180/925 (19,5%)				<0,0001
	200 a 399	199/604 (32,9%)	1,35	0,89	2,05	
	400 a 799	224/513 (43,7%)	1,81	1,11	2,97	
	800 a 1.599	173/307 (56,4%)	2,93	1,73	4,99	
	≥ 1.600	74/106 (69,8%)	5,33	2,77	10,38	

¹ Frequências observadas de lactações que iniciaram com mastite subclínica após o parto/total de lactações.

² Razão de chances (Odds ratio).

³ Categorias de referência.

Tabela 3. Chance de novo caso (NC) de mastite subclínica através do período seco. Frequências observadas, razão de chances (OR) e limites do intervalo de confiança (IC 95%)

Variáveis Preditoras	Categorias	NC/Total (%) ¹	OR ²	2,5%	97,5%	Valor p
Estação do parto	Seca ³	83/465 (18,1)				<0,05
	Chuva	69/264 (26,1)	1,68	1,13	2,50	
Ordem de lactação	2 ³	89/483 (18,4)				<0,05
	3	41/184 (22,3)	1,38	0,87	2,15	
	4 ou mais	22/62 (35,5)	2,40	1,27	4,46	
Nº de exames de CCS ≥ 200.000 células/mL nos três meses antes secagem	0 ³	97/531 (18,3)				<0,01
	1	33/143 (23,1)	1,25	0,77	2,00	
	2	22/55 (40,0)	2,91	1,52	5,50	

¹ NC = frequências observadas de novos casos (lactações que iniciaram com mastite subclínica após o parto/ lactações que encerraram sadias antes do parto avaliado)

² Razão de chances (Odds ratio).

³ Categorias de referência.

Tabela 4. Modelo para chance de cura de mastite subclínica através do período seco. Frequências observadas, razão de chances (OR) e limites do intervalo de confiança (IC 95%)

Variáveis	Categorias	Curada/ Total (%) ¹	OR ²	2,5%	97,5%	Valor p
Estação secagem	Chuvas ³	388/704 (55,1)				<0,001
	Seca	640/1,022 (62,6)	1,50	1,21	1,86	
Estação partição	Chuvas ³	344/655 (52,5)				<0,0001
	Seca	684/1,071 (63,9)	1,62	1,30	2,01	
Ordem de lactação	5 ou mais ³	122/270 (45,2)				<0,001
	4	181/350 (51,7)	1,21	0,85	1,73	
	3	379/610 (62,1)	1,71	1,22	2,39	
	2	346/496 (69,8)	1,97	1,37	2,83	
Nº de exames de CCS ≥ 200.000 células/mL nos três meses antes secagem	3 ³	538/1.043 (51,6)				0,071
	2	254/391 (65,0)	1,07	0,78	1,45	
	1	236/292 (80,8)	1,78	1,07	3,01	
Média geométrica da CCS nos três meses anteriores à secagem (x 1.000 células/mL)	≥ 1.600 ³	32/106 (30,2)				<0,0001
	800 a 1.599	134/307 (43,6)	1,86	1,13	3,13	
	400 a 799	282/498 (56,6)	3,16	1,94	5,27	
	200 a 399	360/543 (66,3)	4,14	2,45	7,13	
	< 200	220/272 (80,9)	6,41	3,17	13,15	

¹ Frequências observadas de cura (lactações que iniciaram sem mastite subclínica após o parto/ lactações que encerraram com mastite subclínica antes do parto avaliado)

² Razão de chances (Odds ratio).

³ Categorias de referência.

CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A adoção de tecnologia nas fazendas leiteiras está acelerando com profundas implicações em como o gado é alojado, gerenciado e ordenhado. Equipamentos de ordenha informatizados, com sensores em linha para determinar fluxo de leite, tempo de ordenha, condutividade elétrica do leite, monitores de atividade para detecção de estro já são realidade no Brasil há algum tempo e algumas propriedades (minorias) exploram bem estas ferramentas.

Os avanços da ciência na área de biotecnologia que incluem estudos sobre genômica e proteômica irão ajudar a entender melhor sobre o entendimento da mastite e a interação dos microrganismos com a glândula mamária. Muito será elucidado e alguns conceitos sobre infecção da glândula mamária baseados nos postulados de Koch poderão ser revistos.

Por outro lado, no Brasil, existe uma grande quantidade de propriedades avançando em produção diária e média por vaca e que sequer realizam exames de CCS em suas vacas. Outros realizam, mas não conseguem avaliar a dinâmica da mastite subclínica de um mês para o outro. Alguns laboratórios da Rede Brasileira de Qualidade do Leite emitem relatórios mais elaborados com dados acumulados por vaca para as fazendas, porém outros não possuem ou não fornecem estas ferramentas. Laboratórios especializados em microbiologia para diagnóstico de mastite e acessíveis às propriedades são poucos.

Se a mastite não for abordada de forma estratégica no Brasil com o envolvimento dos produtores, veterinários de campo, laboratórios de referência, centros de pesquisa, universidades e governo levaremos muito tempo, ou nunca alcançaremos uma condição minimamente parecida com países desenvolvidos como, para citar apenas dois exemplos, o Canadá e a Finlândia.

Nestes países foram criados bancos de dados nacionais de amostras de leite para identificação de patógenos de mastite que contribuíram de forma colaborativa para diversas pesquisas realizadas por grupos distintos de pesquisadores. Um destaque para o caso

Finlandês onde uma legislação nacional foi alterada e o rigor com o uso de antibióticos foi aumentado com a ajuda de pesquisas, baseadas em uma robusta rede de informação, que demonstraram que o uso de antibióticos em animais crônicos não resolveria a doença, mas poderia trazer problemas à saúde pública através de seleção de bactérias super-resistentes.

Os estudos observacionais de longo prazo baseados na CCS podem ajudar a compreender melhor a dinâmica da mastite subclínica nos rebanhos pela possibilidade de estudar uma população maior, pelo tempo de acompanhamento dos resultados e pela análise prática dos desfechos. Isto é possível devido ao baixo custo dos exames, a facilidade de coleta e à relativa boa adoção por parte das propriedades. É necessário, portanto utilizar ferramentas estatísticas como, por exemplo, pareamento de grupos, estratificação de amostras e análise multivariada para minimizar o impacto do viés de confusão neste tipo de estudo.

O maior desafio encontrado neste estudo foi a obtenção final dos dados. Se por um lado os dados de CCS para amostra composta de vaca são fáceis de serem obtidos por laudos do laboratório, levantar os dados zootécnicos de muitos animais em propriedades distintas torna-se um desafio. Diferentes formas de armazenamento destes registros nas propriedades, ora por diferentes softwares utilizados, ora por coleta de dados em registros em papel demanda tempo para organização e análise dos dados. Muitos dados acabam se perdendo por inconsistência ou por algum dado perdido que impossibilita o atendimento dos critérios. Quase 19,0% de possíveis lactações a serem avaliadas foram perdidas por estes motivos.

As avaliações das taxas de cura e novos casos de mastite subclínica foram realizados apenas com os dados de CCS do conjunto de leite dos quatro tetos, por ser mais prático, barato e fácil de ser obtido pelas propriedades, mas devem ser analisados com cautela uma vez que não representam o “status” microbiológico da vaca. A identificação microbiológica é parte essencial de programas de controle de mastite. No entanto estratificamos os valores de média geométrica em categorias que incluem não só o ponto de corte usual de CCS

frequentemente utilizado para indicar mastite subclínica, mas também valores bem acima deste e que são frequentemente encontrados nas propriedades. As comparações em nosso estudo são, portanto baseadas na ocorrência ou remissão de sintoma (CCS) ao nível da vaca.

Os estudos de incidência, cura e impacto da mastite na produção baseados em patógeno x quarto mamário são extremamente importantes. No entanto a complexidade da doença e a possibilidade de infecções mistas em um ou mais de um quarto mamário (com alguma frequência todos os quatro quartos mamários) e as dificuldades operacionais (e de custo) para acompanhar estes estudos, faz com que muitas vezes os resultados observados tenham pouca aplicação prática.

Soma-se a isto o percentual de amostras em cultura microbiológica de mastite com resultados negativos e contaminadas e as particularidades e limitações nos métodos de cultura em placa observados em diferentes estudos e concluímos que há um grande caminho a percorrer. As técnicas moleculares vêm a cada dia facilitando o entendimento desta complexa doença, mas precisam ser aprimoradas de forma que possam auxiliar as propriedades.