MELINA MELO BARCELOS

Uso de caseína hidrolisada para secagem de quartos mamários com mastite crônica durante a lactação

Pirassununga

2019

MELINA MELO BARCELOS

Uso de caseína hidrolisada para secagem de quartos mamários com mastite crônica durante a lactação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos

De acordo:

Orientador

Pirassununga
2019

VERSÃO CORRIGIDA

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3820
FMVZ

Barcelos, Melina Melo
Uso de caseína hidrolisada para secagem de quartos mamários com mastite crônica durante a lactação / Melina Melo Barcelos. – 2019.
72 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos.

1. Mastite bovina. 2. Infecções intramamárias crônicas. 3. Mastite recidivante. 4. Tratamento intramamário. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Sandra Regina Toledo, CRB-8/8146, da FMVZ/USP.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Uso de caseína hidrolisada na secagem durante a lactação de quartos mamários com mastite crônica", protocolada sob o CEUA nº 1876290119 (ID 006226), sob a responsabilidade de **Marcos Veiga dos Santos** *e equipe; Melina Melo Barcelos* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 07/03/2019.

We certify that the proposal "Use of casein hydrolyzate for drying-off mammary quarters with chronic mastitis during lactation", utilizing 60 Bovines (60 females), protocol number CEUA 1876290119 (ID 006226), under the responsibility of **Marcos Veiga dos Santos** *and team; Melina Melo Barcelos* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/07/2019.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 02/2019 a 06/2019 Área: Nutrição E Produção Animal

Origem:	Animais de proprietários						
Espécie:	Bovinos	sexo:	Fêmeas	idade:	2 a 8 anos	N:	60
Linhagem:	Holandesa/Girolando			Peso:	450 a 650 kg		

Local do experimento: O experimento será realizado em quatro fazendas leiteiras em São Paulo (Santa Rita do Passa Quatro, Martinópolis, Cássia dos Coqueiros e Campo Limpo Paulista)

São Paulo, 07 de março de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BARCELOS, Melina Melo

Título: Uso de caseína hidrolisada para secagem de quartos mamários com mastite crônica durante a lactação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr._____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr._____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

As pessoas mais importantes da minha vida, que sonharam todos os sonhos comigo, que vibraram a cada etapa concluída e que me deram sempre a certeza de que, onde quer que eu estivesse, nunca estaria sozinha, aos meus queridos pais, Mário e Vera.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Deus por todas as preces atendidas até aqui, por me conceder força e discernimento durante essa etapa. Agradeço também pela vida dos animais, sem os quais seria impossível concluir a pesquisa e por quem carrego amor e respeito imenso.

Aos meus pais, Vera Lucia e Mário Antonio, por serem meu ponto de apoio em todos os momentos e por estarem sempre ao meu lado mesmo quando a distância impedia que nos abraços acontecessem. Sou grata por todo apoio, amor e confiança que recebi e fizeram com que eu pudesse evoluir pessoal e profissionalmente. Foi através dos grandes exemplos que tive em casa que lutei para ser cada vez melhor, por vocês e para vocês!

Ao meu irmão, José Mario, que foi o grande responsável por eu sair da zona de conforto e enfrentar a graduação longe de casa. Foi me espalhando em você que enfrentei grandes batalhas para crescer e me tornar uma profissional qualificada e em constante aprendizado.

Ao meu namorado e companheiro, Gabriel, por toda paciência e amor. Por me ouvir e aconselhar quando as coisas não iam tão bem e por superarmos juntos a distância que esteve por tanto tempo entre nós. Me tornei alguém melhor depois que você entrou na minha vida!

Aos meus familiares, Vó Biliu, Vô Ciço, Vó Rita, Vô Dingo, tios e primos, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim. Agradeço também Tio Nilo, Tia Soeli, Luciana, Foguinho, Junior e Kátia que foram muitas vezes meu porto seguro e meu refúgio. Devo grande parte das minhas conquistas ao apoio que recebi, não permitindo que eu desistisse nunca. Meu amor por vocês é gigante.

Ao meu orientador, Marcos Veiga dos Santos, por confiar e não desistir de mim. Foram nossas conversas que me fizeram entender o verdadeiro significado da Pós-Graduação e a importância da pesquisa, possibilitando o meu crescimento profissional.

À empresa Ourofino® Saúde Animal por ceder os produtos utilizados durante o experimento.

Ao pós-doutorando, Juliano Leonel Gonçalves, quem tive o prazer de auxiliar durante o projeto de doutorado e que foi um grande professor sobre escrita cientifica e sobre a vida. Sou grata pela amizade sincera e pelos laços criados durante esse período, que permanecem até os dias de hoje.

Aos amigos que fiz no Laboratório Qualileite (FMVZ/USP). Aos que já foram, aos que chegaram depois e aos que permaneceram todo esse período. Foram cinco anos intensos, onde

cada um doava um pouco de si e recebia um pouco do outro. Formamos uma família, dessas que brigam de vez em quando, mas que cinco minutos depois já está tudo bem. Vocês foram essenciais para tornar os dias mais leves e sou muito grata por ter encontrado tanta gente incrível pelo caminho.

Pontuando as grandes pessoas que tive a honra de dividir a vida dentro e fora do Qualileite, agradeço ao doutor Tiago Tomazi, um profissional incrível e apaixonado pelo que faz. Com um coração gigante e sempre com uma palavra de apoio, foi um grande professor da vida. Agradeço também Ana Carolina Tomazi, que assim como o Tiago tem um coração gigante e um jeito extremamente doce de lidar com a vida.

Ao doutor Cristian Marlon de Magalhaes Rodrigues Martins, o zootecnista mais incrível desse Brasil, com uma inteligência excepcional. Nunca hesitou em ajudar, em ensinar a buscar saídas e estimular o pensamento crítico. É muito mais do que um exemplo profissional, é um exemplo de caráter.

À doutoranda Renata de Freitas Leite, minha vizinha de baia com quem compartilhei momentos incríveis. A doçura e a leveza com que conduz projetos pessoais e profissionais inspiram aos que conseguem acompanhar de perto suas atitudes. Obrigada pela vida compartilhada e por tanto carinho.

À doutoranda Bruna Gomes Alves que sempre esteve disposta a ajudar nos trabalhos de correção de textos de qualquer um que precisava. Agradeço a paciência e crises de riso sem motivos. Conviver com você me ensinou grandes lições para vida, pelo qual sou extremamente grata.

À mestre Danielle Martins da Fonseca que foi sempre uma grande amiga, guerreira que nunca desiste de correr atrás das coisas que acredita. Foi minha mãe e muitas vezes minha filha durante esse período, mas foi acima de tudo uma grande mulher que me enche de orgulho. Que seu caminho seja sempre luz, assim como você iluminou o meu.

À mestre Camylla Pedrosa Monteiro com quem dividi grande parte da minha vida dentro e fora da universidade. A amiga que sempre esteve presente, que topava qualquer coisa e por quem eu tenho um apreço imenso. Dividimos medos, angústias e dúvidas sobre o futuro, mas sempre tivemos a certeza de que teríamos uma a outra. Tenho certeza que sua dedicação e garra a levará para grandes conquistas.

Ao meu amigo Gustavo Freu, com quem dividi todos os dias do mestrado. Estramos juntos e caminhamos sempre lado a lado. Erramos e aprendemos sempre com o auxílio um do outro. Foi incrível dividir esse período com alguém tão iluminado e profissional.

À mestranda Brunna de Mattos Granja, que chegou depois e conseguiu ocupar um espaço especial no coração de todo mundo. Foram muitas risadas, momentos de descontração que tornaram os dias mais fáceis e a vida mais leve.

Ao mestrando Breno Luis Garcia, que foi um grande parceiro durante a graduação e um parceiro melhor ainda durante o mestrado. Nossas conversas filosóficas e desabafos tornaram o período do mestrado mais leve e minha admiração por você ainda maior. Tenho muito orgulho do excelente profissional que você se tornou e de ter visto toda sua evolução desde o início dessa jornada.

À amiga Larissa Martins, minha companheira desde a época da iniciação cientifica, com quem eu vivi histórias incríveis tanto dentro do laboratório quanto fora. Uma pessoa cheia de determinação, que luta sem cansar pelas coisas que acredita. Meu coração enche de orgulho e carinho quando acompanho suas vitórias e tenho certeza que muitas ainda estão por vir.

Ao técnico Carlos Eduardo Fidelis que foi muito mais do que o responsável pelas culturas microbiológicas do projeto. Um grande amigo, que sempre me ouviu quando eu precisei desabafar e sempre esteve disposto a me ajudar seja qual fosse o assunto. Meu mestrado foi muito mais feliz com você do meu lado.

À Lorena de Nicolo que aceitou o desafio de dividir a casa e a vida comigo durante o mestrado. Foram muitas conversas especiais, que ensinavam a ver a vida com outros olhos.

Aos estagiários que passaram durante esse período, em especial Letícia Martins, Luiza Ziegelmeyer, Márcia Melo e Juliana Bertolacini, que permaneceram presentes mesmo depois da temporada no laboratório e por quem tenho um carinho e amor imenso.

Ao Gustavo Freu, Eduardo Pinheiro e Felipe Cruciol que não mediram esforços para me auxiliar a encontrar propriedades dispostas a participar do projeto.

Aos gestores das fazendas participantes, por abrir as portas das propriedades e confiar no nosso trabalho. Agradeço também aos funcionários e amigos que foram essenciais durante o período em que o estudo foi conduzido, em especial Dona Raimunda, Victoria Caproni e Josué Teófilo que me acolheram e me fizeram sentir como se fosse da família.

Às amigas da graduação, Bianca Marchesini, Bruna Mutt e Evelize Poloni, que permaneceram presentes e me apoiando durante o mestrado. Foram cinco anos bem vividos e acompanhados de pessoas incríveis! É muito bom saber que a distância não é capaz de destruir os laços firmados durante esse período.

Aos amigos que fiz dentro da Pós-Graduação, em especial Guilherme Gomes, o ser humano mais estressado do mundo que foi meu parceiro em muitos momentos e sempre esteve disposto a ajudar no que fosse possível.

Aos amigos que fiz fora da Pós-Graduação, em especial Felipe Bertin, Kaique Pinto, Everson Ferraz e Ian Labrego, pessoas de fora da veterinária que sempre tiveram um sorriso no rosto e muito para ensinar. Uns com mais, outros com menos tempo de convivência, mas todos com uma importância indescritível.

Aos amigos que fiz durante o estágio obrigatório, Morivaldo, Seu Luca, Tina, Ludmila, Dona Cida e Lucas que continuaram presentes, cuidando e me amparando sempre que preciso. Sou grata por poder dizer que tenho uma nova família em Araras. Agradeço também minhas duas irmãs de estágio, com quem dividi o quarto e a vida: Mayara Oliveira e Isabella Pimenta, dois seres de luz que tornaram meus dias melhores durante esse período.

Aos Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL), Laboratório Multiusuário de Nutrição Animal e Bromatologia e Laboratório de Genômica Funcional e aos técnicos responsáveis pelo auxílio durante as análises.

Aos professores do Departamento de Nutrição e Produção Animal (FMVZ/USP) Francisco Rennó, Paulo Henrique Mazza, Augusto Gameiro e Júlio Balieiro, além dos professores Ed Hoffmann e Eneiva Carla Celeghini do Departamento de Reprodução Animal (FMVZ/USP) que ministraram disciplinas de forma exemplar, deixando evidente o amor pela educação.

Aos funcionários do Departamento de Nutrição e Produção Animal (FMVZ/USP) João Paulo, Fábia, Alessandra e Dona Lúcia por serem sempre prestativos e atenciosos, tornando a vida dos alunos menos pesada. Agradeço também Dona Edna e Cecília, por manterem os nossos ambientes de trabalho e estudo sempre limpos e organizados, trabalhando sempre de bom humor e donas do abraço matinal mais gostoso.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP), onde tive a honra de realizar minha graduação e a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FZEA/USP) pelo corpo docente preparado e qualificado, essencial na formação de qualquer profissional.

A todos que contribuíram para que o projeto fosse realizado e não foram citados pontualmente aqui.

Nada disso teria sido possível sem vocês. Muito obrigada!

“Às vezes sentimos que aquilo que fazemos é apenas uma gota no oceano,
mas o oceano seria menor se lhe faltara uma gota”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

BARCELOS, M. M. **Uso de caseína hidrolisada para secagem de quartos mamários com mastite crônica durante a lactação** [Use of casein hydrolyzate for drying off mammary quarters with chronic mastitis during lactation]. 2019. 72 f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de uma ou três infusões intramamárias de caseína hidrolisada (CH) para secagem de quartos mamários (QM) de vacas acometidas por mastite crônica durante a lactação. Foram selecionadas 60 vacas com mastite crônica de sete rebanhos leiteiros de São Paulo (n=5) e Minas Gerais (n=2), que atenderam aos seguintes critérios: apresentaram ≥3 casos de mastite clínica no mesmo QM durante a lactação ou contagem de células somáticas (CCS) > 1.000.000 células/mL por mais de dois meses consecutivos. As vacas selecionadas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos de tratamento: três infusões intramamárias de CH (100mg, 50 mL por infusão), com intervalo de 24 horas (n=30) ou infusão intramamária única de CH (300mg, 50 mL) (n=30), ambas seguidas de infusão de selante intramamário no dia 7 após o tratamento. Amostras de leite dos QM afetados foram coletadas antes da primeira infusão intramamária de CH para cultura microbiológica, CCS e composição. Nos dias 4 e 7 após as infusões de CH foram coletadas amostras de leite para cultura microbiológica e realizada avaliação da involução do tecido mamário. A produção de leite foi medida no dia anterior à infusão de CH e no dia 7. Nos dias 30, 60 e 90 foram coletadas amostras compostas dos demais QM funcionais para determinação da CCS. Onze vacas foram avaliadas quanto a) a prevalência de microrganismos causadores de mastite crônica; b) a involução do tecido mamário antes da infusão; c) produção de leite após a secagem do QM; d) CCS composta dos QM funcionais; e e) produção de leite, risco de cura bacteriológica após o parto. Do total de amostras coletadas antes das infusões intramamárias com CH (n = 60), 17 (28,33%) apresentaram cultura negativa e *Streptococcus uberis* foi o patógeno com maior frequência de isolamento (n=17, 28,33%), seguido por *S. aureus* (n = 6; 10%). Dentre os QM com resultados de cultura positivas (n=43), 23,25% apresentaram cura microbiológica no dia 7 após o início do tratamento, sendo seis QM tratados com três infusões e quatro tratados com infusão única. Houve efeito de tratamento e dia de avaliação sobre a involução do QM para o tratamento com infusão única. No entanto, o protocolo de infusão intramamária de CH não afetou as médias de produção de leite e CCS composta dos QM não tratados. Após o parto, as onze vacas avaliadas retornaram à produção de leite e apresentaram cura microbiológica, e quatro QM apresentaram nova infecção por *Staphylococcus chromogenes* (n=2), *Enterococcus faecalis* (n=1) e

Streptococcus dysgalactiae (n=1). A CCS dos QM foi reduzida em ambos protocolos de infusão de CH, mas a CCS foi menor nos QM tratados com infusão única do que nos tratados com três infusões. A infusão única de CH foi mais eficiente em acelerar a involução da glândula mamária e reduzir a CCS do QM tratado após o parto.

Palavras-chave: Mastite bovina. Infecções intramamárias crônicas. Mastite recidivante. Tratamento intramamário.

ABSTRACT

BARCELOS, M. M**. Use of casein hydrolyzate for drying-off mammary quarters with chronic mastitis during lactation.** [Uso de caseína hidrolisada para secagem de quartos mamários com mastite crônica durante a lactação] 2019. 72f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

The aim of this study was to evaluate the efficacy of two casein hydrolyzate (CH) infusion protocols on drying off mammary quarters (MQ) affected by chronic mastitis during lactation. Sixty cows affected by chronic mastitis were selected from seven dairy herds located in São Paulo (n = 5) and Minas Gerais (n = 2). As inclusion criteria, we considered as affected MQ those that presented 3 or more cases of clinical mastitis or somatic cell count (SCC) > 1,000,000 cells/mL for 2 or more consecutive months before clinical case. Cows were randomized into two treatment groups: a) three intramammary infusions of CH (100 mg, 50 mL per infusion), with a 24-hours interval (n = 30) or b) single intramammary infusion of CH (300 mg, 50 mL) 30). Both treatments were followed by internal teat sealant infusion 7 days post-treatment. The following variables were evaluated: a) frequency of isolation of mastitis-causing pathogens; b) mammary tissue involution; c) milk production after MQ drying off; d) SCC of functional MQs; and e) return to milk production, bacteriological cure and inflammatory cure postpartum. Milk Samples were obtained for microbiological culture, SCC and composition analysis before the first intramammary infusion of CH. Milk samples for microbiological culture and the evaluation of mammary tissue involution were done on days 4 and 7 post treatment. Milk production was measured before CH infusion and on day 7. Functional MQ milk samples were collected for SCC determination on days 30, 60 and 90. Eleven cows were evaluated on the return of milk production, microbiological cure and SCC in MQ drying off. There was no significant difference between the groups prior to CH infusions. *Streptococcus uberis* was the most isolated pathogen (n = 43), and 10 of positive MQs (n = 43) presented microbiological cure after treatment, six due to three infusions and four treated with single infusion. Treatment and day effects were observed in the involution of the MQ treated with single infusion. On the other hand, milk production and SCC of untreated quarters were not affected by treatment. In the postpartum evaluation, all samples (n=11) presented microbiological cure, but 4 MQs presented new intramammary infection by *Staphylococcus chromogenes* (n=2), *Enterococcus faecalis* (n=1) and *Streptococcus dysgalactiae* (n=1). The SCC of the MQ postpartum was reduced in both treated groups, with a larger decrease after the single infusion. Single infusion of CH was

more efficient in accelerating mammary gland involution and reducing SCC of the MQ treated postpartum.

Keywords: Bovine mastitis. Chronic intramammary infections. Relapsing mastitis. Intramammary treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de formação de NO e NO_2 para propiciar ambiente bactericida a partir da infusão de CH (Adaptado de Silanikove et al., 2005) 38

Figura 2. Graus de involução correspondente a cada escore 44

Figura 3 - Frequência de escores de involução dos quartos mamários tratados com uma (300mg) ou três infusões (1200 mg/infusão) intramamárias de caseína hidrolisada (CH), de acordo com os dias de avaliação após o tratamento 50

Figura 4 - Médias ajustadas das produções de leite no D0 e D7 das vacas tratadas com uma (300mg) ou três infusões (100 mg/infusão) intramamárias de caseína hidrolisada (CH) 51

Figura 5 - Comparação entre as médias de logCCS composta após o tratamento com caseína hidrolisada 52

Figura 6. Comparação entre as médias de logCCS dos quartos mamários antes do tratamento com CH e após o parto 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação entre escores de CMT e contagem de células somáticas (CCS) 29

Tabela 2. Médias ajustadas de características produtivas das vacas com mastite crônica antes do tratamento com uma (300mg) ou três infusões (100 mg/infusão) intramamárias de caseína hidrolisada (CH) 47

Tabela 3. Médias ajustadas de componentes do leite oriundo dos quartos mamários de vacas com mastite crônica antes do tratamento com uma (300mg) ou três infusões (100 mg/infusão) intramamárias de caseína hidrolisada (CH) 48

Tabela 4. Frequência de isolamentos de patógenos causadores de mastite em vacas com mastite crônica antes das infusões de caseína hidrolisada pela metodologia MALDI-TOF MS 49

Tabela 5. Frequência de patógenos que apresentaram cura microbiológica frente a aplicações de caseína hidrolisada 49

Tabela 6. Distribuição de quartos mamários que apresentaram cura microbiológica nas amostras analisadas após o parto 53

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

AINE: Anti-inflamatórios Não Esteroidais

AP-P-P: Ativador de Plasminogênio-Plasminogênio-Plasmina

CCS: Contagem de Células Somáticas

CDL: Contagem Diferencial de Leucócitos

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CH: Caseína Hidrolisada

CM: Cultura Microbiológica

CMT: *California Mastitis Test*

CONCEA: Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal

D0: Dia Zero

D4: Dia Quatro

D7: Dia Sete

DEL: Dias em lactação

EPM: Erro Padrão da Média

ESALQ: Escola Superior de Agronomia "Luiz de Queiroz"

ESD: Extrato Seco Desengordurado

EUA: Estados unidos da América

FMVZ: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

H_2O_2: Peróxido de Hidrogênio

HCl: Ácido Clorídrico

IFN-g: Interferon G

IgG: Imunoglobulina G

IL-1: Interleucina 1

K^+: Íons de Potássio

Kg: Quilograma

logCCS: Logaritmo de Contagem de Células Somáticas

LPO: Lactoperoxidase

LTB4: Leucotrieno B4

LXA4: Lipoxina A4

MALDI-TOF MS: Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção à Laser Assistida por Matriz

MC: Mastite Clínica

mg: Miligrama

mL: Mililitro

MSC: Mastite Subclínica

Na^+: Íons de Sódio

NaOH: Hidróxido de Sódio

NO: Monóxido de Nitrogênio

NO_2: Dióxido de Nitrogênio

$O_2^{-\cdot}$: Íons Superóxido

PGFα: Prostaglandina F2α

pH: Potencial Hidrogeniônico

SCN: *Staphylococcus* coagulase negativa

SIT: Selante Interno de Teto

ST: Sólidos Totais

TJ: *Tight Junctions*

USP: Universidade de São Paulo

XO: Xantina Oxidase

°C: Graus Celsius

µm: micrometro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 21
2. REVISÃO DE LITERATURA 23
2.1. CLASSIFICAÇÃO DA MASTITE BOVINA 23
2.1.1. Mastite contagiosa × mastite ambiental 24
2.1.2. Mastite clínica 25
2.1.3. Mastite subclínica 27
2.1.4. Mastite crônica 29
2.2. COMPOSIÇÃO DO LEITE COM MASTITE 31
2.3. DIAGNÓSTICO DOS PATÓGENOS CAUSADORES DE MASTITE 33
2.4. SECAGEM DE QUARTOS MAMÁRIOS 34
2.4.1. Caseína hidrolisada 35
3. MATERIAL E MÉTODOS 39
3.1. SELEÇÃO DAS FAZENDAS E DOS ANIMAIS 39
3.2. PREPARO DA CASEÍNA HIDROLISADA 40
3.3. TRATAMENTOS INTRAMAMÁRIOS COM CASEÍNA HIDROLIZADA 41
3.4. COLETA DE AMOSTRAS DE LEITE ANTES DAS INFUSÕES COM CH 41
3.4.1. Cultura microbiológica e identificação microbiana por MALDI-TOF MS 41
3.4.2. CCS e composição do leite 42
3.5. INVOLUCÃO DOS QUARTOS MAMÁRIOS 43
3.6. PRODUÇÃO DE LEITE 44
3.7. COLETA DE AMOSTRAS E AVALIAÇÕES APÓS OS TRATAMENTOS 45
3.7.1. CCS dos quartos não tratados 45
3.7.2. Avaliações após o parto 45
3.8. ANÁLISE ESTATISTICA 45
4. RESULTADOS 47
4.1. CARACTERÍSTICAS DAS VACAS SELECIONADAS 47
4.2. QUARTOS MAMÁRIOS INCLUÍDOS NO ESTUDO 47
4.4. AVALIAÇÃO DA INVOLUÇÃO DA GLÂNDULA MAMÁRIA 49
4.5. PRODUÇÃO DE LEITE 50
4.6. CCS DOS QUARTOS NÃO TRATADOS 51
4.7. RETORNO À LACTAÇÃO, CURA MICROBIOLÓGICA E CCS PÓS PARTO 52

5. DISCUSSÃO 54
5.1. VACAS E QUARTOS MAMÁRIOS INCLUÍDOS NO ESTUDO 54
5.2. FRÊQUENCIA DE PATOGENOS CAUSADORES DE MASTITE CRÔNICA 55
5.3. AVALIAÇÃO DA INVOLUÇÃO DOS QUARTOS MAMÁRIOS 56
5.4. PRODUÇÃO DE LEITE 56
5.5. CCS DOS QUARTOS MAMÁRIOS FUNCIONAIS 57
5.6. CURA MICROBIOLÓGICA E CCS PÓS PARTO 57
6. CONCLUSÃO 59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 60

1. INTRODUÇÃO

A mastite é a principal doença que acomete rebanhos leiteiros (RUEGG, 2017), gerando grandes perdas econômicas, principalmente pela diminuição da produção de leite decorrente das alterações no tecido secretor, descarte de leite com resíduos de antimicrobianos e gastos com medicamentos (HALASA et al., 2007; GONÇALVES, et al., 2018). A mastite pode ser classificada de acordo com a forma de manifestação em mastite clínica (MC), quando há sinais inflamatórios visíveis e/ou alteração no leite, ou subclínica (MSC) quando não há sinais clínicos, mas a resposta inflamatória pode ser detectada por alterações na composição do leite identificadas por testes laboratoriais, como a contagem de células somáticas (CCS) (ERSKINE, 1992).

Os critérios para classificar infecções intramamárias crônicas são a longa duração das alterações do leite, manutenção de CCS > 200.000 células/mL por >2 meses consecutivos e ocorrência de casos repetidos de MC (CARDOZO et al., 2015). O desafio para resolução dessas infecções aumenta proporcionalmente ao aumento da CCS, já que vacas que apresentam CCS > 1.000.000 células/mL por dois meses consecutivos têm menor taxa de cura dos casos de mastite (CARDOZO et al., 2015). Além disso, a mastite crônica aumenta o risco de fibrose dos tecidos mamários acometidos, o que pode ser acompanhado por perda da capacidade de produção de leite e persistência da infecção após o período seco (HILLERTON, 1996). Os patógenos causadores de infecções intramamárias crônicas são, geralmente, resistentes à terapia antimicrobiana, o que torna as vacas afetadas reservatórios de agentes causadores de mastite como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (THO SEETH et al., 2016).

A baixa eficácia no tratamento de casos de mastite crônica incentivou o estudo de estratégias de manejo alternativas. A estratégia mais cara e rápida para casos de mastite crônica é o descarte das vacas que não respondem aos tratamentos. No entanto, o custo para aquisição de animais de reposição é maior do que o obtido com o descarte. Quando a vaca apresenta mastite crônica em um único quarto mamário, pode ser adotada outra estratégia de manejo como a secagem permanente do quarto infectado, que tem objetivo de eliminar os reservatórios de agentes causadores de mastite, além de aumentar a vida produtiva da vaca no rebanho, mesmo que com apenas três quartos mamários funcionais (MIDDLETON; FOX, 2001).

Entretanto, como os quartos mamários com mastite crônica podem não retornar à produção de leite na lactação subsequente quando submetidos à secagem com infusões intramamárias de iodo (MIDDLETON e FOX, 2001), foram avaliadas medidas alternativas

menos agressivas. Os métodos de manejo não-antimicrobianos como hidrogéis de quitosana (LANCTÔT et al., 2017), concentrado de plaquetas (LANGE-CONSIGLIO et al., 2014) e caseína hidrolisada (CH; SHAMAY et al., 2002) apresentaram resultados benéficos no tratamento de casos crônicos de mastite, possibilitando aumento na taxa de cura dessas infecções.

A busca por métodos alternativos a utilização de antimicrobianos está principalmente relacionada ao aumento da resistência das bactérias aos antimicrobianos ocasionada pelo uso não racional dos antimicrobianos. Esse fato torna-se evidente quando se observa que as bactérias isoladas de rebanhos orgânicos são mais sensíveis aos antimicrobianos do que as encontradas em rebanhos convencionais (TIKOFSKY et al., 2003; POL; RUEGG, 2007). Tal fato gera crescente pressão para reduzir o uso de antimicrobianos em animais de produção, apesar dos antimicrobianos ainda serem ferramentas essenciais nos programas de controle de mastite (MIDDLETON et al., 2014).

O uso de infusão intramamária de CH foi avaliado inicialmente na secagem de vacas ao final da lactação e, posteriormente na secagem de quartos mamários com mastite crônica durante a lactação, já que a infusão de CH estimula processo similar ao da involução mamária que ocorre no final da lactação, porém de maneira mais rápida do que a involução natural (SHAMAY et al, 2003; THO SEETH et al., 2016; LEITNER et al, 2017).

Apesar de alguns estudos prévios indicarem a eficácia da infusão intramamária de CH para secagem de quartos mamários com mastite crônica, ainda não foram avaliados os efeitos da frequência de infusão sobre a involução dos quartos mamários tratados. Alguns estudos utilizam infusões intramamárias múltiplas de CH, o que além de dificultar o manejo também podem aumentar o risco de lesão ao canal do teto e de novas infecções intramamárias. Assim, a hipótese do presente estudo foi que a infusão intramamária de 300mg de caseína hidrolisada em tratamento único (50mL) apresenta efeito similar a três infusões intramamárias de 100mg, a cada 24 horas, sobre a involução de quartos mamários com mastite crônica.

Nesse contexto, o presente estudo investigou a eficácia de uma (300 mg/50 mL) ou três infusões intramamárias (100 mg/50 mL) de caseína hidrolisada (CH) com intervalo de 24 horas, em quartos mamários acometidos por mastite crônica durante a lactação. Para tanto foram avaliados o isolamento de microrganismos causadores de mastite, a involução do tecido mamário, a CCS composta dos quartos funcionais, o retorno da produção leiteira após o parto, a cura bacteriológica e a cura da inflamação dos quartos mamários após o parto. Os objetivos específicos foram avaliar o efeito da frequência de infusão de CH em quartos mamários acometidos por mastite crônica sobre: a) isolamento de microrganismos causadores de mastite;

b) involução do tecido mamário; c) produção de leite após a secagem; d) CCS composta dos quartos funcionais; e) retorno da produção leiteira, cura bacteriológica e cura da inflamação dos quartos mamários após o parto.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CLASSIFICAÇÃO DA MASTITE BOVINA

Mastite é a principal doença que acomete vacas leiteiras (HERTL et al., 2014). É uma doença multifatorial que envolve a tríade animal (hospedeiro) – microrganismo (agente) – ambiente (fatores de risco; OVIEDO-BOYSO et al., 2007). Apesar de ter diversas causas (fungos, algas, leveduras e bactérias), a maioria das causas de mastite são de origem bacteriana. As bactérias invadem a glândula mamária através canal dos tetos, onde se multiplicam e podem colonizar os demais tecidos. A resposta inflamatória na fase inicial da infecção visa eliminar o patógeno causador sem lesionar o tecido mamário da vaca, embora respostas inflamatórias mais agressivas possam causar danos à glândula mamária da vaca (SORDILLO, 2012). Em todo caso, a inflamação do tecido mamário proporciona aumento na contagem de células somáticas (CCS), atribuído principalmente a migração de neutrófilos para combater a infecção (OVIEDO-BOYSO et al., 2007).

Até o início do século XXI, cerca de 80% dos casos de mastite eram causados por cinco espécies de bactérias (*Escherichia coli, Streptococcus uberis, S. aureus, Streptococcus dysgalactiae* e *S. agalactiae)* classificadas como patógenos primários por serem mais patogênicos (BRADLEY, 2002). Com o uso de programas de prevenção contra esses patógenos, agentes secundários, como *Staphylococcus* não *aureus* (ENA), foram descritos como importantes e frequentes causadores de mastite, principalmente na forma subclínica com aumento moderado da CCS (PYORALA; TAPONEN, 2009; SAMPIMON et al., 2010). Um outro patógeno que ganhou importância como causador de mastite foi *Klebsiella* spp., que assim como *E. coli*, é classificado como coliforme. A mastite causada por *Klebsiella* spp. é mais frequente em rebanhos que apresentam CCS de tanque baixa (CCS <250.000 células/mL) e difere da mastite causada por *E. coli* principalmente por apresentar casos clínicos mais graves, baixa resposta à vacinação e escassez de tratamentos eficazes (ERSKINE et al., 2002; SCHUKKEN, et al., 2012).

Além de ser a doença mais prevalente na produção leiteira, a mastite também é a doença com maior custo na pecuária leiteira (HALASA et al., 2007). A determinação das perdas associadas a mastite leva em conta os custos diretos, que são de fácil percepção, e os indiretos. Dentre os custos diretos, estão inclusos honorários com veterinário, medicamentos utilizados, leite descartado durante o período de carência do antimicrobiano e, em alguns casos, custos com a morte do animal, que ocorrem em 0,6% das vacas em lactação (BRADLEY; GREEN, 2001; PETROVSKI; TRAJCEV; BUNESKI, 2006). Já os custos indiretos, que são muitas vezes desconsiderados pela maior dificuldade de mensurá-los, compreendem perdas de produção de leite, diminuição da qualidade do leite, penalizações por parte dos laticínios, secagem prematura das vacas, aspectos de bem-estar animal e outros problemas de saúde associados (PETROVSKI; TRAJCEV; BUNESKI, 2006).

A mastite pode ser classificada de diferentes formas. As principais classificações são em relação ao tipo de transmissão do patógeno causador (contagiosa ou ambiental), a forma de manifestação dos sinais clínicos (clínica ou subclínica) e quanto a duração da infecção (aguda ou crônica; (BRADLEY; GREEN, 2000; PANTOJA; HULLAND; RUEGG, 2009).

2.1.1. Mastite contagiosa × mastite ambiental

De acordo com o tipo de transmissão do patógeno causador, a mastite pode ser classificada em contagiosa ou ambiental (BRADLEY, 2002). Os patógenos contagiosos (*S. aureus, S. agalactiae* e *Mycoplasma* spp.) são microrganismos adaptados à glândula mamária para sua sobrevivência e multiplicação. Esses patógenos assumem caráter de transmissão vaca a vaca, podendo ser transmitidos pelo equipamento de ordenha, por meio das mãos dos ordenhadores, toalhas de uso comum ou teteiras mal higienizadas (RADOSTITS; LESLIE; FETROW, 1994; BRADLEY, 2002; OVIEDO-BOYSO et al., 2007).

Já os patógenos ambientais são invasores oportunistas da glândula mamária, que estabelecem reservatório no meio ambiente. Os principais patógenos ambientais são coliformes (*E. coli, Klebsiella* spp. e *Enterobacter*) e *Streptococcus* ambientais (*S. uberis, Streptococcus dysgalcatiae* e *Enterococcus* spp.; HOGAN; SMITH, 2012). As infecções ambientais geralmente não aumentam a CCS do tanque > 250.000 células/mL, porém, cerca de 85% das infecções por coliformes e 50% das infecções causadas por *Streptococcus* ambientais podem se manifestar como casos clínicos de mastite (HOGAN; SMITH, 2012).

Apesar da mastite ser tradicionalmente classificada em contagiosa e ambiental, Zadoks e Schukken (2006) relataram que, dependendo das condições de manejo e do isolado, algumas estirpes podem adaptar-se e apresentar diferentes formas de transmissão. Assim como *S. aureus*, *S. uberis* também pode apresentar modo de transmissão contagioso. Do mesmo modo, *S. agalactiae*, considerado patógeno contagioso pode, em raras ocasiões, originar-se de fontes ambientais (COBO-ÁNGEL et al., 2018). Estudo mais recente, utilizando rebanhos colombianos, relatou que *S. agalactiae* foi encontrado em 40% dos rebanhos pesquisados e que em 32% e 12% dos rebanhos foi isolado em amostras retais e ambientais, respectivamente, indicando que não é um patógeno intramamário obrigatório (COBO-ÁNGEL et al., 2018).

O modo de transmissão contagioso ou ambiental dos patógenos causadores de mastite deve ser baseado em nível de rebanho para que seja traçada a melhor forma de intervenção e controle dos casos (SCHUKKEN et al., 2012). Isso é possível a partir da análise de dados da CCS, histórico de MC, avaliação dos principais fatores de risco da mastite, além de resultados de cultura microbiológica e análise da tipagem do isolado (SCHUKKEN et al., 2009).

Além dos patógenos classificados como contagiosos ou ambientais, existe um grupo de patógenos isolados da microbiota normal da pele que podem causar mastite como agentes oportunistas (PYORALA; TAPONEN, 2009). Os principais representantes desse grupo são ENA e *Corynebacterium* spp., frequentemente isoladas em casos de mastite e responsáveis por causar moderada CCS (OLIVEIRA; HULLAND; RUEGG, 2013; GONÇALVES et al., 2016).

2.1.2. Mastite clínica

A mastite clínica (MC) pode ser caracterizada pela presença de sinais clínicos visíveis na glândula mamária e/ou no leite, acompanhados ou não por declínio na produção de leite e pelo aumento da temperatura corporal da vaca (HARMON, 1994). O leite de vacas com MC apresenta alterações físicas, químicas, microbiológicas e sensoriais, tornando-o impróprio para consumo humano (BARBANO; MA; SANTOS, 2006).

De acordo com a gravidade, a MC pode ser classificada em leve, moderada e grave. Apesar dessa classificação ser utilizada há muitos anos, as definições de cada grau podem variar. A MC é considerada leve quando apenas o leite apresenta alterações e representa cerca de 50 a 60% dos casos (ROBERSON, 2012). A MC moderada apresenta alteração no leite acompanhada de sinais clínicos de inflamação no quarto mamário como dor, rubor e calor (LAGO et al., 2011) ou alteração no leite seguido apenas de um dos seguintes sinais sistêmicos:

redução dos movimentos ruminais, desidratação, temperatura elevada, aumento da frequência cardíaca ou respiratória. Esses casos representam 10 a 30% dos casos de MC. Vacas com MC grave apresentam alterações no leite, além de pelo menos dois sinais sistêmicos alterados. Esses animais precisam de tratamento imediato, não havendo tempo para esperar o resultado da cultura microbiológica (ROBERSON, 2012). A MC grave é causada principalmente por bactérias classificadas como coliformes, apesar de bactérias gram-positivas também causarem sinais graves (ERSKINE et al., 2002).

Vários fatores interferem na incidência e recorrência da MC. Hertl et al. (2011) relataram que vacas multíparas apresentarm 30% de incidência de MC, enquanto primíparas apresentaram 16,6%. Além disso, multíparas tiveram maior incidência no segundo (10,7%) e terceiro caso (4,4%) quando comparadas as primíparas (3,7% e 1,1%, respectivamente). Outro fator de risco na incidência de MC é o período de lactação. Durante o primeiros 30 dias em lactação (DEL), a taxa de incidência de MC em vacas multíparas e primíparas é cerca de 4,6 e 2,0 vezes, respectivamente, maior do que durante o restante lactação (VAN DEN BORNE et al., 2010; HAMMER; MORTON; KERRISK, 2012). O histórico de MC também é um fator de risco. Oliveira et al. (2015) relataram que vacas que apresentaram um caso de uma mastite no último mês, tiveram cerca de 18 e 20 vezes mais chance de desenvolver o segundo caso de MC, em primiparas e multiparas, respectivamente, quando comparado a vacas que não apresentavam histórico de MC.

Já o número de lactações influencia o tipo de patógenos causadores de mastite encontrados no isolamento bacteriano. Vacas primíparas apresentam maior incidência de *S. uberis* e ENA, e menor incidência de infecções por *S. aureus* em comparação com vacas adultas (MCDOUGALL et al., 2007). Provavelmente isso ocorre pela diferença entre os subtipos de leucócitos de acordo com a idade e pela menor exposição das vacas primíparas durante a ordenha (TANAKA et al., 2008). Apesar de ocorrer em menor incidência, a MC em primíparas afeta negativamente e no longo prazo a saúde do úbere e a produção de leite, aumentando o risco de serem eliminadas precocemente do rebanho, seja por morte ou por descarte (DE VLIEGHER et al., 2012).

As principais estratégias de controle da MC baseiam-se na prevenção com intuito de diminuir a exposição dos tetos aos patógenos. Para bactérias ambientais que necessitam de material orgânico para multiplicação e não vivem por longos períodos na pele do teto, é necessário manter higiene adequada do local onde os animais ficam alojados, e.g., *freestall*, *compost barn* ou sob pastejo (HOGAN; SMITH, 2012). Para os agentes contagiosos, a atenção

deve ser voltada ao manejo de ordenha, uma vez que é quando ocorre a maior transmissão desses patógenos (SANTOS; FONSECA, 2006).

Quando as estratégias de prevenção falham e ocorrem os casos de MC, o tratamento mais utilizado é a base de antimicrobianos, mesmo que as vezes o uso não seja justificado, uma vez que em cerca de 40% dos casos de MC não há isolamento bacteriano quando há manifestação dos sinais clínicos (POL; RUEGG, 2007). Estima-se que a utilização de antimicrobianos no tratamento de MC represente praticamente metade de todos antimicrobianos utilizados em vacas leiteiras (KUIPERS; KOOPS; WEMMENHOVE, 2016; STEVENS et al., 2016). No Brasil, estudo conduzido em vinte propriedades leiteiras registrou o uso de terapia combinada (antimicrobiano intramamário e sistêmico) em 64,4% dos tratamentos de MC. No mesmo estudo, os principais grupos de antimicrobianos utilizados por via intramamária foram cefalosporinas de terceira geração seguida pela combinação de tetraciclina, aminoglicosídeos e polipeptídios. Já na administração sistêmica, os principais princípios ativos utilizados foram fluorquinolonas seguidos das cefalosporinas de quarta geração (TOMAZI, 2017).

Associado ao uso de antimicrobianos, injetáveis ou intramamários, o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) pode auxiliar na diminuição dos sinais clínicos, por inibir os ecasanóides pró-inflamatórios liberados durante a infecção (VANGROENWEGHE et al., 2005; SUOJALA; KAARTINEN; PYÖRÄLÄ, 2013). A administração de meloxicam no tratamento de vacas com MC foi eficaz na diminuição de PGF2α, além de reduzir sinais clínicos (KÖNIGSSON; GUSTAFSSON; KINDAHL, 2002). MCDOUGALL et al. (2016) descreveram que a administração de meloxicam em casos clínicos leves ou moderados influenciam a reprodução das vacas aumentando o número de vacas prenhes até 120 dias após o parto e diminuindo o número de inseminação necessárias para a concepção.

2.1.3. Mastite subclínica

A mastite subclínica (MSC) é caracterizada pelo não aparecimento de alterações visíveis no leite ou no úbere. Porém, ocorre diminuição da produção de leite e alteração na composição, além de aumento significativo da CCS (RUEGG; PANTOJA, 2013). Naturalmente, o leite contém uma quantidade basal de células somáticas. Isso ocorre pelo fato de as células somáticas serem compostas por vários tipos celulares, como leucócitos, neutrófilos e células epiteliais (HARMON, 1994). Quando o animal não apresenta nenhum tipo de inflamação na glândula

mamária, a maior parte das células somáticas são constituídas por leucócitos. Em contrapartida, quando há sinal de inflamação, neutrófilos são recrutados para glândula mamária e passam a ser a maior parte das células somáticas. (HARMON, 1994).

Por esse motivo, a CCS é um dos principais métodos diagnósticos da MSC (SCHUKKEN et al., 2003). Métodos que levam em consideração outros parâmetros inflamatórios (condutividade elétrica, lactose, lactato desidrogenase, proteínas de fase aguda) também são utilizados, porém, em menor escala (PYORALA, 2003; ÅKERSTEDT; PERSSON WALLER; STERNESJÖ, 2007). Quando se utiliza CCS, avaliada a partir da tecnologia de citometria de fluxo, para identificar as vacas que apresentam MSC, deve-se levar em consideração o ponto de corte estabelecido por Dohoo e Leslie (1991), que classifica vacas acima de 200.000 células/mL como infectadas. Esse valor apresenta sensibilidade de 0.726 e especificidade de 0.855 na identificação de vacas com infecção intramamária ou não.

Desse modo, esta metodologia pode apresentar resultados não fidedignos, pois a CCS sofre variações de certas características que não estão necessariamente associadas com a MSC como: raça, paridade e DEL (DÜRR et al., 2008). Tais limitações da CCS podem ser contornadas com metodologias mais especificas como a contagem diferencial de leucócitos (CDL; PILLA et al., 2012; PILLA et al., 2013; GONÇALVES et al., 2017). A CDL, por detectar mudanças nos tipos celulares presentes no leite, tem sido descrita na identificação de processos inflamatórios em vacas com baixa CCS, diferenciando leite de quartos saudáveis daqueles com inflamação precoce ou tardia (PILLA et al., 2012).

Além de métodos mais específicos, métodos mais simples também são usados para mensurar de maneira aproximada a CCS do animal ou do quarto mamário. *California Mastitis Test* (CMT) é um método qualitativo para detecção da CCS de fácil realização na propriedade leiteira (ROSSI et al., 2018). O resultado é obtido a partir da homogeneização de uma amostra de leite e reagente púrpura de bromocresol, em que quanto maior o grau de viscosidade (negativa, traço, 1, 2 e 3), maior a concentração de células somáticas na amostra de leite (Tabela 1; MIDDLETON et al., 2014).

Tabela 1. Relação entre escores de CMT e contagem de células somáticas (CCS)

Escore CMT	**Reação Visível**	**Faixa CCS (x1.000 células/mL)**
Negativo	Mistura líquida – sem evidencia de precipitação	0 – 200
Traço	Ligeiramente precipitado, desaparece com o movimento continuado	150 – 500
1	Precipitação distinta, mas sem tendência à formação de gel	400 – 1.500
2	Mistura engrossa imediatamente e se concentra	800 – 5.000
3	Formação de gel e superfície se torna convexas	> 5.000

Fonte: Adaptado de Ruegg e Reinemann (2002).

Apesar de não demonstrar sinais clínicos, como a MC, o que dificulta a identificação de alguns casos, a prevalência e incidência da MSC é alta. Um estudo conduzido no Brasil, avaliando 8.285 dados de CCS individuas de vacas oriundas de 517 rebanhos leiteiros durante o período de janeiro de 2011 a maio de 2015, encontrou prevalência de 46,4% e incidência de 0,17 novos casos por vaca por mês de risco (BUSANELLO et al., 2017). Além disso, o estudo mostrou que tanto a prevalência quanto a incidência não melhoraram durante o período avaliado, demonstrando a necessidade de estabelecer programas de controle de MSC.

Essa preocupação fundamenta-se nos prejuízos na produção e qualidade do leite ocasionados pela MSC. A diminuição na produção varia entre 0,07 a 1,4 Kg/quarto.ordenha de acordo com o patógeno causador da infecção (GONÇALVES et al., 2018). Assim como a perda de produção, o prejuízo econômico variou de acordo com o patógeno causador entre US$ 0.02–0.43/quarto.ordenha. Nos dois casos, a maior perda ocorreu quando o quarto mamário estava infectado com *Enterococcus* spp., seguido de *S. aureus* (GONÇALVES et al., 2018).

2.1.4. Mastite crônica

Uma vez acometido, o quarto mamário com mastite pode evoluir para cura espontânea ou, na maioria das vezes, para um quadro crônico (OLIVER et al., 2004). Vacas são consideradas cronicamente infectadas quando apresentam CCS > 200.000 células/mL por mais de dois meses (CARDOZO et al., 2015) ou dois ou mais casos de mastite clínica no mesmo quarto (GROHN et al., 2004). As perdas econômicas ocasionadas pela mastite crônica são,

principalmente, pelo dano prolongado no tecido mamário, diminuindo a produção de leite (SHOSHANI et al., 2000).

A diminuição na produção de leite varia de acordo com o número de lactações. Primíparas tem perdas em torno de 5kg de leite por dia, enquanto multíparas apresentam perdas maiores, chegando até 10kg de leite por dia (GRÖHN et al., 2004). A perda de produção faz com que cada caso de mastite crônica custe em torno de R$ 436,00, sendo que há um aumento de R$ 44,00 no custo quando opta-se por tratar a vaca (STEENEVELD; SWINKELS; HOGEVEEN, 2007). Além disso, essas vacas passam a ser fontes de eliminação de bactéria e, consequentemente, fonte de infecção para vacas sadias, resultando em maior taxa de novas infecções no rebanho gerando prejuízos ainda maiores (ZADOKS et al., 2002; SWINKELS; HOGEVEEN; ZADOKS, 2005). Geralmente, a cronicidade da mastite está relacionada a patógenos contagiosos, como *S. aureus* (BOTARO et al., 2015), porém patógenos ambientais como *S. uberis* também têm sido reportados como causador de infecções crônicas (STEENEVELD; SWINKELS; HOGEVEEN, 2007).

As infecções por *S. aureus* elevam a CCS de modo moderado a alto e apresentam-se principalmente na forma subclínica. Gradualmente, esse patógeno pode induzir a substituição do tecido secretor por tecido fibrótico caracterizando a forma crônica da infecção (BOTARO et al., 2015). Alguns fatores como a capacidade de formar biofilme e a ausência de cápsula estão associados a elevada permanência da bactéria na glândula mamária. O biofilme é um complexo multicelular altamente organizado que facilita a aderência e a colonização das bactérias na glândula mamária, além de contribuir para evasão da bactéria da ação do sistema imune do hospedeiro (OLIVEIRA et al., 2006). Além disso, o biofilme maduro atua na recidiva da infecção, liberando células planctônicas das margens para colonizarem outras partes da glândula mamária.

A cápsula de polissacarídeos é responsável por aumentar a virulência de *S. aureus*, embora não esteja presente em todos os isolados bacterianos. Estudo comparando os efeitos de isolados não capsulados isoladas de casos de mastite e com cápsulas tipo 5 e 8, comumente isolados em infecções humanas, revelou que a ausência de cápsula possibilita a permanência da bactéria na glândula mamária. Em contrapartida, bactérias encapsuladas causaram maior inflamação e foram eliminadas mais rapidamente (TUCHSCHERR et al., 2005).

S. uberis são bactérias geralmente associadas ao ambiente, que causam MC ou MSC. Possuem capacidade de se ligar e se internalizar em células epiteliais da glândula mamária através das vias de transdução de sinal e do citoesqueleto das células do hospedeiro, mantendo baixo nível de presença intracelular, como reservatório para infecções persistentes. Diferente

de *S. aureus, S. uberis* não causa dano extenso aparente e destruição das células do hospedeiro (TAMILSELVAM et al., 2006).

Além dos patógenos, alguns fatores intrínsecos à vaca podem estar associados com a cronicidade da infecção, como o elevado número de parições, que aumenta o risco da vaca de desenvolver mastite crônica provavelmente pelo maior número de lesões na glândula mamária com as sucessivas lactações. Além disso, ocorre diminuição dos mecanismos de defesa da glândula mamária conforme a idade da vaca aumenta (BARTLETT et al., 1990; DINGWELL et al., 2004).

A vaca que apresenta mastite crônica tem aumento intermitente da CCS, que se deve principalmente à migração de neutrófilos para combater a infecção. Nesses casos ocorre aumento moderado de leucócitos, quando comparado a processos inflamatórios agudos (SHOSHANI et al., 2000). O acúmulo dos neutrófilos na glândula mamária ocorre pela ação do leucotrieno (LT) B4, quimiotático liberado pelos primeiros neutrófilos a atingir a glândula mamária (SAMUELSSON, 1983; BOUTET et al., 2003). O efeito do LTB4 é contrário ao da lipoxina (LX) A4, responsável por resolver a inflamação (BOUTET et al., 2003). Assim, um desequilíbrio entre LTB4 e LXA4, seja pelo aumento da síntese de LTB4 ou pela diminuição na produção de LXA4, pode ser o responsável pela permanência e acúmulo prolongado dos neutrófilos na glândula mamária, levando a mastite crônica (BOUTET et al., 2003).

A mastite crônica também é pouco responsiva a tratamentos com antimicrobianos, o que aumentam as chances de resistência dos isolados aos antimicrobianos. Isso é ainda mais influenciado quando os antimicrobianos são utilizados de maneira inconsciente. Portanto, é importante intensificar medidas profiláticas com base na gestão, higiene, bem-estar e utilizar terapias alternativas de tratamento e controle (LANGE-CONSIGLIO et al., 2014).

2.2. COMPOSIÇÃO DO LEITE COM MASTITE

A composição do leite apresenta natureza dinâmica. As variações nos compostos do leite podem ser decorrentes de vários fatores como: estágio e número de lactações, frequência de ordenhas diárias, estado nutricional, estações do ano, fatores genéticos e características raciais, além da saúde dos animais e enfermidades do úbere (FOX; MCSWEENEY, 1998). De maneira geral, o aumento da CCS, ocasionado principalmente por casos de mastite, apresenta correlação negativa com o teor de matéria seca do leite. A redução da matéria seca pode variar

de 5 a 10% quando a CCS está alta. Porém, a intensidade da variação muda quando avaliamos os compostos (principalmente gordura, proteína e lactose) separadamente.

A gordura do leite é formada nas células secretoras do úbere, constituída principalmente por triglicerídeos (BLOWEY; EDMONDOSON, 2010), os quais são formados por três ácidos graxos ligados a éster com uma molécula de glicerol. O teor de gordura pode variar de 3 a 5% no leite (KELLY, 2010), mas sendo o componente do leite mais variável, pode apresentar maior variação diária (FORSBACK et al., 2010). Essa variação é decorrente de fatores nutricionais, do esvaziamento e preenchimento de leite no úbere e/ou distúrbios do tecido secretor mamário (KELLY, 2010).

A mastite pode aumentar os níveis de ácidos graxos livres e ácidos graxos não esterificados, dependendo da gravidade da infecção. A falta de substrato leva a redução da síntese e capacidade secretória da glândula mamária (FORSBÄCK, et al 2010). Além disso, em casos de mastite há aumento dos níveis de lipase, enzima responsável pela degradação dos componentes de gordura (KELLY, 2010).

Já a lactose é produzida a partir da glicose gerada no fígado. No úbere, parte da glicose é convertida em galactose e combina-se a uma molécula de glicose para produzir a lactose (BLOWEY; EDMONDOSON, 2010). A lactose é o componente mais estável do leite em vacas sadias, presente em 4,5 a 5% no leite bovino (HECK et al., 2009; KELLY, 2010). Com a mastite e os danos às células epiteliais, ocorre aumento da permeabilidade e falha na barreira sangue-leite, possibilitando perdas de lactose para o sangue (FORSBÄCK et al. 2010). Além disso, o teor de lactose no leite de vacas com mastite também diminui pelas lesões causadas no tecido secretor levarem a diminuição na produção de leite, uma vez que a lactose é o principal determinante da função osmótica (KELLY, 2010).

A proteína total do leite é composta principalmente pela caseína e, em menor quantidade, albumina e globulina (proteínas do soro). Para a síntese de caseína, os aminoácidos são transportados para o úbere através da corrente sanguínea e transformados em caseína pelas células mamárias alveolares, enquanto as proteínas do soro são transferidas diretamente do sangue para o leite (BLOWEY; EDMONDOSON, 2010). O teor de proteína do leite varia, em média, entre 3 a 3,6% (FORSBÄCK, 2010) e podem ser afetados pela capacidade genética das vacas e fatores fisiológicos como o estágio de lactação (FORSBACK et al., 2010). A alimentação também pode interferir, porém de maneira mais discreta. A energia da dieta tem importante efeito sobre o teor de caseína do leite, enquanto a proteína de origem dietética tem pouca influência (BLOWEY; EDMONDOSON, 2010).

O leite oriundo de quartos acometidos com mastite apresenta menor teor de caseína, provavelmente pela proteólise causada pelo aumento da concentração de enzimas proteolíticas (LEITNER et al., 2006). Entretanto, o aumento de CCS eleva os níveis de albumina e globulina pelo aumento da permeabilidade (LEITNER et al., 2006; FORSBÄCK et al., 2009a; FORSBÄCK et al., 2009b; FORSBACK et al., 2010). Assim, o teor de proteína total do leite pode permanecer constante, mas o leite apresenta qualidade inferior.

2.3. DIAGNÓSTICO DOS PATÓGENOS CAUSADORES DE MASTITE

A correta identificação das espécies bacterianas auxilia no desenvolvimento de medidas de prevenção da mastite e indica o melhor tipo de tratamento a ser realizado durante a lactação ou no período seco (ZSCHÖCK; RIßE; SOMMERHÄUSER, 2004). Existem vários métodos diagnósticos para a identificação de microrganismos em gêneros, espécies e estirpes. O método mais utilizado para determinação dos agentes bacterianos é a cultura microbiológica (CM; ADKINS et al., 2017).

A CM convencional é realizada a partir do estriamento de leite em um meio de cultura não seletivo, seguido da incubação por 24 horas e análise das características das colônias quanto a quantidade, coloração, tamanho e presença de hemólise. Dependendo das características de cada amostra, as provas bioquímicas e de perfil enzimático são realizadas (HARMON et al., 1990; DOHOO et al., 2011). A técnica de CM tem sido substituída por demandar de 2 a 7 dias para o diagnóstico completo em nível de espécie (BARREIRO et al., 2012). Além disso, pode apresentar identificações errôneas em alguns casos, pela alta similaridade genotípica de *Streptococcus* spp., por exemplo, com outros agentes, como *Aerococcus* spp., *Enterococcus* spp. e *Lactococcus* spp. (WERNER et al., 2014).

Desse modo, a metodologia de espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção à Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF MS) tem sido promissora no diagnóstico microbiológico por gerar resultado de forma rápida, confiável e de baixo custo (BARREIRO et al., 2010; BARREIRO et al., 2012; GONÇALVES et al., 2014; TOMAZI et al., 2015; BARREIRO et al., 2017). Apesar de ter se difundido principalmente na identificação de agentes causadores de infecções em humanos, o uso de MALDI-TOF já está bem consolidado em diagnósticos veterinários. Na mastite bovina, o método foi usado na identificação de vários agentes importantes, como: *Streptococcus* grupo B (BARREIRO et al., 2010), *Streptococcus* grupo D (WERNER et al., 2012), ENA (BARREIRO et al., 2010; CAMERON et al., 2017;

MAHMMOD et al., 2018), *Corynebacterium* spp. (GONCALVES et al., 2016) e *Enterobacteriaceae* (RODRIGUES et al., 2016; SAVAGE et al., 2017).

A metologia MALDI-TOF MS consiste na separação dos íons de acordo com a relação massa/carga, possibilitando a detecção com alta sensibilidade de grande variedade de biomoléculas (MENESES et al., 2012). O resultado do tempo de voo de cada íon da amostra analisada gera um espectro espécie-específico que é comparado com o banco de dados. O software Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) fornece escore de 2,0 para identificação em nível das espécies e uma pontuação de 1,7 para identificação em nível de gênero (NONNEMANN et al., 2019).

Em casos em que a amostra não é identificada em nível de espécie pelo MALDI-TOF MS é indicado que a identificação seja feita por meio de métodos mais específicos, como sequenciamento e análise filogenética do gene 16S rRNA. Essas técnicas são reconhecidas como técnicas de referência para a diferenciação de espécies estritamente relacionadas. Não são técnicas utilizadas em rotina laboratorial por ainda apresentar custo elevado, ficando restrita em pesquisas científicas (HUXLEY; HELPS; BRADLEY, 2004).

2.4. SECAGEM DE QUARTOS MAMÁRIOS

Quartos mamários com mastite crônica apresentam baixas taxas de cura nos protocolos de tratamento com os antimicrobianos convencionais. O uso intensivo de antimicrobianos utilizados nesses casos podem contribuir com o aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos (POL; RUEGG, 2007). Além disso, quartos mamários com mastite crônica são importantes reservatórios de bactérias, principalmente as classificadas como contagiosas, tanto para os demais quartos da vaca quanto para outras vacas do rebanho (THO SEETH et al., 2016). Desse modo, é importante estabelecer medidas de controle desses casos para que perdas maiores sejam evitadas.

A secagem de quartos cronicamente infectados durante a lactação possibilita a remoção desse quarto do sistema produtivo, sem que toda a produção da vaca seja perdida por longos períodos de carência pela administração de antimicrobianos (THO SEETH et al., 2016). Além disso, a secagem dos quartos mamários com mastite crônica diminui o risco de transmissão de bactéria, uma vez que o quarto deixa de ser ordenhado, além de impedir que a vaca seja descartada (MIDDLETON; FOX, 2001). Poucos métodos de secagem de quartos mamários com mastite crônica durante a lactação foram avaliados, e a maioria dos estudos apresenta

inconsistência dos resultados encontrados.

Uma das formas de secar o quarto mamário com mastite crônica é pela infusão intramamária de iodo-povidine. Apesar de poucos estudos sobre o assunto, este método é comumente utilizado e leva à secagem permanente do quarto mamário (MIDDLETON; FOX, 2001). O fato da vaca permanecer no rebanho é algo positivo, uma vez que possibilita que a produção dos outros quartos mamários seja aproveitada. Porém, a inutilização permanente do quarto mamário fez com que técnicas de secagem apenas durante a lactação vigente fossem pesquisadas.

Com isso, alguns métodos de secagem temporária têm sido utilizados no campo como a utilização apenas do selante interno de teto (SIT) e a secagem abrupta do quarto mamário sem nenhuma intervenção (SKARBYE; KROGH; SØRENSEN, 2018). A secagem abrupta ocasiona aumento excessivo de pressão no úbere, aumentando o desconforto na secagem e diminuição na produção dos outros quartos (SKARBYE; KROGH; SØRENSEN, 2018). O SIT contendo subnitrato de bismuto foi desenvolvido por Meaney (1977), mostrando-se eficaz em prevenir novas infecções. O SIT apresenta-se como uma pasta viscosa, inerte e sem propriedades antimicrobianas, que é infundida no quarto mamário no momento da secagem, mimetizando o tampão de queratina, uma vez que forma barreira física imediata na porção distal da cisterna do teto impedindo a entrada ascendente de patógenos (GODDEN et al., 2003; LIM et al., 2007). O SIT foi inicialmente utilizado na secagem da vaca, porém associá-lo a métodos não-antimicrobianos na secagem durante a lactação, visando não descartar o leite por carência e a diminuir o uso de antimicrobianos, pode apresentar efeitos satisfatórios na qualidade do leite.

2.4.1. Caseína hidrolisada

A secagem da vaca é geralmente realizada 60 dias antes da data prevista do parto, visando maximizar a produção de leite na próxima lactação e a produção de colostro (ANNEN et al., 2004). Esse processo geralmente é realizado a partir da interrupção abrupta da ordenha, independente da produção de leite atual, o que resulta no acúmulo de leite na glândula mamária e aumento de pressão (LEITNER et al., 2007).

A partir da estase do leite na glândula mamária é desencadeado o processo de involução ativa, descrito em cabras e vacas (SHAMAY et al., 2002; SHAMAY et al., 2003). No fim da lactação ocorre aumento do ativador de plasminogênio, produzido pelo epitélio mamário, responsável pela conversão do plasminogênio na sua forma ativa: a plasmina (POLITIS, 1996;

THO SEETH et al., 2016). A plasmina é responsável por produzir peptídeos termorresistentes a partir da proteólise da β-caseína (fração 1-28; SILANIKOVE et al., 2000). Os peptídeos liberados bloqueiam os canais de potássio nas membranas apicais do epitélio mamário e diminuem a secreção de leite, além de desencadear destruição da estrutura lobular-alveolar da glândula mamária, provocando perda maciça das células alveolares e consequente involução da glândula mamária (CAPUCO; AKERS, 1999). O fato da plasmina apresentar-se principalmente na forma não ativada, explica a diminuição da produção de leite levar cerca de 7 dias (NOBLE; HURLEY, 1999) e da involução da glândula ocorrer cerca de 14 dias (SHAMAY et al., 2002). Embora a ativação do sistema ativador de plasminogênio-plasminogênio-plasmina (AP-P-P) ocorra no final da lactação, outros fatores, como o estresse, também são capazes de ativar o sistema, levando a liberação de peptídeos que causam bloqueio dos canais de potássio (SILANIKOVE et al., 2000).

Além disso, a estase do leite causa processo inflamatório local. Esse fenômeno faz com que as "*tight junctions"* (TJ), localizadas entre as células epiteliais e responsáveis por formar uma barreira entre o líquido intersticial e o leite, sejam rompidas (NGUYEN; NEVILLE, 1998). Devido a diferença de íons entre os dois meios, com o rompimento da TJ, a concentração de Na^+ no leite aumenta, enquanto a concentração de K^+ diminui (SHAMAY et al., 2002).

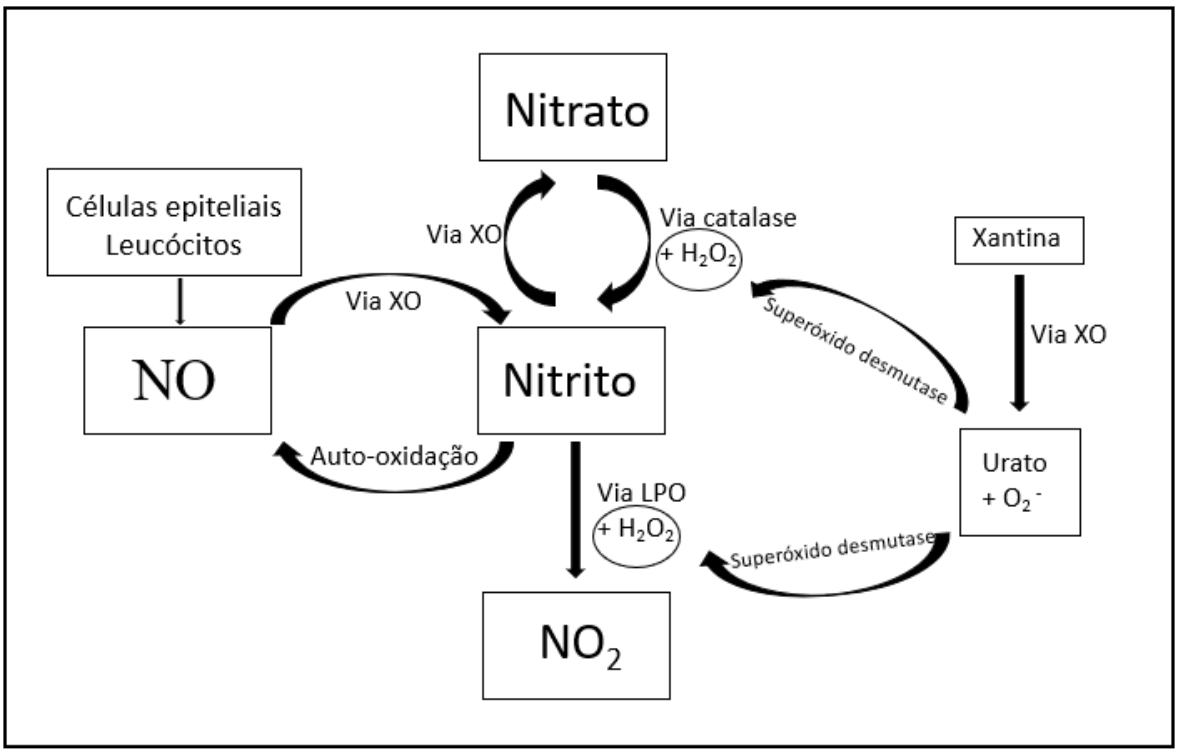
Com o intuito de estimular a produção da plasmina, alguns estudos avaliaram a secagem de quartos mamários infectados por meio da infusão de caseína hidrolisada. Essa infusão tem o objetivo de auxiliar na involução do tecido mamário e cura microbiológica de infecções intramamárias no período seco (LEITNER et al., 2007; LEITNER; JACOBY; SILANIKOVE, 2011; THO SEETH et al., 2016; LEITNER et al., 2017). Quando a hidrólise da caseína é realizada *in vitro*, vários peptídeos se formam, inclusive o peptídeo responsável por diminuir a produção de leite. A infusão intramamária de CH leva ao aumento da atividade do sistema AP-P-P, tanto em cabras como em vacas (SHAMAY et al., 2002; SHAMAY et al., 2003). A alta concentração de plasmina causa intenso bloqueio nos canais de potássio nas membranas apicais do epitélio mamário, levando a redução transitória na produção de leite e a perda de integridade da TJ (THO SEETH et al., 2016). A infusão intramamária de CH reduziu de maneira drástica a produção de leite após um dia, atingindo níveis mínimos em até 72 horas (SHAMAY et al., 2002; SHAMAY et al., 2003). Shamay et al. (2003) utilizaram CH como protocolo de secagem de 16 quartos mamários ao administrar seis doses de CH por três dias e observaram que todos os quartos retornaram à atividade depois do parto, indicando que a infusão de CH simula os processos naturais, sem provocar necrose do tecido.

A administração de CH também foi descrita como método para melhorar o bem-estar no momento da secagem dos quartos. O fato de a involução do tecido mamário ocorrer de forma mais rápida, leva a redução do desconforto causado pelo acúmulo de leite na glândula mamária (LEITNER et al., 2007). Leitner et al. (2007) também descrevem que as vacas que foram secas com CH ficaram mais calmas e confortáveis, em relação as vacas que foram secas pelos métodos convencionais.

Além de todos os benefícios relatados em relação a involução da glândula mamária, a administração de CH também possibilitou a cura microbiológica, induzindo respostas bactericidas e bacteriostáticas cerca de 8 horas após a primeira infusão de CH (SILANIKOVE; ISCOVICH; LEITNER, 2005). Essas respostas ocorreram a partir da rápida ativação do sistema imune (aumento de lactoferrina e IgG) e da diminuição acentuada da disponibilidade de nutrientes (lactose e gordura), essenciais para a multiplicação bacteriana (SILANIKOVE et al., 2005). A lactoferrina é uma proteína sérica característica do período de involução mamária, embora não seja específica da glândula mamária. Essa proteína apresenta grande afinidade pelo ferro, estabelecendo uma competição com as bactérias por esse elemento, visto que é essencial para o metabolismo da maioria dos patógenos (HARMON et al., 1975).

O mecanismo pelo qual ocorre o desenvolvimento de ambiente bactericida provavelmente se dá pelo processo inflamatório gerado na glândula mamária induzir a liberação de lipopolissacarídeos e citocinas pró inflamatórias, como IL-1 e IFN-g. Essas citocinas estimulam células epiteliais mamárias e leucócitos a produzirem monóxido de nitrogênio (NO; LEDBETTER; PAAPE; DOUGLASS, 2001). A partir de outra via, a conversão da xantina em urato leva à formação de íons superóxido (O_2^-) pela ação da enzima xantina oxidase (XO) e, posteriormente, em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da enzima superóxido desmutase. O H_2O_2 formado é essencial para a atividade enzimática da catalase e lactoperoxidase (LPO). Essas enzimas atuam no ciclo de metabolismo de NO, em que o nitrito formado a partir da ação da XO sobre o nitrato, interage com a H_2O_2 e a LPO, formando radical com potente ação bactericida denominado dióxido de nitrogênio (NO_2). Além disso, o nitrito também pode ser transformado diretamente em NO pela ação da XO. Assim, a ação conjunta dessas enzimas na formação de NO e NO_2 contribui para a citotoxidade e mecanismos de defesa da vaca, associado ao aumento de NO devido ao processo inflamatório gerado pela infusão de CH (Figura 1; SILANIKOVE et al., 2005).

Figura 1 - Esquema de formação de NO e NO_2 para propiciar ambiente bactericida a partir da infusão de CH (Adaptado de Silanikove et al., 2005)



Fonte: Barcelos, M.M. (2019)

Estudos relataram os benefícios oriundos da secagem de quartos mamários utilizando CH, principalmente para quartos mamários com alta CCS (LEITNER et al., 2007; LEITNER; JACOBY; SILANIKOVE, 2011; THO SEETH et al., 2016). Nos estudos desenvolvidos com a utilização de CH, todos os quartos mamários avaliados retomaram a produção de leite na lactação seguinte. Além disso, a infusão de CH aumentou na produção de leite na lactação seguinte, provavelmente por causar apoptose das células epiteliais secretoras de leite de maneira mais rápida, o que pode aumentar o número de células recém-sintetizadas no parênquima após a secagem e elevar a capacidade produtiva (LEITNER; JACOBY; SILANIKOVE, 2011). Outro benefício reportado com o uso de CH foi a baixa perda produtiva da vaca (cerca de 8%) após a secagem de um quarto mamário. Em vacas com produção em torno de 30 kg/dia não houve alteração perceptível na produção de leite (LEITNER et al., 2017).

As taxas de cura microbiológica após o tratamento com infusão de CH foram maiores que 70% (78 – 73,8%) (SILANIKOVE; ISCOVICH; LEITNER, 2005; LEITNER; JACOBY; SILANIKOVE, 2011). Leitner, Jacoby e Silanikove (2011) avaliaram a taxa de cura microbiológica após secagem associando CH e antimicrobiano intramamário e houve cura em 73,8% em casos de mastite causadas por ENA. Esse percentual é maior que o encontrado por

Borm et al. (2006) quando avaliaram a secagem apenas com antimicrobiano (59,5%) e a cura espontânea da infecção (31,7%). Quando o tratamento foi utilizado durante a lactação, três infusões intramamárias diárias de CH foram eficazes na cura de mastite subclínica crônica por *S. aureus*, coliformes e *Streptococcus* spp., apresentando taxa de cura média de 78% (SILANIKOVE; ISCOVICH; LEITNER, 2005).

Os resultados dos estudos realizados na área indicam que a utilização da CH para secagem é um método viável, inclusive para vacas de alta produção de leite. Além disso, possibilita que um quarto seja seco durante a lactação, não prejudicando a ordenha dos demais quartos mamários. Outro aspecto favorável à utilização de CH é que, por não se tratar de um composto a base antimicrobiana, o leite dos quartos sadios não precisa ser descartado ao longo do tratamento, evitando perdas com descarte do leite (SHAMAY et al., 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais deste estudo basearam-se nos princípios éticos da experimentação animal, bem como as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) e protocolada sob o CEUA nº 1876290119.

3.1. SELEÇÃO DAS FAZENDAS E DOS ANIMAIS

Foram selecionados sete rebanhos leiteiros localizados nos estados de Minas Gerais (n=2) e São Paulo (n=5), com média de 232 vacas em lactação (variação de 100 a 500). Nestes rebanhos, as vacas em lactação foram alojadas em instalações do tipo: *compost barn* (n = 3), *freestall* (n=1) e sob pastejo (n=3), submetidas à ordenha mecanizada acoplada em medidor automático de produção (n=5). As vacas foram alimentadas de acordo com o manejo nutricional de cada propriedade leiteira e a água foi fornecida *ad libitum.*

A partir de amostragem por conveniência, foram selecionadas 60 vacas da raça Holandesa ou mestiças (*Bos taurus taurus* × *Bos taurus indicus*) que apresentavam mastite crônica, caracterizada por três ou mais casos de MC na mesma lactação no mesmo quarto mamário ou quando a vaca apresentou CCS > 1.000.000 células/mL em amostras compostas de

leite por pelo menos dois meses consecutivos. Nas vacas selecionadas pelo critério CCS > 1.000.000 células/mL, foi realizado o teste CMT para identificação do quarto mamário acometido. Vacas que apresentaram (a) sinais clínicos inflamatórios agudos; (b) outras doenças que não mastite e (c) tratamento recente com antimicrobianos (sistêmico ou intramamário) até trinta dias antes do início do estudo não foram incluídas no estudo. Das vacas selecionadas para o estudo, foram coletadas informações sobre: (a) número de lactações; (b) dias em lactação, (c) produção média diária de leite, (d) número de casos de MC na lactação atual e (e) última CCS.

3.2. PREPARO DA CASEÍNA HIDROLISADA

O preparo da CH foi realizado conforme adaptação do protocolo sugerido por SHAMAY et al. (2003), que não incluía as etapas de congelamento, liofilização e dissolução em solução salina. A caseína (*Casein from bovine milk*, Sigma-Aldrich®, Saint Louis, EUA) foi dissolvida na concentração de 100 g/L em 25 Mm de tampão Tris-buffer (Tris buffered saline, Sigma-Aldrich®, Saint Louis, USA) (pH = 8) e a solução resultante foi digerida em tripsina (500 U/L), por 4 horas a 37 ºC em incubadora com agitação orbital (TE-424, Tecnal®, Piracicaba, Brasil). Após a digestão, foi adicionado HCl 37% à solução até atingir o pH de 4,7, mensurado por medidor de pH portátil TEC-3P-MP (Tecnal®). Em seguida, a solução foi centrifugada a 13.500 × g durante 5 minutos e o conteúdo de caseína não digerida (*pellet*) foi descartado. O sobrenadante contendo CH foi transferido para tubo estéril e o pH ajustado para pH= 7 pela adição de solução de NaOH. A solução resultante foi congelada à -80 °C por 12 horas e liofilizada por aproximadamente 3 dias (Liofilizador Série LH, Terroni Equipamentos®, São Carlos, Brasil).

Após a liofilização, a CH foi pesada e dissolvida em solução salina em duas concentrações (100 ou 300mg/50mL). As soluções foram mantidas em frascos estéreis identificados e submetidos à fervura em banho-maria, pré-aquecido à 100 °C, por 15 minutos. Após fervura, as soluções foram deixadas em repouso até atingirem temperatura ambiente (20 a 25ºC) e, posteriormente, foram submetidas a filtração em sistema à vácuo, com membrana de filtração de 45µm. A solução filtrada foi armazenada em seringas estéreis (60 mL, bico Luer Lock, Descarpack®, São Paulo, Brasil), preenchidas com 50mL da solução. As seringas foram vedadas e armazenadas à -21 ºC até as infusões intramamárias, como proposto por Leitner et al. (2017).

3.3. TRATAMENTOS INTRAMAMÁRIOS COM CASEÍNA HIDROLIZADA

As vacas selecionadas (*n* = 60) foram distribuídas aleatoriamente entre dois tratamentos (*n* = 30 casos por grupo): a) três infusões intramamárias de caseína hidrolisada (100mg CH, 50 mL por infusão), com intervalo de 24 horas entre as infusões intramamárias, seguido da infusão de selante interno de tetos (Sellat®, subnitrato de bismuto 4 g, Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, Brasil) no dia 7 após o última infusão intramamária de CH; e b) infusão intramamária única de caseína hidrolisada (300mg CH, 50 mL) seguido da infusão de selante intramamário (Sellat®, subnitrato de bismuto 4 g, Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, Brasil) no dia 7 após a infusão intramamária de CH.

Antes da infusão intramamária de CH, os tetos a serem tratados foram imersos em solução desinfetante (*pré-dipping*) e secos com papel toalha descartável 30 segundos após a imersão, seguido da ordenha completa do leite. Após as infusões de CH, todos os tetos foram imersos em solução desinfetante (*pós-dipping*). Quando as vacas estavam aptas para secagem, (em média 60 dias antes do parto) o SIT foi retirado manualmente do quarto mamário tratado com infusão de CH e uma nova infusão de SIT foi realizada.

3.4. COLETA DE AMOSTRAS DE LEITE ANTES DAS INFUSÕES COM CH

Amostras de leite de quartos mamários selecionados foram coletadas antes (dia 0) e após (dias 4 e 7) as infusões intramamárias de CH. As amostras de leite foram coletadas de forma asséptica para cultura microbiológica, CCS e composição (teores de gordura, proteína, lactose, ST e ESD). Para tanto, os quartos mamários foram imersos em solução desinfetante (*pré-dipping*) e secos com papel toalha descartável 30 segundos após a imersão. Foi realizada assepsia da extremidade do quarto mamário com gaze embebida em álcool 70%, sendo os três primeiros jatos descartados antes da coleta de leite (ADKINS et al., 2017).

3.4.1. Cultura microbiológica e identificação microbiana por MALDI-TOF MS

Para cultura microbiológica foram coletados 10 mL de leite por quarto mamário em frascos estéreis devidamente identificados e transportadas refrigeradas até o laboratório

Qualileite - Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ – USP (Pirassununga, São Paulo). As amostras foram conservadas à -20 °C até a realização das culturas microbiológicas.

Uma alíquota de leite (0,01 mL) foi inoculada em ágar sangue suplementado com 5% de sangue bovino e incubadas aerobicamente à 37 °C por 48 horas. A partir de amostras com isolamento, uma colônia bacteriana foi transferida com aplicador de madeira estéril para placa de MSP 96-spot (Bruker Daltonics Inc.) para extração de proteínas ribossomais. A placa contendo as colônias foi mantida em temperatura ambiente até secar. Em seguida, 1 µL de solução saturada de matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico em 50% de acetonitrila, 47,5% de água e 2,5% de ácido trifluoroacético foi adicionado em cada spot da placa sobre as colônias. Todas as placas foram calibradas com padrão de teste bacteriano (BST, Bruker Daltonics Inc). Os espectros foram gerados pelo uso do equipamento Microflex LT Bruker a partir de ±250 disparos de laser emitidos de forma randômica. O software Flex Control (versão 3.4) foi utilizado para captação automática dos espectros de massa de cada amostra, gerando um *fingerprint* (conjunto de picos proteicos) que foi comparado ao banco de dados do software MBT Compass (MALDI BioTyper® Compass, versão 4.1.7, User Manual, Bruker Daltonics Inc.) para a classificação dos espectros (BARCELOS et al., 2019).

O grau de similaridade entre o espectro da amostra e o espectro de referência foi interpretado de acordo com as recomendações do fabricante (Bruker Daltonics Inc.), a saber: escore > 2 foi considerado para identificação em nível de espécie, entre 1,7 e 2 em nível de gênero e, escore < 1,7 quando não houve identificação confiável.

3.4.2. CCS e composição do leite

Para a CCS e a composição do leite foram coletados 50 mL de leite dos quartos mamários afetados em frascos devidamente identificados. As amostras foram conservadas em temperatura ambiente, em frasco com 8mg de conservante bronopol e 0,3 mg do agente antifúngico natamicimana. As amostras de leite foram enviadas para análise no Laboratório Clínica do Leite – Departamento de Produção Animal da ESALQ-USP (Piracicaba – São Paulo). A CCS foi determinada por citometria de fluxo em equipamento de contagem opto eletrônico (Somacount 300®, Bentley Instruments Inc., Chasca, MN EUA), de acordo com recomendação da International Organization for Standardization & Dairy Federation International Satandard (ISO 13366-2:2006; IDF 148-2:2006). Os teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST) e extrato seco desengordurado (ESD) foram determinados a partir

de método de absorção infravermelha no equipamento Bentley 2000® (Bentley Instruments Inc., Chasca, MN EUA).

3.5. INVOLUCÃO DOS QUARTOS MAMÁRIOS

A involução dos quartos mamários foi avaliada de acordo com a metodologia *Udder Pressure index* (UPI), que se baseia na avaliação manual da pressão do úbere. No presente estudp foi realizada nos dias 4 e 7 após a primeira infusão de CH (LEITNER et al., 2007). A pressão foi avaliada por uma única pessoa em todas as vacas, pressionando-se a glândula mamária cerca de cinco centímetros acima da base do quarto mamário. Brevemente, foi utilizada uma escala de 0 a 3, na qual: 0 representa nenhuma pressão; 1, pressão média; 2, alta pressão; e 3, pressão extremamente alta, característica de processo inflamatório. Foi incluído um grau intermediário entre a pressão característica do escore 1 e 2, uma vez que a involução de alguns quartos mamários ocorreu de forma mais gradativa (Figura 2).

Figura 2. Graus de involução correspondente a cada escore

Fonte: Barcelos, M.M. (2019) *Imagem extraída de Leitner et al., 2007.

3.6. PRODUÇÃO DE LEITE

As produções de leite das vacas amostradas foram mensuradas antes do início do tratamento (D0) e ao final (D7) nas fazendas que possuíam medidores automáticos de produção em funcionamento (n=5). A mensuração foi realizada para avaliar a diferença de produção de leite após as infusões com CH e secagem de um quarto mamário (Produção de leite: Dia 0 – Dia 7).

3.7. COLETA DE AMOSTRAS E AVALIAÇÕES APÓS OS TRATAMENTOS

3.7.1. CCS dos quartos não tratados

Amostras de leite dos quartos não tratados (pool de três quartos funcionais) foram coletadas nos dias 30, 60 e 90 dias após o início do tratamento para determinação de CCS. As amostras foram coletadas a partir do copo coletor, visando obter amostras representativas da ordenha completa da vaca. A CCS obtida nos dias 30, 60 e 90 foram comparadas a CCS composta dos quatro quartos mamários obtida não mais que 15 dias antes do tratamento.

3.7.2. Avaliações após o parto

Dentre as vacas selecionadas, 11 encerraram a lactação até o final de março de 2019. Os quartos mamários secados com CH permaneceram sem ordenhar durante a lactação. No momento da secagem das vacas, o SIT foi retirado por ordenha manual dos quartos mamários tratados com CH e uma nova infusão de SIT foi realizada em todos os quartos. As vacas permaneceram cerca de 60 dias no período seco e os quartos mamários secados com CH foram avaliados após o parto quanto ao retorno da produção de leite, cura bacteriológica e cura da inflamação. Para tanto foram coletadas amostras de leite do quarto mamário para cultura microbiológica 7 e 14 dias após o parto e para CCS no dia 14 após o parto.

3.8. ANÁLISE ESTATISTICA

Os resultados foram analisados pelo programa computacional *Statistical Analysis System*® (SAS, versão 9.4). A normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram verificadas pelo PROC UNIVARIATE. Os graus de liberdade foram calculados de acordo com o método Satterthwaite (DDFM = Satterth). As médias ajustadas foram calculadas e comparadas pela opção DIFF do ‘statement’ LSMEANS. Para todas as análises estatísticas foi utilizada o nível de significância de $P \leqslant 0.05$ e tendência de $P \leqslant 0.10$.

As médias ajustadas das características descritivas das vacas selecionadas (números de lactações, média de produção de leite, CCS, histórico de mastite clínica e dias em lactação) antes da infusão da CH, assim como os resultados de composição do leite por quarto mamário

(logCCS, teor de gordura, proteína, lactose, ST e ESD) foram comparadas entre os grupos de tratamentos de CH (infusão única ou três infusões de CH) pelo teste de Tukey.

Para a análise estatística dos escores de involução (UPI) dos quartos mamários de acordo com os protocolos de tratamento (uma ou três infusões de CH), a partir do procedimento PROC GLIMMIX obtido pelo ajuste do modelo logístico seguinte:

$$logit(pi) = \beta 0 + \beta 1 \times Trat + \beta 2 \times dia + \beta 3 \times (Trat \times dia) + Re$$

Onde logit(pi) é a função da probabilidade de escore de involução (0, 1, 1,5, 2 e 3); β0 é o intercepto; β1 coeficiente de regressão do tratamento intramamário (Trat); β2 é o coeficiente de regressão do dia de observação (dia); β3 é o coeficiente de regressão para interação Trat × dia. Foi utilizada estrutura de erros autorregressiva de primeira ordem e Re é o resíduo termo do modelo. Foi utilizada distribuição multinomial com função logística.

A contagem de células somáticas (× 10^3 células/mL) foi transformada em escala logarítmica linear de CCS por meio do programa Excell (Microsoft Office, 2016) a partir da fórmula LOGCCS= Log_2 (CCS/100) + 3, como sugerido por Schukken et al. (2003).

A análise dos dados de produção de leite no D0 e D7 e CCS dos quartos não tratados (D30, D60 e D90) foi realizada pelo procedimento PROC MIXED de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + Dj + Dj \times T_i + LogCCS1 + HMC + DEL + NL + \text{Faz} + e_{ijkl},$$

Onde Y_{ijkl} = é o valor observado; μ = média geral; T_i = efeito fixo de tratamento i; Dj = efeito fixo do dia da observação; Dj × T_i = interação entre Dj e T_i; LogCCS1= efeito fixo do log da contagem de células somática composta anterior ao tratamento; HMC = efeito fixo do histórico de mastite clínica; DEL = Efeito fixo dos dias em lactação no momento da secagem; NL = efeito fixo do número de lactações; Faz = efeito aleatório de fazenda; e_{ijkl}= erro aleatório associado a cada observação. Os dias da observação foram incluídos no modelo como medidas repetidas no tempo. As matrizes CS, CSH, UM, UN (1), TOEP, AR (10), VC, TOEP (2), ARH (1), ARMA (1,1), FA (1), HF, ANTE (1), TOEPH e UNR foram testadas e com base nos parâmetros de ajuste do modelo, a matriz utilizada foi a FA(1), porque apresentou o menor valor de AICC (348,8).

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS DAS VACAS SELECIONADAS

Um total de 148 vacas com mastite crônica foram avaliadas e 88 foram excluídas por não atenderem aos critérios do estudo. Do total de vacas selecionadas (n=60), 38 (63,33%) foram da raça Holandesa e 22 (36,67%) da raça Girolando (mestiças de *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*). As médias de número de lactações, produção média de leite, CCS (log) composta, número de casos prévios de mastite clínica e dias em lactação antes da primeira infusão de CH foram similares entre os grupos de tratamentos (uma ou três infusões de CH) (Tabela 2).

Tabela 2. Médias ajustadas de características produtivas das vacas com mastite crônica antes do tratamento com uma (300mg) ou três infusões (100 mg/infusão) intramamárias de caseína hidrolisada (CH)

Características	Infusão única[1]	Três infusões[2]	Total	EPM[3]	*P value*
	(n = 30)	(n = 30)	(n = 60)		
Número de lactações	2,6	3,23	2,91	0,2	0,130
Produção de leite, Kg/dia	20,7	18,4	19,57	0,94	0,230
logCCS[4]	6,59	6,14	6,37	0,23	0,340
Número de casos de MC na lactação	2,23	1,86	2,05	0,15	0,220
Dias em lactação	239,1	266,1	252,6	14,1	0,340

[1]Infusão intramamária única de CH, 300mg.
[2]Três infusões intramamárias de CH, 100mg/infusão, a cada 24 horas.
[3]EPM: erro padrão da média.
[4]logCCS: Escala logarítmica de CCS.

4.2. QUARTOS MAMÁRIOS INCLUÍDOS NO ESTUDO

Antes da primeira infusão intramamária de CH, foram coletadas amostras de leite dos quartos mamários para análise de composição do leite e CCS. Das 60 amostras coletadas, 11 não foram avaliadas devido à coagulação das amostras antes das análises, o que impediu a realização da metodologia de citometria de fluxo. Desse modo, foram avaliadas 25 amostras de quartos mamários tratados com três infusões intramamárias e 24 tratados com infusão única. Não houve diferença dos resultados de CCS, teores de gordura, proteína, lactose, ST e ESD antes da infusão entre os grupos de tratamentos (P>0,05; Tabela 3).

Tabela 3. Médias ajustadas de componentes do leite oriundo dos quartos mamários de vacas com mastite crônica antes do tratamento com uma (300mg) ou três infusões (100 mg/infusão) intramamárias de caseína hidrolisada (CH)

Variável	Infusão única[1] (n = 24)	Três infusões[2] (n = 25)	Total (n = 49)	EPM[3]	*P value*
logCCS[4]	7,32	7,41	7,36	0,31	0,88
Gordura, %	3,28	3,00	3,14	0,22	0,54
Proteína, %	3,54	3,58	3,56	0,08	0,78
Lactose, %	3,29	3,64	3,47	0,15	0,26
ST[5], %	11,27	11,34	11,31	0,30	0,90
ESD[6], %	7,99	8,34	8,17	0,15	0,27

[1]Infusão intramamária única de CH, 300mg.
[2]Três infusões intramamárias de CH, 100mg/infusão, a cada 24 horas.
[3]EPM: erro padrão da média.
[4]logCCS: Escala logarítmica de CCS.
[5]ST: Sólidos totais.
[6]ESD: Extrato seco desengordurado.

4.3. FREQUÊNCIA DOS AGENTES CAUSADORES DE MASTITE

Do total de amostras coletadas antes das infusões intramamárias com CH (n = 60), 17 (28,33%) apresentaram resultado de cultura negativa (i.e., ausência de isolamento microbiológico após 48 horas de incubação). Dentre as amostras com isolamento bacteriano, *S. uberis* apresentou a maior frequência de isolamento (n = 17; 28,33%), seguido de *S. aureus* (n = 6; 10%). Além disso, apenas duas amostras tiveram isolamento de bactérias gram-negativas (Tabela 4).

Tabela 4. Frequência de isolamentos de patógenos causadores de mastite em vacas com mastite crônica antes das infusões de caseína hidrolisada pela metodologia MALDI-TOF MS

Cultura microbiológica	Infusão única[1]		Três infusões[2]		Total	
	N	%	N	%	N	%
Sem isolamento	8	26,67	9	30,00	17	28,33
Gram-positivas						
S. uberis	11	36,67	6	20,00	17	28,33
S. aureus	2	6,67	4	13,33	6	10,00
Corynebacterium spp.	2	6,67	2	6,67	4	6,67
Staphylococcus chromogenes	2	6,67	2	6,67	4	6,67
Staphylococcus sciuri	0	0	2	6,67	2	3,33
S. dysgalactiae	1	3,33	2	6,67	3	5,00
S. agalactiae	1	3,33	0	0	1	3,33
Enterococcus faecalis	0	0	1	3,33	1	3,33
Streptococcus gallolyticus	1	3,33	0	0	1	3,33
Streptococcus pluranimalium	1	4,35	0	0	1	3,33
S. aureus/ S. dysgalactiae	1	4,35	0	0	1	3,33
Gram-negativas						
Pseudomonas aeruginosa	0	0	1	3,33	1	3,33
Stenotrophomonas maltophilia	0	0	1	3,33	1	3,33
Total	30		30		60	

[1]Infusão intramamária única de CH, 300mg.
[2]Três infusões intramamárias de CH, 100mg/infusão, a cada 24 horas.

Após as infusões intramamárias de CH, dez quartos mamários (16,67%) apresentaram cura microbiológica, a qual foi avaliada pelo resultado das duas culturas negativas (D4 e D7) após a infusão de CH. Deste total de quartos mamários com cura microbiológica, seis foram tratados com três infusões intramamárias e quatro com infusão única (Tabela 5).

Tabela 5. Frequência de patógenos que apresentaram cura microbiológica frente a aplicações de caseína hidrolisada

Cultura microbiológica	Infusão única[1]		Três infusões[2]		Total[1]	
	(n = 4)		(n = 6)		(n = 10)	
	N	%	N	%	N	%
S. uberis	2	20	1	10	3	30
Corynebacterium bovis	1	10	1	10	2	20
Staphylococcus sciuri	0	0	2	20	2	20
Staphylococcus chromogenes	1	10	0	0	1	10
Enterococcus faecalis	0	0	1	10	1	10
Stenotrophomonas maltophilia	0	0	1	10	1	10
Total	4	40	6	60	10	100

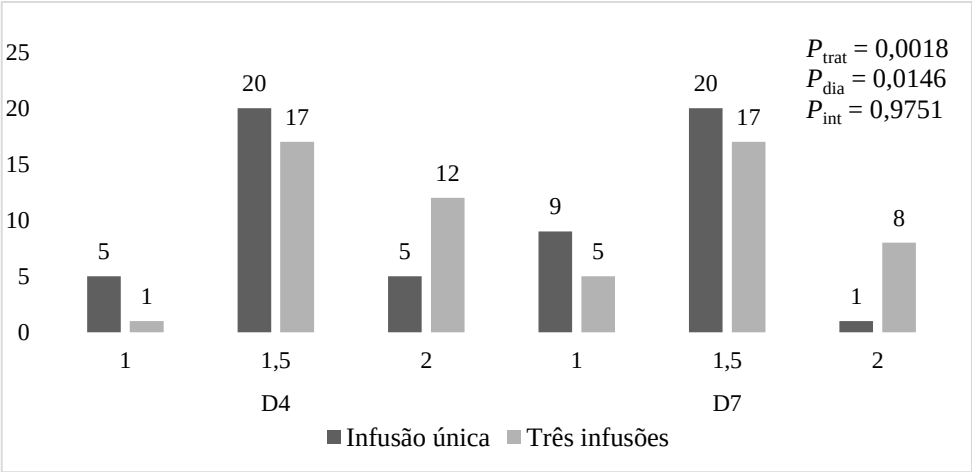
[1]Infusão intramamária única de CH, 300mg.
[2]Três infusões intramamárias de CH, 100mg/infusão, a cada 24 horas

4.4. AVALIAÇÃO DA INVOLUÇÃO DA GLÂNDULA MAMÁRIA

Os quartos mamários tratados foram avaliados quanto a involução pela técnica UPI nos dias D4 e D7. Foi observado efeito de tratamento (P=0,0018) e do dia de avaliação (P=0,0146),

uma vez que houve maior involução nos quartos mamários tratados com infusão única de CH (300m; Figura 3). Apesar disso, em ambos os tratamentos não foi observada involução completa dos quartos mamários (escore 0) nos dias 4 e 7.

Figura 3 - Frequência de escores de involução dos quartos mamários tratados com uma (300mg) ou três infusões (1200 mg/infusão) intramamárias de caseína hidrolisada (CH), de acordo com os dias de avaliação após o tratamento

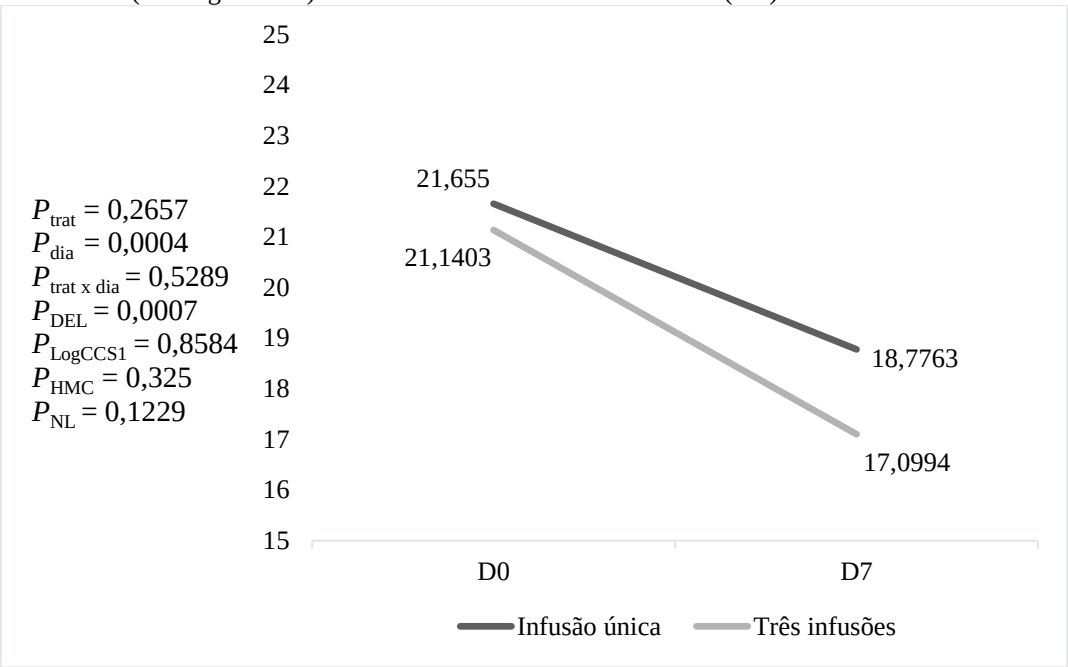


[1]Infusão intramamária única de CH, 300mg.
[2]Três infusões intramamárias de CH, 100mg/infusão, a cada 24 horas.

4.5. PRODUÇÃO DE LEITE

A produção de leite foi avaliada com base nos resultados de 45 vacas, das quais 21 tratadas com infusão única e 24 com três infusões intramamárias de CH. Os resultados de produção de leite das demais vacas (n=9 no grupo tratado com infusão única e n=6 no grupo tratado com três infusões) não foram incluídas nas análises por indisponibilidade dos resultados de produção de leite pelas fazendas. As médias de produção de leite foram afetadas pelo DEL (P= 0,0007) e dia de avaliação (P=0,0004). No entanto, não houve efeito de tratamento, de interação entre tratamentos e de dia de avaliação, LogCCS inicial, histórico de mastite clínica e número de lactação (P>0.05; Figura 4). Em média, para cada aumento de um dia no DEL houve diminuição de 0,0192 Kg de leite, enquanto a diferença de produção de leite antes (D0) e após o tratamento (D7) foi 2,8787 Kg de leite.

Figura 4 - Médias ajustadas das produções de leite no D0 e D7 das vacas tratadas com uma (300mg) ou três infusões (100 mg/infusão) intramamárias de caseína hidrolisada (CH)

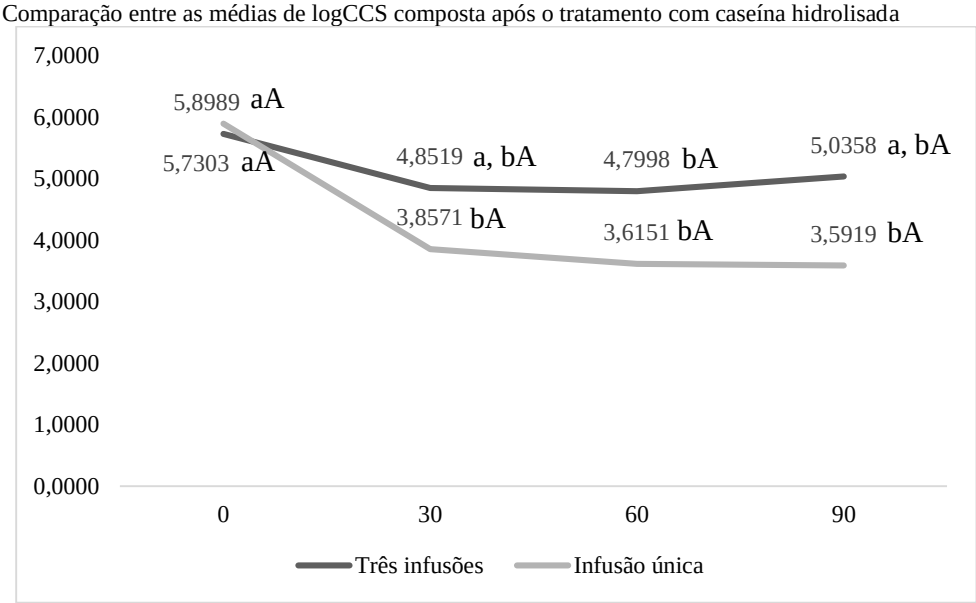


[1]Infusão intramamária única de CH, 300mg.
[2]Três infusões intramamárias de CH, 100mg/infusão, a cada 24 horas.
Fonte: Barcelos, M.M. (2019)

4.6. CCS DOS QUARTOS NÃO TRATADOS

Do total de vacas incluídas no estudo (n=60), 28 vacas permaneceram em lactação no período de, no mínimo, 90 dias após a infusão com caseína hidrolisada e tiveram a CCS composta dos quartos não tratados avaliadas nos dias 30, 60 e 90. Nas vacas tratadas com três infusões, a CCS foi menor significativamente apenas no dia 60 (P=0,0482), enquanto que nas vacas tratadas com infusão única, a CCS composta foi menor nos dias 30 (P=0,0035), 60 (P<0,0001) e 90 (P<0,0001). Quando os dados de CCS composta foram comparados entre os tratamentos não houve diferenças em nenhum dos dias avaliados.

Figura 5 - Comparação entre as médias de logCCS composta após o tratamento com caseína hidrolisada



[1]Infusão intramamária única de CH, 300mg.
[2]Três infusões intramamárias de CH, 100mg/infusão, a cada 24 horas.
Fonte: Barcelos, M.M. (2019)

4.7. RETORNO À LACTAÇÃO, CURA MICROBIOLÓGICA E CCS PÓS PARTO

Do total de vacas incluídas no estudo (n=60), onze vacas foram secadas por proximidade ao parto (média de 341 DEL) dentro do período do estudo e foram avaliadas após o parto quanto ao retorno da produção de leite, cura microbiológica e CCS e composição de leite dos quartos com infusão de CH. Deste total (n=11), sete vacas foram tratadas com infusão intramamária única de CH e quatro com três infusões. Todos os quartos avaliados retornaram à produção de leite após o parto.

Em relação à cura bacteriológica, no tratamento com infusão única, quatro quartos mamários (36,36%) infectados com *S. uberis* antes da infusão intramamária com CH apresentaram cultura negativa após o parto, enquanto que das vacas tratadas com três infusões, três quartos mamários (27,27%) infectados com *S. uberis*, *Strep. dysgalactiae* e *Staph. chromogenes* apresentaram cultura negativa 7 e 14 dias após o parto. Os demais quartos (n=4/11, 36,36%) apresentaram novas infecções, uma vez que a bactéria isolada após o parto não foi a mesma isolada antes da infusão com CH. Destes, um quarto mamário (9,09%) secado com o protocolo de três infusões apresentou caso clínico de mastite durante o período seco, causada por *Strep. dysgalactaiae* (Tabela 6).

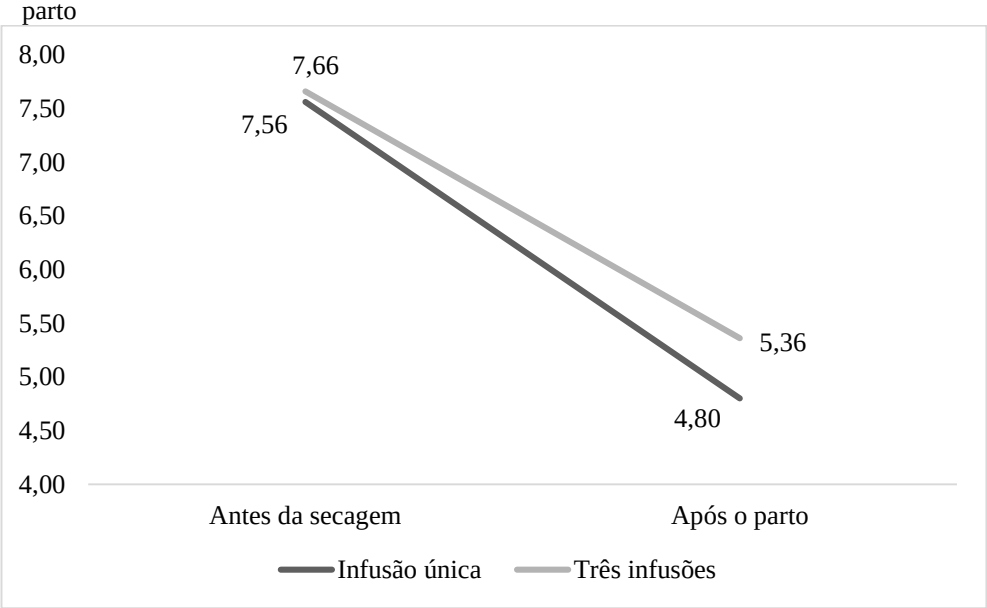
Tabela 6. Distribuição de quartos mamários que apresentaram cura microbiológica nas amostras analisadas após o parto

Tratamento	N	Cultura microbiológica D0	Cultura microbiológica após o parto
Infusão única[1]	4	*S. uberis*	Negativo
	2	*S. uberis*	*Staph. chromogenes*
	1	*S. uberis*	*Enterococcus faecalis*
Três infusões[2]	1	*S. uberis*	Negativo
	1	*S. uberis*	*Strep. dysgalactiae*
	1	*Strep. dysgalactiae*	Negativo
	1	*Staph. chromogenes*	Negativo

[1]Infusão intramamária única de CH, 300mg.
[2]Três infusões intramamárias de CH, 100mg/infusão, a cada 24 horas.

O logaritmo da CCS dos onze quartos mamários avaliados após o parto foram, em média, 7,56 no grupo tratado com infusão única e 7,66 no grupo tratado com três infusões antes da secagem dos quartos. Após o parto, a média de logCCS dos dois grupos foi reduzida para 4,80 no grupo tratado com infusão única e 5,36 no grupo tratado com três infusões (Figura 6).

Figura 6. Comparação entre as médias de logCCS dos quartos mamários antes do tratamento com CH e após o parto



[1]Infusão intramamária única de CH, 300mg.
[2]Três infusões intramamárias de CH, 100mg/infusão, a cada 24 horas.

5. DISCUSSÃO

O protocolo de secagem de quartos mamários com infusão intramamária única com 300mg de CH foi mais eficiente em acelerar a involução do quarto mamário quando comparado com três infusões de CH. Por outro lado, o logCCS das vacas nos meses subsequentes ao tratamento com CH e a diminuição na produção de leite foram semelhantes nos dois protocolos de infusão de CH. Após o parto, todos os quartos mamários avaliados retornaram à produção e apresentaram cura microbiológica, porém a CCS do quartos mamários tratados com infusão única de CH foi menor que os tratados com três infusões.

5.1. VACAS E QUARTOS MAMÁRIOS INCLUÍDOS NO ESTUDO

No presente estudo, as características das vacas anteriormente aos tratamentos (número de lactações, produção de leite, logCCS, histórico de mastite clínica e DEL), assim como a composição do leite oriundo dos quartos mamários acometidos com mastite crônica (teores de gordura, proteína, lactose, ST e ESD) não diferiram entre os dois tratamentos, o que indica distribuição homogênea das vacas entre os grupos. As vacas selecionadas apresentaram características como o elevado número de lactações e DEL avançado, os quais são fatores de risco descritos em casos de mastite crônica (HERTL et al., 2011).

A composição do leite anteriormente ao início das infusões com CH apresentou alta CCS e alterações nos teores de gordura e lactose, caracterizando o processo inflamatório crônico. A alta CCS (log 7,36 ± 0,31) indica que os quartos mamários apresentaram processo inflamatório intenso, com alta migração de células de defesa (e.g., neutrófilos; OVIEDO-BOYSO et al., 2007). Os teores de gordura (3,14 ± 0,22%), embora presentes na faixa de variação normal (3 – 5%; KELLY, 2010), foram menores do que aqueles reportados por Leitner et al. (2006) (3,25%); Cunha et al. (2008) (3,51%) e Kester; Sorter e Hogan (2015) (3,93%). Essa diminuição do teor de gordura pode ocorrer pela redução na síntese e aumento da lipólise, devido à lipase decorrente dos processos inflamatórios (KELLY, 2010).

O baixo teor de lactose (3,47 ± 0,15%) é compatível com casos de mastite, apesar de ser menor do que encontrado por Kester; Sorter e Hogan (2015; 4.64%). O baixo teor de lactose pode ser reflexo do tempo elevado de exposição da glândula a processos inflamatórios, que pode resultar na passagem de lactose do interior da glândula mamária para o sangue (BANSAL et al., 2005). Já o teor de proteína (3,56 ± 0,08%) está dentro da faixa de referência (3 a 3,6%),

e é maior do que o encontrado por Leitner et al. (2006; 3,44%), Cunha et al. (2008; 3,13%) e Kester; Sorter e Hogan (2015; 3,16%).

5.2. FRÊQUENCIA DE PATOGENOS CAUSADORES DE MASTITE CRÔNICA

No presente estudo 28,33% das amostras analisadas apresentaram cultura negativa. Essa frequência é equivalente aos valores encontrados por Silanikove, Iscovich e Leitner (2005) e Tho Seeth et al. (2016), que não observaram isolamento positivo de bactérias em 21,42% e 37,5% dos casos de mastite crônica, respectivamente. A cultura negativa em casos de mastite clínica pode ser justificada pelo número de unidades formadoras de colônia estar abaixo do limite de detecção do ensaio, por cura bacteriológica espontânea ou pelo agente causador não ser isolado em meios de cultura convencionais (PERSSON; NYMAN; GRÖNLUND-ANDERSSON, 2011).

Em relação às culturas positivas, *S. uberis* (28,33%) e *S. aureus* (10%) foram os patógenos mais isolados. Tho Seeth et al. (2016), na Alemanha, também descreveram maior percentual de *S. uberis* causando mastite crônica (29,16%), menor prevalência de *S. aureus* (4,16%), e presença de *Trueperella pyogenes* (8,32%). Estudo similar com 42 animais com mastite crônica em Israel observou maior prevalência de *Trueperella pyogenes* (23,8%) e diferentemente do observado por Tho Seeth et al. (2016) e no presente estudo, *S. aureus* apresentou maior prevalência (11,9%) quando comparado ao *S. uberis* (9,52%; SILANIKOVE; ISCOVICH; LEITNER, 2005). Na Suécia, *S. aureus* (22%) também foi mais prevalente que *S. uberis* (10%) e apresentaram 2 e 2.3 vezes mais chance, respectivamente, de serem isolados de casos de mastite crônica (PERSSON; NYMAN; GRÖNLUND-ANDERSSON, 2011).

Apesar das diferenças entre a prevalência de *S. aureus* e *S. uberis* entre os estudos, em razão das diferenças de fatores de risco entre rebanhos e por terem sido conduzidos em países diferentes, todos estudos apresentaram *S. aureus* e *S. uberis* como importantes causadores de mastite crônica. A capacidade desses agentes em cronificar as infecções intramamárias pode estar relacionada aos mecanismos de defesa destes patógenos que contribuem para evasão do sistema imune, como a formação de biofilme no caso de *S. aureus* (MELCHIOR; VAARKAMP; FINK-GREMMELS, 2006; OLIVEIRA et al., 2006). Já St*reptococcus uberis* possui o gene Nisin U, responsável pela imunidade a lantibióticos (WIRAWAN et al., 2006), proteína ativadora do plasminogênio, que degrada proteínas da matriz extracelular (ROSEY et al., 1999), capacidade de troca de oligopeptídeos que possibilita a obtenção de aminoácidos essenciais a partir de peptídeos do leite (SMITH et al., 2002), proteína SUAM responsável pela

adesão às células epiteliais mamárias (ALMEIDA et al., 2006); e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) que se ligam às proteínas do hospedeiro e protegem contra espécies reativas de oxigênio (REINOSO et al., 2011).

5.3. AVALIAÇÃO DA INVOLUÇÃO DOS QUARTOS MAMÁRIOS

O tratamento com infusão única foi mais eficiente em acelerar a involução, apesar da involução não ter sido completa em nenhum dos tratamentos utilizados. Esse resultado não era esperado, uma vez que nos demais estudos com infusão intramamária de CH, tanto em casos crônicos quanto na secagem das vacas, houve involução completa na maioria dos casos. Silanikove, Iscovich e Leitner (2005) utilizaram protocolo de três infusões intramamárias para quartos com mastite crônica e relataram 94,59% de involução completa dos quartos mamários tratados em até três dias. Tho Seeth et al. (2016) observaram involução de 87,5% dos quartos mamários mediante protocolo de seis infusões intramamárias totalizando 300mg de CH. Quando a CH foi utilizada como protocolo de secagem em cabras (SHAMAY et al., 2002) e vacas (PONCHON et al., 2014) foi relatada involução completa de todos os quartos mamários, por infusão única de 300 mg ou infusão única de 70 mg, respectivamente.

Apesar de não ter ocorrido involução completa no presente estudo (escore 0), o fato de nenhum quarto mamário ter apresentado inchaço (escore 3) após o tratamento foi considerado um dos efeitos positivos da infusão com CH. Resultados similares também foram descritos por Leitner et al. (2007), que ao compararem a secagem de vacas de alta produção com tratamento de vaca seca e CH, observaram que a CH reduziu a pressão do úbere e foi claramente associada a sinais de conforto em comparação às vacas que utilizaram somente a terapia da vaca seca.

5.4. PRODUÇÃO DE LEITE

Sobre a diferença da produção de leite entre os dias 0 e 7, não houve efeitos do número de 6 infusões de CH. O efeito do DEL sobre a produção já era esperado no nosso estudo, uma vez que a média de dias em lactação foi de 252 e ocorre diminuição da produção de leite de acordo com o aumento do estágio da lactação (NORO et al., 2006). Apesar disso, a diminuição de 2,87 Kg de produção total de leite, que representa cerca de 13,45% da produção pré-infusão foi maior do que o relatado nos demais estudos que avaliaram a perda de produção da vaca quando um quarto mamário foi secado com CH (SILANIKOVE; ISCOVICH; LEITNER, 2005;

LEITNER et al., 2012). Enquanto no estudo realizado por Silanikove, Iscovich e Leitner (2005) a produção total de leite individual da vaca não foi afetada depois da secagem de um quarto mamário, Leitner et al. (2012) encontraram diminuição de cerca de 9% na produção de leite 30 dias após a secagem. Tho Seeth et al. (2016) descreveram que quartos mamários com mastite crônica tem redução em média de 2kg de leite, similar ao descrito neste estudo, quando o quarto mamário foi secado com CH. Apesar da redução de produção de leite no presente estudo ser maior do que os demais que utilizaram CH, foi menor do que o relatado por Skarbye, Krogh e Sørensen (2018) que, ao avaliar secagem abrupta de quartos mamários com MSC, observaram redução média de 4,1 Kg de leite. Esse resultado pode ser explicado por maior conforto na secagem com CH, uma vez que não houve aumento na pressão no úbere após a secagem do quarto mamário, diferentemente do relado por Skarbye, Krogh e Sørensen (2018). A alta pressão do úbere pode ser estímulo para liberação de hormônios do estresse que levam a menor produção de leite (LEITNER et al., 2007).

5.5. CCS DOS QUARTOS MAMÁRIOS FUNCIONAIS

A CCS dos quartos mamários não tratados não apresentou diferença significativa entre os dois grupos de tratamento. No D60, o logCCS observado nos dois protocolos de tratamento (3,6151 nas vacas tratadas com infusão única e 4,7998 nas vacas tratadas com três infusões) são similares ao encontrado por Silanikove, Iscovich e Leitner (2005), no qual a média do logCCS após 60 dias da infusão de CH foi de 4,0356, utilizando protocolo de três infusões.

No presente estudo, as CCS apresentaram ampla variação (D30: 1,5656 a 9,6437; D60: 1,1110 a 7,6235; D90: 0,0566 a 9,1050), contrariamente ao observado por Silanikove, Iscovich e Leitner (2005), que reportaram que todas as vacas apresentaram valores menores que 5,0036. Essa diferença entre os dois estudos pode ser explicada pela ocorrência de novas infecções nos demais quartos funcionais. Apesar disso, a infusão de CH nos quartos mamários com mastite crônica reduziu o logCCS composta, o que impactou positivamente a qualidade do leite do tanque. Além disso, em razão da infusão com CH estar restrita apenas ao quarto acometido evita descarte de leite dos outros quartos mamários (SILANIKOVE; ISCOVICH; LEITNER, 2005).

5.6. CURA MICROBIOLÓGICA E CCS PÓS PARTO

Um total de onze quartos mamários com involução induzida pela infusão de CH foram avaliados após o parto e todos apresentaram cura microbiológica independentemente do número de infusões intramamárias de CH. Apesar do baixo número de vacas disponíveis para as avaliações, a alta taxa de cura microbiológica até o momento é similar aos demais estudos (SILANIKOVE; ISCOVICH; LEITNER, 2005; LEITNER; JACOBY; SILANIKOVE, 2011). Silanikove, Iscovich e Leitner (2005) utilizaram protocolo com três infusões, com 100mg de CH cada, em 37 vacas com mastite crônica e obtiveram taxa de cura de 78%, enquanto Leitner, Jacoby e Silanikove (2011) ao associarem CH ao antimicrobiano intramamário na secagem, observaram que a taxa de cura aumentou de 51,7% para 73,8%, comparada à utilização apenas do antimicrobiano intramamário. Essa alta taxa de cura pode estar relacionada à ação do sistema imune inato e à diminuição da disponibilidade de nutrientes na glândula mamária essenciais para o crescimento bacteriano (SILANIKOVE; ISCOVICH; LEITNER, 2005).

Foram observados também quatro casos de novas infecções em quatro quartos mamários tratados com CH. Os agentes isolados nesses casos foram *Enterococcus faecalis* e *Strep. dysgalactiae,* classificados como patógenos ambientais e *Staph. chromogenes*, considerados oportunistas, que causam mastite principalmente em vacas imunossuprimidas, uma vez que possui capacidade de colonizarem o canal do teto (PYORALA; TAPONEN, 2009; ABUREEMA et al., 2014). Além disso, estudos anteriores durante o período seco demonstraram que o risco de novas infecções é maior em quartos mamários infectados com patógenos maiores no momento da secagem, como *S. uberis* (DINGWELL et al., 2004).

A média de CCS dos quartos mamários foi menor nas vacas tratadas com infusão única do que as tratadas com 3 infusões de CH. Este resultado sugere que a infusão única de 300 mg de CH tem potencial de ser usada com protocolo de secagem de quartos mamários com mastite crônica, uma vez que a realização de uma única infusão reduz a demanda por trabalho adicional e minimiza o risco de novas infecções nas vacas com múltiplas infusões.

Apesar dos resultados positivos na avaliação após o parto, o baixo número de quartos mamários avaliados é considerado uma limitação do estudo. Para melhor avaliação dos efeitos da infusão da CH na lactação subsequente recomenda-se a inclusão de mais vacas aptas à secagem.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que protocolo com infusão intramamária única com caseína hidrolisada pode ser utilizado como método alternativo na secagem de quartos mamários de vacas com mastite crônica, com boa eficácia, acelerando a involução da glândula mamária com reduzida reação adversa e redução da celularidade do leite do animal afetado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUREEMA, S. et al. 2014. Molecular epidemiology of recurrent clinical mastitis due to *Streptococcus uberis*: Evidence of both an environmental source and recurring infection with the same strain. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 285–290, 2014.

ADKINS, P. R. F. et al. **Laboratory handbook on bovine mastitis**, 2017.

ÅKERSTEDT, M.; PERSSON WALLER, K.; STERNESJÖ, Å. Haptoglobin and serum amyloid A in relation to the somatic cell count in quarter, cow composite and bulk tank milk samples. **Journal of Dairy Research**, v. 74, n. 2, p. 198-203, 2007.

ALMEIDA, A. et al. Detection and discrimination of common bovine mastitis-causing streptococci. **Veterinary Microbiology,** v. 164, p. 370–377,2013.

ANNEN, E. L. et al. Effects of Dry Period Length on Milk Yield and Mammary Epithelial Cells. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n., p. E66-E76, 2004.

BANSAL, B. K. et al. Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis. **Journal of Dairy Research**, v. 72, n. 2, p. 144-152, 2005.

BARBANO, D. M.; MA, Y.; SANTOS, M. V. Influence of Raw Milk Quality on Fluid Milk Shelf Life 1,2. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n., p. E15-E19, 2006.

BARCELOS, M. M. et al. Comparationof standard and on-plate extraction protocols for identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF MS. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 849-857, 2019.

BARREIRO, J. R. et al. *Short communication:* Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5661-5667, 2010.

BARREIRO, J. R. et al. Nonculture-based identification of bacteria in milk by protein fingerprinting. **PROTEOMICS**, v. 12, n. 17, p. 2739-2745, 2012.

BARREIRO, J. R. et al. Non-culture-based identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 4, p. 2928-2934, 2017.

BARTLETT, P. C. et al. Milk production and somatic cell count in Michigan dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 10, p. 2794-2800, 1990.

BLOWEY, R.; EDMONDOSON, P. **Mastitis Control in Dairy Herds**, 2 Ed. London: CAB international, p. 266. 2010.

BORM, A. A. et al. Effects of Prepartum Intramammary Antibiotic Therapy on Udder Health, Milk Production, and Reproductive Performance in Dairy Heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 6, p. 2090-2098, 2006.

BOTARO, B. G. et al. Staphylococcus aureus intramammary infection affects milk yield and SCC of dairy cows. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 1, p. 61-66, 2015.

BOUTET, P. et al. Imbalance between lipoxin A4 and leukotriene B4 in chronic mastitis-affected cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 11, p. 3430-3439, 2003.

BRADLEY, A. **Bovine Mastitis:** An Evolving Disease. v.164, p.116-128, 2002.

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

BRADLEY, A. J.; GREEN, M. J. Aetiology of clinical mastitis in six Somerset dairy herds. **Veterinary Record**, v. 148, n. 22, p. 683-686, 2001.

BUSANELLO, M. et al. Estimation of prevalence and incidence of subclinical mastitis in a large population of Brazilian dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 8, p. 6545-6553, 2017.

CAMERON, M. et al. Identification of bovine-associated coagulase-negative staphylococci by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using a direct transfer protocol. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 3, p. 2137-2147, 2017.

CAPUCO, A. V.; AKERS, R. M. Mammary Involution in Dairy Animals. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 4, n. 2, p. 137-144, 1999.

CARDOZO, L. L. et al. Risk factors for the occurrence of new and chronic cases of subclinical mastitis in dairy herds in southern Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 11, p. 7675-7685, 2015.

COBO-ÁNGEL, C. et al. Streptococcus agalactiae is not always an obligate intramammary pathogen: Molecular epidemiology of GBS from milk, feces and environment in Colombian dairy herds. **PLoS ONE**, v. 13, n. 12, p. e0208990, 2018.

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

DE VLIEGHER, S. et al. Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 3, p. 1025-1040, 2012.

DINGWELL, R. T. et al. Association of cow and quarter-level factors at drying-off with new intramammary infections during the dry period. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 63, n. 1, p. 75-89, 2004.

DOHOO, I. R.; LESLIE, K. E. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 10, n. 3, p. 225-237, 1991.

DOHOO, I. R. et al. Diagnosing intramammary infections: Evaluation of definitions based on a single milk sample. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 1, p. 250-261, 2011.

DÜRR, J. W. et al. Milk losses associated with somatic cell counts per breed, parity and stage of lactation in Canadian dairy cattle. **Livestock Science**, v. 117, n. 2, p. 225-232, 2008.

ERSKINE, R.J. Mastitis control in dairy herds with high prevalence of subclinical mastitis. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian,** v. 14, p. 969-975, 1992.

ERSKINE, R. J. et al. Efficacy of Systemic Ceftiofur as a Therapy for Severe Clinical Mastitis in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 10, p. 2571-2575, 2002.

FORSBACK, L. et al. Day-to-day variation in milk yield and milk composition at the udder-quarter level. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 8, p. 3569-3577, 2010.

FORSBÄCK, L. et al. Evaluation of quality changes in udder quarter milk from cows with low-to-moderate somatic cell counts. **Animal**, v. 4, n. 4, p. 617-626, 2009a.

FORSBÄCK, L. et al. Udder quarter milk composition at different levels of somatic cell count in cow composite milk. **Animal**, v. 3, n. 5, p. 710-717, 2009b.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry.** London, Kluwer Academic/Plenum Publishers. 479 p. 1998.

GODDEN, S. et al. Effectiveness of an Internal Teat Seal in the Prevention of New Intramammary Infections During the Dry and Early-Lactation Periods in Dairy Cows when used with a Dry Cow Intramammary Antibiotic. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 12, p. 3899-3911, 2003.

GONCALVES, J. L. et al. Effects of bovine subclinical mastitis caused by Corynebacterium spp. on somatic cell count, milk yield and composition by comparing contralateral quarters. **The Veterinary Journal**, v. 209, n., p. 87-92, 2016.

GONÇALVES, J. L. et al.. Identification of Corynebacterium spp. isolated from bovine intramammary infections by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Veterinary Microbiology**, v. 173, n. 1, p. 147-151, 2014.

GONÇALVES, J. L. et al. . Using milk leukocyte differentials for diagnosis of subclinical bovine mastitis. **Journal of Dairy Research**, v. 84, n. 3, p. 309-317, 2017.

GONÇALVES, J. L. et al. Bovine subclinical mastitis reduces milk yield and economic return. **Livestock Science**, v. 210, n., p. 25-32, 2018.

GROHN, Y. T. et al. Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 10, p. 3358-3374, 2004.

HALASA, T. et al. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. **The Veterinary Quarterly**, v. 29, n. 1, p. 18-31, 2007.

HAMMER, J.; MORTON, J.; KERRISK, K. Quarter-milking-, quarter-, udder- and lactation-level risk factors and indicators for clinical mastitis during lactation in pasture-fed dairy cows managed in an automatic milking system. **Australian Veterinary Journal**, v. 90, n. 5, p. 167-174, 2012.

HARMON, R. J. et al. Concentration of lactoferrin in milk of normal lactating cows and changes occurring during mastitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, n. 7, p. 1001-1007, 1975.

HARMON, R. J. et al. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infections**. 3ra. Ed. Arlington: National Mastitis Council, Inc. 34p. 1990.

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 7, p. 2103-2112, 1994.

HECK, J. M. L. et al. Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 4745-4755, 2009.

HERTL, J. A. et al. The effect of recurrent episodes of clinical mastitis caused by gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms on mortality and culling in Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 10, p. 4863-4877, 2011.

HERTL, J. A. et al. Pathogen-specific effects on milk yield in repeated clinical mastitis episodes in Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1465-1480, 2014.

HILLERTON J.E. Controle da mastite bovina. **Workshop sobre Programa Integrado da Mastite Bovina**, Embrapa-CNPGL, Juiz de Fora, MG, p.6-24, 1996.

HOGAN, J.; SMITH, K. L. Managing Environmental Mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 217-224, 2012.

HUXLEY, J. N.; HELPS, C. R.; BRADLEY, A. J. Identification of *Corynebacterium bovis* by Endonuclease Restriction Analysis of the 16S rRNA Gene Sequence. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 1, p. 38-45, 2004.

KELLY, A. L. Milk biochemistry. In: GRIFFITHS, W**. Improving the safety and quality of milk: Volume 1 Milk production and processing**, 1 ed. Cambridge: Woodhead, 2010. Cap. 1, p. 2-26.

KESTER, H. J.; SORTER, D. E.; HOGAN, J. S. Activity and milk compositional changes following experimentally induced *Streptococcus uberis* bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 2, p. 999-1004, 2015.

KÖNIGSSON, K.; GUSTAFSSON, H.; KINDAHL, H. 15-Ketodihydro-PGF2α, Progesterone and Uterine Involution in Primiparous Cows with Induced Retained Placenta and Post-partal Endometritis Treated with Oxytetracycline and Flunixin. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, n. 1, p. 43-51, 2002.

KUIPERS, A.; KOOPS, W. J.; WEMMENHOVE, H. Antibiotic use in dairy herds in the Netherlands from 2005 to 2012. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 2, p. 1632-1648, 2016.

LAGO, A. et al. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 9, p. 4441-4456, 2011.

LANCTÔT, S. et al. Effect of intramammary infusion of chitosan hydrogels at drying-off on bovine mammary gland involution. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 3, p. 2269-2281, 2017.

LANGE-CONSIGLIO, A. et al. Intramammary administration of platelet concentrate as an unconventional therapy in bovine mastitis: First clinical application. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 10, p. 6223-6230, 2014.

LEDBETTER, T. K.; PAAPE, M. J.; DOUGLASS, L. W. Cytotoxic effects of peroxynitrite, polymorphonuclear neutrophils, free-radical scavengers, inhibitors of myeloperoxidase, and inhibitors of nitric oxide synthase on bovine mammary secretory epithelial cells. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 3, p. 286-293, 2001.

LEITNER, G. et al. Interactions between bacteria type, proteolysis of casein and physico-chemical properties of bovine milk. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 6, p. 648-654, 2006.

LEITNER, G. et al. Casein hydrolyzate intramammary treatment improves the comfort behavior of cows induced into dry-off. **Livestock Science**, v. 110, n. 3, p. 292-297, 2007.

LEITNER, G.; JACOBY, S.; SILANIKOVE, N. An evaluation of casein hydrolyzate in combination with antibiotic for bacterial cure and subsequent increase in milk yield in dairy cows. **BMC Veterinary Research**, v. 7, n., p. 3-3, 2011.

LEITNER, G. et al. Major considerations in managing subclinical mastitis during lactation in modern dairy farms. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v.72, p. 3-10, 2017.

LIM, G. H. et al. Adherence and Efficacy of an External Teat Sealant to Prevent New Intramammary Infections in the Dry Period. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 3, p. 1289-1300, 2007.

MAHMMOD, Y. S. et al. Typeability of MALDI-TOF assay for identification of non-*aureus* staphylococci associated with bovine intramammary infections and teat apex colonization. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 10, p. 9430-9438, 2018.

MCDOUGALL, S. et al. Clinical and bacteriological response to treatment of clinical mastitis with one of three intramammary antibiotics. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 55, n. 4, p. 161-170, 2007.

MCDOUGALL, S. et al. Addition of meloxicam to the treatment of clinical mastitis improves subsequent reproductive performance. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 3, p. 2026-2042, 2016.

MEANEY, W. J. Effect of a dry period teat seal on bovine udder infection. **Irish Journal of Agricultural Research**, v. 16, p. 293-299, 1977.

MELCHIOR, M. B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? **The Veterinary Journal**, v. 171, n. 3, p. 398-407, 2006.

MENESES, I. I. F.S. et al. Caracterização estrutural de proteínas recombinantes de Mycobacterium bovis pelo uso de espectrometria de massas MALDI-TOF. **8a Jornada Científica Embrapa Gado de Corte**, p. 36 – 38. 2012.

MIDDLETON, J. R.; FOX, L. K. Technical note: Therapeutic cessation of lactation of Staphylococcus aureus-infected mammary quarters. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 9, p. 1976-1978, 2001.

MIDDLETON, J. R. et al. The National Mastitis Council: A Global Organization for Mastitis Control and Milk Quality, 50 Years and Beyond. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 19, n. 3, p. 241-251, 2014.

NGUYEN, D. A.; NEVILLE, M. C. Tight junction regulation in the mammary gland. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 3, n. 3, p. 233-246, 1998.

NOBLE, M. S.; HURLEY, W. L. Effects of secretion removal on bovine mammary gland function following an extended milk stasis. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 8, p. 1723-1730, 1999.

NORO, G. et al. Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n., p. 1129-1135, 2006

NONNEMANN, B. et al. Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 3, p. 2515-2524, 2019.

OLIVEIRA, C. S. F. et al. Cow-specific risk factors for clinical mastitis in Brazilian dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 121, n. 3, p. 297-305, 2015.

OLIVEIRA, L.; HULLAND, C.; RUEGG, P. L. Characterization of clinical mastitis occurring in cows on 50 large dairy herds in Wisconsin. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 12, p. 7538-7549, 2013.

OLIVEIRA, M. et al. Biofilm-forming ability profiling of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 118, n. 1, p. 133-140, 2006.

OLIVER, S. P. et al. Efficacy of Extended Ceftiofur Intramammary Therapy for Treatment of Subclinical Mastitis in Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 8, p. 2393-2400, 2004.

OVIEDO-BOYSO, J. et al. M. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. **Journal of Infection**, v. 54, n. 4, p. 399-409, 2007.

PANTOJA, J. C.; HULLAND, C.; RUEGG, P. L. Somatic cell count status across the dry period as a risk factor for the development of clinical mastitis in the subsequent lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 1, p. 139-148, 2009.

PERSSON, Y.; NYMAN, A.-K. J.; GRÖNLUND-ANDERSSON, U. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 53, n. 1, p. 36-36, 2011.

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

PILLA, R. et al. Microscopic differential cell counting to identify inflammatory reactions in dairy cow quarter milk samples. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 8, p. 4410-4420, 2012.

PILLA, R. et al. Differential cell count as an alternative method to diagnose dairy cow mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 3, p. 1653-1660, 2013.

POL, M.; RUEGG, P. L. Relationship Between Antimicrobial Drug Usage and Antimicrobial Susceptibility of Gram-Positive Mastitis Pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 1, p. 262-273, 2007.

POLITIS, I. Plasminogen activator system: implications for mammary cell growth and involution. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 6, p. 1097-1107, 1996.

PYORALA, S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 565-578, 2003.

PYORALA, S.; TAPONEN, S. Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 3-8, 2009.

RADOSTITS, O. M.; LESLIE, K. E.; FETROW, J. **Herd Health: Food Animal Production Medicine**. Philadelphia, PA., Saunders. p. 233, 1994.

REINOSO, E. B. et al. Distribution of virulence-associated genes in Streptococcus uberis isolated from bovine mastitis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 318, p. 183–188, 2011.

ROBERSON, J. R. Treatment of clinical mastitis. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 271-288, 2012.

RODRIGUES, N. M. B. et al. The Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) identification versus biochemical tests: a study with enterobacteria from a dairy cattle environment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 132-138, 2016.

ROSEY, E. L. et al. PauA: a novel plasminogen activator from Streptococcus uberis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 178, p. 27–33, 1999

ROSSI, R. S. et al. Diagnostic accuracy of Somaticell, California Mastitis Test, and microbiological examination of composite milk to detect *Streptococcus agalactiae* intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 11, p. 10220-10229, 2018.

RUEGG, P.; REINEMANN, D. **Milk Quality and Mastitis Tests**, v.36, 2002.

RUEGG, P. L.; PANTOJA, J. C. F. Understanding and using somatic cell counts to improve milk quality. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, v. 52, n. 2, p. 101-117, 2013.

RUEGG, P. L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science,** v.100, n. 12, p. 10381–10397, 2017.

SAMPIMON, O. et al. Effect of coagulase-negative staphylococci on somatic cell count in Dutch dairy herds. **Journal of Dairy Research**, v. 77, n. 3, p. 318-324, 2010.

SAMUELSSON, B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. **Science**, v. 220, n. 4597, p. 568-575, 1983.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. 1. ed. Barueri: Manole. 314p. 2007.

SAVAGE, E. et al. Evaluation of Three Bacterial Identification Systems for Species Identification of Bacteria Isolated from Bovine Mastitis and Bulk Tank Milk Samples. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 14, n. 3, p. 177-187, 2017.

SCHUKKEN, Y. et al. The “Other” Gram-Negative Bacteria in Mastitis: Klebsiella, Serratia, and More. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 239-256, 2012.

SCHUKKEN, Y. H. et al. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. **Veterinary Research.**, v. 34, n. 5, p. 579-596, 2003.

SCHUKKEN, Y. H. et al. T. Effects of repeated gram-positive and gram-negative clinical mastitis episodes on milk yield loss in Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 7, p. 3091-3105, 2009.

SHAMAY, A. et al. Casein-derived phosphopeptides disrupt tight junction integrity, and precipitously dry up milk secretion in goats. **Life Sciences**, v. 70, n. 23, p. 2707-2719, 2002.

SHAMAY, A. et al. Infusions of Casein Hydrolyzates into the Mammary Gland Disrupt Tight Junction Integrity and Induce Involution in Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 4, p. 1250-1258, 2003.

SHOSHANI, E. et al. Mammary infection with Staphylococcus aureus in cows: progress from inoculation to chronic infection and its detection. **Journal of Dairy Research**, v. 67, n. 2, p. 155-169, 2000.

SILANIKOVE, N. et al. Stress down regulates milk yield in cows by plasmin induced β-casein product that blocks K+ channels on the apical membranes. **Life Sciences**, v. 67, n. 18, p. 2201-2212, 2000.

SILANIKOVE, N.; ISCOVICH, J.; LEITNER, G. Therapeutic treatment with casein hydrolysate eradicate effectively bacterial infection in treated mammary quarters in cows. Edited by: Hogeveen H. **Mastitis in Dairy Production: Current Knowledge and Future Solutions**, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands; p. 327-332, 2005.

SILANIKOVE, N. et al. Role of xanthine oxidase, lactoperoxidase, and NO in the innate immune system of mammary secretion during active involution in dairy cows: manipulation with casein hydrolyzates. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n. 9, p. 1139-1151, 2005.

SKARBYE, A. P.; KROGH, M. A.; SØRENSEN, J. T. The effect of individual quarter dry-off in management of subclinical mastitis on udder condition and milk production in organic dairy herds: A randomized field trial. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 12, p. 11186-11198, 2018.

SMITH, A. J. et al. Isolation and characterization of a mutant strain of Streptococcus uberis, which fails to utilize a plasmin derived beta-casein peptide for the acquisition of methionine. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 631–639, 2002.

SORDILLO, L. M. Mammary Gland Immunity and Mastitis Susceptibility in the Transition Cow. In: **Elanco Dairy Science Symposium**, Chicago, Illinois, 2012.

STEENEVELD, W.; SWINKELS, J.; HOGEVEEN, H. Stochastic modelling to assess economic effects of treatment of chronic subclinical mastitis caused by Streptococcus uberis. **Journal of Dairy Research**, v. 74, n. 4, p. 459-467, 2007.

STEVENS, M. et al. Quantification of antimicrobial consumption in adult cattle on dairy herds in Flanders, Belgium, and associations with udder health, milk quality, and production performance. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 3, p. 2118-2130, 2016.

SUOJALA, L.; KAARTINEN, L.; PYÖRÄLÄ, S. Treatment for bovine Escherichia coli mastitis – an evidence-based approach. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 36, n. 6, p. 521-531, 2013.

SWINKELS, J. M.; HOGEVEEN, H.; ZADOKS, R. N. A partial budget model to estimate economic benefits of lactational treatment of subclinical Staphylococcus aureus mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 12, p. 4273-4287, 2005.

TAMILSELVAM, B. et al. Streptococcus uberis internalizes and persists in bovine mammary epithelial cells. **Microbial Pathogenesis**, v. 40, n. 6, p. 279-285, 2006.

TANAKA, S. et al. Age-related changes in leukocytes and T cell subsets in peripheral blood of Japanese Black cattle. **Animal Science Journal**, v. 79, n. 3, p. 368-374, 2008.

THO SEETH, M. et al. Drying-off single udder quarters of dairy cattle during lactation using a casein hydrolysate. **Milchwissenschaft**, v.69, p. 23-26, 2016.

TIKOFSKY, L. L. et al. Comparison of Antimicrobial Susceptibility Patterns for Staphylococcus aureus in Organic and Conventional Dairy Herds. **Microbial Drug Resistance**, v. 9, n. supplement 1, p. 39-45, 2003.

TOMAZI, T. Perfil etiológico e molecular de patógenos causadores de mastite clínica, e uso de antimicrobianos em rebanhos leiteiros. **Tese (Doutorado) -** Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2017.

TOMAZI, T. et al. Bovine subclinical intramammary infection caused by coagulase-negative staphylococci increases somatic cell count but has no effect on milk yield or composition. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 5, p. 3071-3078, 2015.

TUCHSCHERR, L. P. N. et al. O. Capsule-negative Staphylococcus aureus induces chronic experimental mastitis in mice. **Infection and immunity**, v. 73, n. 12, p. 7932-7937, 2005.

VAN DEN BORNE, B. H. P. et al. Variation in herd level mastitis indicators between primi- and multiparae in Dutch dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 96, n. 1, p. 49-55, 2010.

VANGROENWEGHE, F. et al. Effect of Carprofen Treatment Following Experimentally Induced *Escherichia coli* Mastitis in Primiparous Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 7, p. 2361-2376, 2005.

WERNER, B. et al. Short communication: Genotypic and phenotypic identification of environmental streptococci and association of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* with intramammary infections among different dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 11, p. 6964-6969, 2014.

WERNER, G. et al. Improved identification including MALDI-TOF mass spectrometry analysis of group D streptococci from bovine mastitis and subsequent molecular characterization of corresponding *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 160, n. 1, p. 162-169, 2012.

WIRAWAN, R. E. et al. Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by Streptococcus uberis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 1148–1156, 2006.

ZADOKS, R. N. et al. A mathematical model of Staphylococcus aureus control in dairy herds. **Epidemiology and infection**, v. 129, n. 2, p. 397-416, 2002.

ZADOKS, R. N. et al. Clinical, epidemiological and molecular characteristics of Streptococcus uberis infections in dairy herds. **Epidemiology and infection**, v. 130, n. 2, p. 335-349, 2003.

ZADOKS, R. N.; SCHUKKEN, Y. H. Use of Molecular Epidemiology in Veterinary Practice. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 22, n. 1, p. 229-261, 2006.

ZSCHÖCK, M.; RIßE, K.; SOMMERHÄUSER, J. Occurrence and clonal relatedness of sec/tst-gene positive Staphylococcus aureus isolates of quartermilk samples of cows suffering from mastitis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 493-498, 2004.