

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PROFISSIONAL EM
DEFESA SANITÁRIA ANIMAL

MONALISA DE SOUSA MOURA SOUTO

**CARACTERIZAÇÃO DE REBANHOS E DE MICRORGANISMOS CAUSADORES
DA MASTITE BOVINA NA PROMOÇÃO DE EDUCAÇÃO SANITÁRIA NA BACIA
LEITEIRA DA REGIÃO TOCANTINA DO MARANHÃO**

São Luís

2024

MONALISA DE SOUSA MOURA SOUTO

**CARACTERIZAÇÃO DE REBANHOS E DE MICRORGANISMOS CAUSADORES
DA MASTITE BOVINA NA PROMOÇÃO DE EDUCAÇÃO SANITÁRIA NA BACIA
LEITEIRA DA REGIÃO TOCANTINA DO MARANHÃO**

São Luís

2024

MONALISA DE SOUSA MOURA SOUTO

**CARACTERIZAÇÃO DE REBANHOS E DE MICRORGANISMOS CAUSADORES
DA MASTITE BOVINA NA PROMOÇÃO DE EDUCAÇÃO SANITÁRIA NA BACIA
LEITEIRA DA REGIÃO TOCANTINA DO MARANHÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Profissional em Defesa Sanitária Animal (Curso de Doutorado) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Defesa Sanitária Animal.

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos

Coorientadora: Profa. Dra. Nancyleni Pinto Chaves
Bezerra

São Luís

2024

Souto, Monalisa de Sousa Moura

Caracterização de rebanhos e de microrganismos causadores da mastite bovina na promoção de educação sanitária na bacia leiteira da região Tocantina do Maranhão. / Monalisa de Sousa Moura Souto. – São Luis, MA, 2024.

147 f

Tese (Doutorado Profissional em Defesa Sanitária Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, 2024.

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos

MONALISA DE SOUSA MOURA SOUTO

**CARACTERIZAÇÃO DE REBANHOS E DE MICRORGANISMOS CAUSADORES
DA MASTITE BOVINA NA PROMOÇÃO DE EDUCAÇÃO SANITÁRIA NA BACIA
LEITEIRA DA REGIÃO TOCANTINA DO MARANHÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Profissional em Defesa Sanitária Animal (Curso de Doutorado) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Defesa Sanitária Animal.

Aprovada em, 30 de agosto de 2024.



Orientador
Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos
Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

Documento assinado digitalmente
gov.br **JOSE CARLOS RIBEIRO JUNIOR**
Data: 20/09/2024 13:51:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br **JOSE MANOEL DE MOURA FILHO**
Data: 19/09/2024 18:39:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

1º Avaliador (Externo)
Prof. Dr. José Carlos Ribeiro Júnior
Universidade Federal do Norte d
Tocantins - UFNT

2º Avaliador (Externo)
Prof. Dr. José Manoel de Moura Filho
Instituto Federal do Maranhão – IFMA

Documento assinado digitalmente
gov.br **DANILO CUTRIM BEZERRA**
Data: 19/09/2024 07:42:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br **AMANDA MARA TELES**
Data: 23/09/2024 20:42:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

3º Avaliador (Externo)
Prof. Dr. Danilo Cutrim Bezerra
Universidade Estadual do Maranhão –
UEMA

4º Avaliador (Interno)
Profa. Dra. Amanda Mara Teles
Universidade Estadual do Maranhão -
UEMA

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que guia toda minha caminhada e que me faz crer, que Ele sempre tem o melhor e que incessantemente estás ao nosso lado.

Ao meu esposo Ernesto, e filhos Laura e Davi, que me apoiaram e compreenderam as renúncias necessárias nesse período. Que são fonte de amor e carinho.

À toda minha família, em especial minha mãe Rosângela, que me apoiou e animou sempre que necessário. Minha mãe, que por vezes, dedicou seu tempo a meus filhos, enquanto eu não podia. Ainda, à família do meu esposo pelo apoio.

Ao PPGPDSA que tanto contribuiu com minha formação, a todos os professores que se dedicaram e fizeram parte desse crescimento. Às professoras Viviane e Nancyleni, juntamente com suas colaboradoras Greice e Amanda Teles, que sempre estiveram à disposição e contribuindo com o projeto. Ao meu orientador, prof. Hamilton Pereira Santos, que me aceitou e auxiliou ao longo de toda essa caminhada, dando conforto e cobrando nos momentos necessários.

À UEMASUL, minha eterna gratidão, por viabilizar todos os projetos realizados e à dispensa e financiamento ao doutorado em todas às vezes que se foram necessárias. À nossa reitora, profa. Luciléa, aos pró-reitores, prof. Alisson (PROPGI), prof. Sérgio (PROPLAD) e profa. Suany (PROGESA). Aos meus companheiros de profissão e centro que colaboraram nessa caminhada, Diretor de Centro, prof. Tiago, e Diretor de Curso, prof. Rafael. E todos os colegas e amigos do CCA que incentivaram e atenderam quando necessário.

Aos professores da UFNT, Francisco Baptista e José Carlos Ribeiro Júnior, que contribuíram imensamente com a realização de parte deste trabalho. Foi gratificante retornar ao local onde iniciei minha trajetória profissional.

Ao SENAR, que foi de extrema importância na coleta de dados da tese, imensa gratidão pelo apoio e disponibilidade dos supervisores Michael e Clésio e técnicos Melksedec e Ronei de Imperatriz, e André e Denise de São Francisco do Brejão.

À FAPEMA pelo apoio financeiro, sem ele seria inviável realizar esta pesquisa.

Aos meus colegas de turma do programa, pelo conhecimento compartilhado, momentos vividos e ajuda concedida.

A todos os meus amigos pelo incentivo e conforto.

RESUMO

A região Tocantina do Maranhão, principal região produtora de leite do estado, precisa melhorar seus índices de produtividade para explorar seu potencial produtivo e incrementar a renda dos produtores. Sendo a mastite bovina uma importante enfermidade na bovinocultura leiteira, é essencial o conhecimento da doença nos rebanhos para implementar medidas de controle e prevenção adequadas à região. Desta forma, o objetivo deste estudo foi conhecer as características de produção, a prevalência da doença, o perfil etiológico, de sensibilidade antimicrobiana e de virulência dos agentes envolvidos nos casos e promover educação sanitária aos produtores leiteiros de rebanhos localizados nos municípios de Imperatriz e São Francisco do Brejão, localizados na região Tocantina do Maranhão. Foram visitados 31 rebanhos, dos quais 17 eram localizados no município de Imperatriz e 14 em São Francisco do Brejão onde realizou-se o diagnóstico da mastite clínica e subclínica, coletou-se leite de vacas acometidas para identificação etiológica e levantou-se as características de produção por meio da aplicação de questionário. Ao final de cada visita eram dadas informações acerca do manejo produtivo e higiênico da ordenha e explanava sobre a ocorrência da doença no rebanho e importância de implementar algumas medidas de controle e tratamento, conforme a realidade do produtor. Verificou-se que as condições de ordenha são, na maioria das vezes, precárias, sem infraestrutura adequada, sem manejo higiênico, sanitário e nutricional. O perfil etiológico identificado foram principalmente espécies do gênero *Staphylococcus* spp. (78,9%), seguidos por *Bacillus* spp. (16,3%), *Streptococcus* spp. (3,5%) e *Enterococcus* spp. (1,3%). Os isolados apresentaram boa sensibilidade à maioria dos antimicrobianos testados, em que os estafilococos tiveram sensibilidade superior a 95% à cefoxitina, ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina, sulfametoxazol/trimetoprim e apresentaram maior resistência à penicilina (46,7%) e tetraciclina (13,65%). Os *Bacillus* spp. foram sensíveis à eritromicina (94,44%) e apresentaram resultado intermediário para a ciprofloxacina (97,22%). Os *Streptococcus* spp. foram 100% sensíveis à sulfametoxazol/trimetoprim e 100% resistentes à cefoxitina e penicilina e os *Enterococcus* spp., foram 100% sensíveis à ciprofloxacina e penicilina e 100% resistentes à tetraciclina. Considerando, a ocorrência de genes de virulência como as toxinas esfoliativas (*eta* e *etb*), toxina-1 do choque tóxico (*tst*) e de resistência à meticilina (*mecA*), os isolados de *Staphylococcus aureus* exibiram os genes em 6,59%

dos isolados para *eta*, 1,09% *etb*, 39,56% *tst* e 2,19% para *mecA*, mostrando a importância do monitoramento, posto que são genes que codificam fatores que podem intensificar a gravidade da infecção e diminuir a resposta antimicrobiana tanto em animais quanto em humanos. Adicionalmente, houve a participação em dois Dia de Campo, em uma propriedade rural localizado em Porto Franco e a outra em Imperatriz, e realizada uma palestra na I Feira Agropecuária de São Francisco do Brejão reunindo produtores de leite e apresentando os dados da mastite encontrados na região e os desafios que a mesma apresenta. O estudo mostrou as fragilidades da produção leiteira na região e aponta que parcerias público privadas nas áreas de assistência técnica, pesquisa e extensão podem ser firmadas e fortalecidas para contribuir com o desenvolvimento produtivo e sustentável dos produtores de leite da bacia leiteira do estado do Maranhão.

Palavras-chave: Diagnóstico etiológico; Genes de virulência; Medidas de controle; Prevalência; Sensibilidade antimicrobiana.

ABSTRACT

The Tocantina region in the Brazilian state of Maranhão, is the main milk-producing region in the state, needs to improve its productivity indices to explore its productive potential and increase the income of producers. As bovine mastitis is an important disease in dairy cattle farming, knowledge of the disease in herds is essential to implement control and prevention measures appropriate to the region. Therefore, the objective of this study was to understand the production characteristics, prevalence of the disease, etiological profile, antimicrobial sensitivity and virulence of the agents involved in the cases and to promote health education to dairy producers from herds located in the municipalities of Imperatriz and São Francisco do Brejão, located in the Tocantina region of Maranhão. Thirty-one herds were visited, of which 17 were located in the municipality of Imperatriz and 14 in São Francisco do Brejão, where the diagnosis of clinical and subclinical mastitis was performed, milk was collected from affected cows for etiological identification, and production characteristics were assessed applying a questionnaire. At the end of each visit, information was provided about the productive and hygienic management of milking and an explanation was given about the occurrence of the disease in the herd and the importance of implementing some control and treatment measures, according to the reality of the producer. It was found that milking conditions are, in most cases, precarious, without adequate infrastructure, and without hygienic, sanitary or nutritional management. The etiological profile identified mainly included species of the genus *Staphylococcus* spp. (78.9%), followed by *Bacillus* spp. (16.3%), *Streptococcus* spp. (3.5%) and *Enterococcus* spp. (1.3%). The isolates showed good sensitivity to most of the antimicrobials tested, with staphylococci had sensitivity greater than 95% to ceftiofur, ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, sulfamethoxazole/trimethoprim and showing greater resistance to penicillin (46.7%) and tetracycline (13, 65%). *Bacillus* spp. were sensitive to erythromycin (94.44%) and presented an intermediate result for ciprofloxacin (97.22%). *Streptococcus* spp. were 100% sensitive to sulfamethoxazole/trimethoprim and 100% resistant to ceftiofur and penicillin and *Enterococcus* spp., were 100% sensitive to ciprofloxacin and penicillin and 100% resistant to tetracycline. Considering the occurrence of virulence genes such as exfoliative toxins (*eta* and *etb*), toxic shock toxin-1 (*tst*) and methicillin resistance (*mecA*), *Staphylococcus aureus* isolates exhibited the genes in 6.59% of isolated for

eta, 1.09% *etb*, 39.56% *tst* and 2.19% for *mecA*, showing the importance of monitoring, since these are genes that encode factors that can intensify the severity of the infection and decrease the antimicrobial response in both animals and humans. Additionally, there was participation in two Field Days, one on a rural property located in Porto Franco and the other in Imperatriz, and a lecture was held at the 1st Agricultural Fair of São Francisco do Brejão, bringing together dairy producers and presenting the mastitis data found in the region and the challenges it presents. The study showed the weaknesses of milk production in the region and indicates that public-private partnerships in the areas of technical assistance, research and extension can be established and strengthened to contribute to the productive and sustainable development of milk producers in the dairy basin of the state of Maranhão.

Keywords: Etiological diagnosis; Virulence genes; Control measures; Prevalence; Antimicrobial sensitivity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO III

Gráfico 1 - Porcentagem de tetos afetados geral e com mastite clínica e subclínica em 394 vacas diagnosticadas com mastite pertencentes a 31 rebanhos leiteiros de Imperatriz e São Francisco do Brejão, estado do Maranhão.....	82
---	----

CAPÍTULO V

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose mostrando produtos de amplificação por PCR multiplex para genes <i>eta</i> , <i>etb</i> e <i>tst</i> de <i>Staphylococcus aureus</i>	105
---	-----

CAPÍTULO VII

Figura 1 - Ações de educação sanitária sobre mastite bovina ocorridas nos municípios de Imperatriz, São Francisco do Brejão e Porto Franco, estado do Maranhão, no período de maio de 2023 a junho de 2024	128
---	-----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Interpretação do <i>California Mastitis Test</i> (CMT) e valores aproximados de células somáticas equivalentes.....	39
---	----

CAPÍTULO III

Tabela 1 – Caracterização socioeconômica de 31 rebanhos leiteiros localizados nos municípios de Imperatriz e São Francisco do Brejão, estado do Maranhão....	72
Tabela 2 – Caracterização do conhecimento sobre mastite e gestão de 31 rebanhos leiteiros localizados nos municípios de Imperatriz e São Francisco do Brejão, estado do Maranhão.....	74
Tabela 3 - Caracterização do local, armazenamento e destino do leite de 31 rebanhos leiteiros localizadas nos municípios de Imperatriz e São Francisco do Brejão, estado do Maranhão.....	75
Tabela 4 – Associação de diferentes preditores com a mastite bovina levantados em 31 rebanhos leiteiros pertencentes aos municípios de Imperatriz e São Francisco do Brejão, estado do Maranhão.....	77
Tabela 5 – Distribuição da ocorrência da mastite de 868 vacas avaliadas pertencentes a 31 rebanhos dos municípios de Imperatriz e São Francisco do Brejão, estado do Maranhão.....	81

CAPÍTULO IV

Tabela 1 – Identificação fenotípica em 313 amostras de leite coletadas de vacas diagnosticadas com mastite oriundas de 17 rebanhos leiteiros pertencentes a Imperatriz e São Francisco do Brejão, estado do Maranhão.....	92
--	----

CAPÍTULO V

Tabela 1 – Genes codificadores de toxinas estafilocócicas, iniciadores, produtos de amplificação esperada e condições de reação para cada ensaio da reação em cadeia da polimerase.....	103
Tabela 2 – Perfil genético para produção de toxinas estafilocócicas e de resistência à metilicina a partir de isolados de <i>S. aureus</i> oriundos de vacas com mastite de rebanhos leiteiros por município de origem.....	104

Tabela 3 – Teste <i>t</i> de Student para identificar associação entre genes de patogenicidade oriundos de <i>Staphylococcus aureus</i> dos municípios de Imperatriz e São Francisco do Brejão, estado do Maranhão.....	105
--	-----

CAPÍTULO VI

Tabela 1 – Perfil de sensibilidade de agentes etiológicos isolados de vacas com mastite pertencentes aos municípios de Imperatriz e São Francisco do Brejão, estado do Maranhão, frente aos sete antimicrobianos testados.....	116
---	-----

Tabela 2 – Resistência antimicrobiana de agentes etiológicos isolados de vacas com mastite pertencentes aos municípios de Imperatriz e São Francisco do Brejão, estado do Maranhão.....	118
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGRITEC	Agrotecnologia do Maranhão
BHI	Brain Heart Infusion
CCS	Contagem de Células Somáticas
CMT	California Mastitis Test
ENA	Estafilococos Não-Aureus
FAB	Feira Agropecuária de São Francisco do Brejão – MA
FAEMA	Federação da Agricultura e Pecuária – Maranhão
ha	Hectare
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Ig	Imunoglobulina
INCRA	Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária
Km	Quilômetro
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Metilina
ODS	Objetivos de Desenvolvimento sustentável
PAA	Programa de Aquisição de Alimento
pb	Pares de Base
PCA	Ágar Contagem de Placa
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PQFL	Plano de Qualificação de Fornecedores de Leite
rpm	Rotação por Minuto
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
SCP	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
SPA	Secretaria de Política Agrária
SENAR - MA	Serviço Nacional de Aprendizagem Rural - Maranhão
SINRURAL	Sindicato Rural de Imperatriz - MA
WMT	Wisconsin Mastitis Test

SUMÁRIO

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO	186
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 JUSTIFICATIVA E IMPORTÂNCIA DO TRABALHO	18
1.2 OBJETIVOS	20
1.2.1 Objetivo geral	20
1.2.2 Objetivos específicos	20
1.3 ESTRUTURA DO TRABALHO	20
REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO II. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	24
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 MASTITE BOVINA	25
2.2 EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO	26
2.3 RESPOSTA IMUNE DA GLÂNDULA MAMÁRIA	29
2.4 CLASSIFICAÇÃO DA MASTITE	33
2.5 PRINCIPAIS MICRORGANISMOS CAUSADORES DA MASTITE	34
2.6 DIAGNÓSTICO DA MASTITE	37
2.7 TRATAMENTO	40
2.8 CONTROLE DA MASTITE	45
2.9 ROTINA DE ORDENHA	49
REFERÊNCIAS	54
CAPÍTULO III. CARACTERIZAÇÃO DE REBANHOS E PREVALÊNCIA DA MASTITE BOVINA EM DOIS MUNICÍPIOS DA BACIA LEITEIRA DA REGIÃO OESTE MARANHENSE	66
3.1 INTRODUÇÃO	67
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	68
3.2.1 Descrição da Área de Estudo e dos Rebanhos Amostrados	68
3.2.2 Diagnóstico da Mastite e Coleta de Dados	69
3.2.3 Análise Estatística	70
3.2.4 Aspectos Éticos	71
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
3.3.1 Caracterização da Atividade Leiteira	71
3.3.2 Associação de Preditores com a Mastite Bovina nos Rebanhos	77
3.3.3 Avaliação da Mastite Bovina nos Rebanhos	80

3.4 CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS	85
CAPÍTULO IV. PERFIL ETIOLÓGICO DE AGENTES CAUSADORES DA MASTITE BOVINA EM DOIS MUNICÍPIOS DA BACIA LEITEIRA DO MARANHÃO	88
4.1 INTRODUÇÃO	89
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	90
4.2.1 Amostras de Leite	90
4.2.2 Cultura, Isolamento e Características Fenotípicas das Amostras	90
4.2.3 Análise Estatística	911
4.2.4 Aspectos Éticos	911
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	911
4.4 CONCLUSÃO	95
REFERÊNCIAS	96
CAPÍTULO V. PESQUISA DE GENES TOXIGÊNICOS E DE RESISTÊNCIA À METICILINA DE <i>Staphylococcus aureus</i> ISOLADOS DE VACAS COM MASTITE	100
5.1 INTRODUÇÃO	1011
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	1022
5.2.1 Amostras Bacterianas	1022
5.2.2 Extração de DNA	1033
5.2.3 Condições de PCR Multiplex e Uniplex	1033
5.2.4 Análise Estatística	1044
5.2.5 Aspectos Éticos	104
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
5.4 CONCLUSÃO	1077
REFERÊNCIAS	1099
CAPÍTULO VI. PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS CAUSADORAS DE MASTITE BOVINA ISOLADAS NA REGIÃO OESTE DO MARANHÃO	1122
6.1 INTRODUÇÃO	1133
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	1144
6.2.1 Amostras Bacterianas	1144
6.2.2 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana	1144
6.2.3 Análise Estatística	1155
6.2.5 Aspectos Éticos	1166
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	116
6.4 CONCLUSÃO	12020

REFERÊNCIAS	121
CAPÍTULO VII. RELATANDO EXPERIÊNCIAS: DO DIAGNÓSTICO À CONSCIENTIZAÇÃO	1244
7.1 INTRODUÇÃO	1255
7.2 MATERIAL E MÉTODOS	1266
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	1288
7.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	131
REFERÊNCIAS	1333
CAPÍTULO VIII. CONSIDERAÇÕES FINAIS	1366
CONSIDERAÇÕES FINAIS	1377
APÊNDICES	1399
Apêndice A – Questionário	140
Apêndice B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	1422
Apêndice C - Folder	1424
ANEXOS	1455
Anexo A – Declaração de Publicação de Capítulo de Livro	1466
Anexo B – Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	1477

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma das principais afecções que acomete vacas leiteiras causando grandes perdas econômicas seja por descarte de leite, menor valor agregado, custos com tratamento, menor produção de leite, descarte precoce do animal ou reduzindo a taxa de concepção e aumentando o intervalo entre parto (Lavor *et al.*, 2019). Além disso, há alterações físico-químicas e bacteriológica no leite que leva a prejuízos na indústria de lácteos, e também riscos para saúde pública tanto pela potencialidade de alguns microrganismos causadores de mastite estarem incriminados em intoxicação alimentar por produzirem enterotoxina, quanto por promoverem transferência de genes de resistência antimicrobiana para outras bactérias (Kromker; Leimbach, 2017; Mesquita *et al.*, 2019; Benites *et al.*, 2021; Rambault *et al.*, 2023)

Por ser uma enfermidade complexa e multifatorial, diversos fatores relacionados ao animal, ambiente e agente etiológico contribuem para maior ocorrência da mastite, como o estado nutricional e imunológico do animal, estágio da lactação, paridade, produção de leite, casos anteriores de mastite, características morfológicas do teto e úbere, higiene do local e do ordenhador, características patogênicas específicas do agente entre outros. Reconhecer esses fatores de risco, identificar a mastite clínica e subclínica e identificar o agente etiológico envolvido são de fundamental importância para o programa de controle dessa enfermidade nos rebanhos (Verbeke *et al.*, 2014; Fávero *et al.*, 2015; Ruegg, 2017; Lopes *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2022).

De acordo com o agente etiológico envolvido na mastite, ela é classificada em contagiosa ou ambiental. Apesar de haver medidas que são comuns para ambas, outras medidas são específicas para cada tipo, sendo a contagiosa de mais fácil controle. Por consequência, patógenos ambientais, como coliformes, causadores primariamente de mastite clínica, tem aumentado a prevalência principalmente em propriedades que controlaram a mastite contagiosa (Breen *et al.*, 2009; Ruegg, 2016).

A mastite clínica é causada normalmente por coliformes termotolerantes, podendo ainda, ser causada por fungos e algas e apresenta a forma clínica da doença, onde se caracteriza por alterações no leite, como presença de grumos, pus, sangue ou aquosidade e/ou alterações no úbere, como processos inflamatórios no úbere e teto. A mastite subclínica é causada principalmente por *Staphylococcus aureus*,

Streptococcus agalactiae, *Mycoplasma spp.* e *Corynebacterium bovis*, onde não são visíveis alterações no leite e úbere, porém há alterações na composição do leite, entre elas o aumento de células somáticas, fator esse utilizado como diagnóstico da mastite subclínica (Saini *et al.*, 2012; Lavor *et al.*, 2019; Lopes *et al.*, 2022).

Existem diversos antimicrobianos possíveis para o tratamento da mastite, entretanto, falhas na cura da vaca com a enfermidade são comuns. Levando a grandes prejuízos econômicos, ocorrência de resistência antimicrobiana e problemas de saúde pública (Ruegg, 2016; Silva *et al.*, 2022). Muitos estudos mostram ampla diversidade de perfil e multirresistência de microrganismos causadores de mastite bovina frente aos variados antimicrobianos como penicilina, sulfonamidas, tetraciclina, gentamicina (Soares *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2018; Dorneles *et al.*, 2019; Benites *et al.*, 2021).

Pelo supracitado, é premente a necessidade de identificação, e, notadamente, avaliar o perfil de resistência antimicrobiana dos agentes etiológicos incriminados na região, para implementação de programas de tratamento que promovam a cura do animal com menor uso de antimicrobianos, consequentemente menos resíduos no leite e carcaça, menor pressão para seleção de microrganismos resistentes e com medidas de controle e prevenção adequadas para cada realidade. Para tal, é necessário conhecer a realidade das propriedades leiteiras, bem como condições sanitárias e agentes envolvidos, e desenvolver programa de orientação e atividades suporte para produtores leiteiros, afim de promover conscientização, mudanças de atitudes e melhorias na qualidade e quantidade de leite produzido.

1.1 JUSTIFICATIVA E IMPORTÂNCIA DO TRABALHO

O leite é um dos produtos de origem animal mais consumido no mundo, sendo importante fonte de nutrientes, como vitaminas, minerais, proteínas e gordura que auxiliam no crescimento e desenvolvimento ósseo, dentário e muscular e na prevenção de doenças. Além disto, a atividade leiteira caracteriza-se por ser grande geradora de emprego, renda e tributos. No Maranhão, ela está presente em todos os municípios do estado, contribuindo fortemente com a economia, registrando a 16ª maior produção leiteira do país no ano de 2022 (IBGE, 2022; IMESC, 2023).

Apesar da atividade estar presente em todo o estado, a região Tocantina é a principal área produtora de leite e onde se encontra o melhor Índice de Modernização

da Pecuária Leiteira (IMPL), composta, em grande parte, por pequenos e médio produtores (SENAR, 2016). Entretanto, muito ainda há de ser feito, uma vez que a produção média fica em torno de 4,36 litros vaca/dia, havendo prejuízos produtivos e econômicos no setor (IBGE, PPM 2016; SENAR, 2016). Prejuízos associados a atividades desenvolvidas sem adequado acompanhamento técnico e pouco investimento no manejo sanitário, higiênico, nutricional e tecnológico, atravancando um rebanho mais especializado e produtivo.

A região Tocantina tem grande potencial produtivo, entretanto, é necessário que investimentos sejam empregados em pesquisas, atividades extensionistas e assistência técnica a fim de reduzir as infecções intramamárias, promover obtenção de leite de forma higiênica e com maior qualidade e impulsionar políticas públicas no setor leiteiro regional (Dantas *et al.*, 2018; IMESC, 2023).

E, sabendo que a mastite bovina é uma das principais doenças da bovinocultura de leite e que causa decréscimo na produção leiteira seja ocasionado pela mastite clínica ou pela subclínica, sendo esta última de maior preocupação no rebanho, já que leva a maiores prejuízos e riscos de contaminação, especialmente pela falta de diagnóstico (Fávero *et al.*, 2015; Ruegg *et al.*, 2017), medidas voltadas para controle e prevenção desta doença devem ser implementadas para fortalecer a cadeia leiteira do estado do Maranhão.

Deste modo, o diagnóstico, a identificação etiológica e o reconhecimento dos fatores de risco da mastite são imprescindíveis para manejo e controle adequado da enfermidade no rebanho, uma vez que, medidas de ações de tratamento, de controle e prevenção podem ser aplicadas de forma mais direcionada ao problema e, acima de tudo, promover uso de antimicrobianos com mais responsabilidade e eficiência na produção leiteira (Fávero *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2017; Ely *et al.*, 2019; Benites *et al.*, 2021; Marques *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2022).

Ressaltando ainda, a importância de implementar todas as medidas já historicamente conhecidas como pré e pós-*dipping*, tranquilidade do ambiente e do animal, alimentação pós ordenha, ambiente limpo, higiene do ordenhador e equipamentos, além de acompanhar o histórico do animal, sendo o registro imprescindível ao longo do tempo e das lactações de cada animal do rebanho (Ruegg, 2017; Lavor *et al.*, 2019).

Outrossim, em relação aos principais desafios de desenvolvimento enfrentados no Brasil, também se busca contribuir com os objetivos de desenvolvimento

sustentável (ODS) da agenda 2030 no Brasil, com a ODS 2 – Fome Zero e Agricultura Sustentável, que visa erradicar a fome, alcançar a segurança alimentar, melhorar a nutrição e promover a agricultura sustentável e ODS 8 – Trabalho Decente e Crescimento Econômico com o objetivo de promover o crescimento econômico inclusivo e sustentável, o emprego pleno e produtivo e o trabalho digno para todos. Por todos os aspectos supracitados é que se realizou esta pesquisa com o intuito de colaborar com a cadeia produtiva brasileira, especialmente a maranhense.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Geral

Caracterizar os rebanhos leiteiros e a epidemiologia da mastite bovina e promover melhoria na qualidade e produção de leite na região Tocantina do Maranhão por meio de ações de educação sanitária.

1.2.2 Específicos

- Conhecer condições de manejo higiênico, sanitário, alimentar e ambiental das vacas destinadas à produção leiteira;
- Diagnosticar casos de mastite clínica e subclínica;
- Identificar agentes etiológicos envolvidos nos casos de mastite;
- Verificar perfil de sensibilidade das bactérias isoladas frente a antimicrobianos de uso comercial;
- Avaliar genes de virulência dos isolados de *Staphylococcus aureus*;
- Indicar medidas de controle, prevenção e tratamento adequadas à realidade e condições das propriedades rurais;
- Promover ações de educação sanitária aos produtores de leite.

1.3 ESTRUTURA DA TESE DE DOUTORADO

A tese está estruturada em 8 (oito) capítulos, são eles:

- **Capítulo I**, consta da introdução sobre a mastite, justificando a importância da pesquisa na região. Ainda, estão presentes os objetivos geral e específicos.
- **Capítulo II**, é apresentada a revisão de literatura, abordando os aspectos de maior relevância sobre a temática da tese. Nele, contém informações sobre a

epidemiologia, resposta imune da glândula mamária, classificação e microrganismos causadores da mastite bovina, diagnóstico, tratamento, controle e rotina de ordenha.

- **Capítulo III**, constam os resultados sobre a caracterização dos rebanhos e prevalência da mastite. Também os dados levantados nas visitas realizadas à campo, em que verificava as características produtivas dos rebanhos leiteiros, tanto por observação quanto com aplicação de questionário aos colaboradores e/ou proprietários. Além disso, os dados do diagnóstico da mastite clínica e subclínica das vacas em lactação. Foi publicado um capítulo de livro com resultados parciais deste item (Anexo A).
- **Capítulo IV**, é apresentado o perfil fenotípico dos agentes causadores de mastite na região e a importância de se conhecer a etiologia no planejamento das medidas de tratamento e controle a serem empregadas na região.
- **Capítulo V**, constam os resultados sobre os genes de virulência dos *Staphylococcus aureus*. Genes de toxinas esfoliativas (*eta* e *etb*), toxina-1 de choque tóxico (*tst*) e de mecanismo de resistência (*mecA*).
- **Capítulo VI**, é apresentado o perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados nas amostras de leite, assim como as implicações na tomada de decisão e planejamento de protocolos de tratamento estabelecidos nos rebanhos.
- **Capítulo VII**, relata a experiência à campo da realidade dos produtores e de sua percepção frente aos desafios da região, complementada por ações de educação sanitária aos produtores de leite da região.
- **Capítulo VIII**, constam as considerações finais da tese e expectativas do trabalho.

REFERÊNCIAS

- BENITES, N. R. *et al.* Genotypic evaluation of antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine clinical mastites. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.73, 2021.
- BREEN, J. E.; GREEN, M. J.; BRADLEY, A. J. Quarter and cow risk factors associated with the occurrence of clinical mastitis in dairy cows in the United Kingdom. **Journal of Dairy Science**. v. 92, 2009.
- CARVALHO, A. S. S. *et al.* Susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk to commercial antibiotics. **Ciência Animal Brasileira**. v. 19, 2018.
- DANTAS, V. V. *et al.* Nível tecnológico da pecuária leiteira no estado do Maranhão, Brasil. **Nucleus Animalium**. v. 10, 2018.
- DORNELES, E. M. S. *et al.* Genetic diversity and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* isolates from bovine mastitis in Minas Gerais, Brazil. **Microbiology Open**. v. 8, 2019.
- ELY, V. L. *et al.* Biofilm formation by *Prototheca zopfii* isolated from clinical and subclinical bovine mastitis in distinct growth conditions under different dyes. **Microbiology**. v. 49, 2019.
- FÁVERO, S. *et al.* Factors associated with mastitis epidemiologic indexes, animal hygiene, and bulk milk bacterial concentrations in dairy herds housed on compost bedding. **Livestock Science**. v. 181, 2015.
- IBGE. **Pesquisa da Pecuária Municipal, 2016**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9209-pesquisa-trimestral-do-leite.html?=&t=downloads>. Acesso em: 22 de março de 2022.
- IBGE. **Pesquisa Pecuária Municipal. MARANHÃO**: IBGE, 2022. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ma/pesquisa/18/16459>. Acesso em: 24 junho 2024.
- IMESC. **IMESC Divulga diagnóstico da atividade leiteira maranhense**. IMESC, 2023. Disponível em: <https://www.ma.gov.br/noticias/imesc-divulga-diagnostico-da-atividade-leiteira-maranhense#:~:text=No%20Maranh%C3%A3o%2C%20a%20atividade%20est%C3%A1,produ%C3%A7%C3%A3o%20e%20aumento%20da%20produtividade>. Acesso em: 24 de junho de 2024.
- KROMKER, V.; LEIMBACH, S. Mastitis treatment - Reduction in antibiotic usage in dairy cows. **Reproduction in Domestic Animal**. v. 52, 2017.
- LAVON, Y., M. *et al.* Two approaches to improve fertility of subclinical mastitic dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 99, 2019.
- LOPES, T. S. *et al.* Species identification and antimicrobial susceptibility profile of bacteria associated with cow mastitis in Southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 42, 2022.

MARQUES, V. F. *et al.* Expression of *icaA* and *icaD* genes in biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine subclinical mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 41, 2021.

MESQUITA, A. A. *et al.* *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*: prevalence, resistance to antimicrobials, and their relationship with the milk quality of dairy cattle herds in Minas Gerais state, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 39, 2019.

RAMBAULT, M. *et al.* Neutrophils expressing major histocompatibility complex class II molecules circulate in blood and milk during mastitis and show high microbicidal activity. **Journal of Dairy Science**. v. 106, 2023.

RUEGG, P. L. A 100-year review: mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science**. v. 100, 2017.

RUEGG, P. L. Minimizing the development of antimicrobial resistance on dairy farms: appropriate use of antibiotics for the treatment of mastitis. **Burleigh Dodds Science**. 2016.

SAINI, V. *et al.* Antimicrobial resistance profiles of common mastitis pathogens on Canadian dairy farms. **Journal of Dairy Science**. v. 95, 2012.

SENAR. **Perspectivas do leite no Maranhão**. SENAR MARANHÃO, 2016. Disponível em: <http://senar-ma.org.br/perspectivas-do-leite-no-maranhao/>. Acesso em: 22 de março de 2022.

SILVA, J. G. *et al.* *mecA* positive *Staphylococcus* spp. in bovine mastitis, milkers, milking environment, and the circulation of different MRSA clones at dairy cows farms in the Northeast region of Brazil. **Microbiology**, v. 52, 2022.

SOARES, B. S. *et al.* Characterization of virulence and antibiotic profile and agr typing of *Staphylococcus aureus* from milk of subclinical mastitis bovine in State of Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.69, 2017.

VERBEKE, J. *et al.* Pathogen-specific incidence rate of clinical mastitis in Flemish dairy herds, severity, and association with herd hygiene. **Journal of Dairy Science**. v. 97, 2014.

CAPÍTULO II. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MASTITE BOVINA

A mastite bovina é uma das principais enfermidades que acomete vacas leiteiras, sendo uma doença complexa e multifatorial, que leva a grandes prejuízos econômicos em toda atividade leiteira. As maiores perdas econômicas estão relacionadas à redução da produção ou descarte do leite, seja pela presença de alterações ou resíduos de antimicrobianos. Entretanto, outros fatores, não menos importante, contribuem aumentando ainda mais o prejuízo, sendo eles, os custos com medicamentos e honorário veterinário, redução da qualidade dos produtos lácteos, descarte precoce da vaca, menor taxa e/ou intervalo aumentado de concepção, aumento do risco de outras doenças, redução do bem-estar das vacas e trabalho extra dos tratadores (Schukten *et al.* 2009; Oliveira, 2015; Klass; Zadoks, 2018; Lavor *et al.*, 2019; Dalanezi *et al.*, 2020).

É necessário que os produtores tenham conhecimento sobre o impacto econômico dos custos com a mastite, pois mesmo sendo reconhecida como doença que causa os maiores prejuízos na produção de leite, essas perdas normalmente são subestimadas (Oliveira, 2015; Zigo *et al.*, 2021). No Brasil, estima-se que os prejuízos associados à mastite subclínica chegam a 5% da produção total de leite e afeta toda cadeia produtiva, desde o produtor até a indústria com redução de rendimento industrial de fabricação, diminuição da qualidade, da vida de prateleira de derivados lácteos e menor competitividade no mercado (Hogeveen; Huijps; lam, 2011).

A modificação na composição do leite de vacas com mastite pode ser devido a alterações da capacidade de síntese pelas células epiteliais da glândula mamária, inibição da síntese de componentes do leite como caseína e triglicerídeos ou ainda por morte e necrose das células epiteliais em resposta a mediadores do processo inflamatório ou a toxinas de origem bacteriana. Outro mecanismo envolvido é o aumento da permeabilidade vascular e redução da barreira sangue/leite, onde há maior passagem de proteínas, como albumina sérica e plasmina (que aumenta a proteólise da caseína), do sangue para o leite. Ainda, por alterações associadas com a resposta inflamatória, havendo aumento da quantidade de células imunes, as quais intensificam a degradação de proteínas (proteólise) e gordura (lipólise) presentes no leite. E direcionamento da glicose para a resposta imune da vaca, em vez de

biossíntese de lactose (Maréchal *et al.*, 2011; Santos; Fonseca, 2019; Blum *et al.*, 2020; Tsugani *et al.*, 2021)

Além dos componentes acima citados, vacas com mastite também apresenta aumento do teor de ácidos graxos livres, devido ação de lipases de leucócitos, que estão associados aos defeitos de sabor. Altera a concentração de minerais do leite, aumentando sódio e cloro e diminuindo teores de potássio e cálcio, e do pH. Contudo, vale destacar que as alterações são variáveis a depender do tipo de agente envolvido e intensidade da resposta inflamatória (Maréchal *et al.*, 2011).

As alterações físico-químicas e bacteriológicas no leite da vaca com mastite além de problemas na fabricação de produtos lácteos, podem resultar em riscos para saúde pública, seja pela potencialidade de alguns microrganismos causadores de mastite estarem incriminados em toxinfecção alimentar por produzirem enterotoxina, seja por promoverem transferência de genes de resistência antimicrobiana para outras bactérias (Kromker; Leimbach, 2017; Mesquita *et al.*, 2019; Benites *et al.*, 2021; Rambault *et al.*, 2023)

2.2 EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO

A prevalência da mastite bovina no Brasil é variável devido a heterogeneidade das propriedades rurais, encontrando valores que variam de 0% para mastite clínica a 85,2% para mastite subclínica, a depender das medidas de controle e prevenção empregadas nos rebanhos. Mas, de modo geral a mastite clínica apresenta menor prevalência quando comparada a forma subclínica da doença (Martins *et al.*, 2010; Mello *et al.*, 2012; Brito *et al.*, 2014; Cunha *et al.*, 2016; Silva; Silva; Bett, 2017; Oliveira *et al.*, 2020; Santos; Mendonça; Muniz, 2020; Alves, 2021; Dias *et al.*, 2021; Niero *et al.*, 2021; Pinto *et al.*, 2021; Silva; Laven; Benites, 2021; Caciano *et al.*, 2023; Sabedot *et al.*, 2023).

A mastite bovina é uma doença extremamente difícil de ser erradicada e ocorrências acima de 15% são consideradas problemas, refletindo em grandes perdas financeiras (Ribeiro *et al.*, 2006). Os prejuízos econômicos gerados pela mastite bovina são difíceis de serem calculados devido a vários fatores envolvidos nos custos diretos e indiretos, como produção e qualidade do leite, descarte do leite, descarte e reposição da vaca, bonificação do leite, custos com medicamentos, médico veterinário

e alimentação, maior trabalho dispensado à vaca pelos colaboradores, entre outros (Santos *et al.*, 2011; Fávelo *et al.*, 2015; Oliveira, 2015; Acosta *et al.*, 2016).

Estudos realizados mostram estimativas de perdas que variam de 21 a 42% da produção de leite por vaca acometida (Bardhan *et al.*, 2013; Fávelo *et al.*, 2015; Acosta *et al.*, 2016) e de 5 a 20% da produção total do rebanho (Hogeveen; Huijps, 2011; Santos *et al.*, 2011; Oliveira, 2015). Oliveira (2015), estimou um custo médio de R\$ 166,00 a R\$ 250,00 por caso de mastite a depender do agente etiológico envolvido e considerando unicamente a perda de leite como custo para mastite subclínica. Citando, ainda, as perdas na produção leiteira, a mastite bovina está associada a redução de leite que varia de 0,5 a 3,95kg de leite/vaca/dia durante as duas primeiras semanas do início do caso e um total de perda de 110 a 552kg durante a lactação, a depender de fatores associados como paridade e número de repetições de casos de mastite (Bardhan, 2013; Gonçalves *et al.*, 2018; Hadrich *et al.*, 2018; Heikkila *et al.*, 2018;).

Desta forma, é extremamente importante empregar medidas de controle e prevenção nos rebanhos a fim de diminuir a principal causa de prejuízos na bovinocultura leiteira e assim, maximizar os lucros. Dentre elas, princípios importantes de medidas a serem empregadas são o reconhecimento de fatores de risco da doença, que são características ou situações que podem aumentar a chance da doença ocorrer ou diminuir as chances de êxito no tratamento.

Os fatores de risco associados à mastite podem estar relacionados ao rebanho ou à vaca. No primeiro caso, congregam características comuns oferecidas ao grupo de vacas, como o manejo nutricional, ambiental, higiênico e os microrganismos mais prevalentes no rebanho. Ao que se refere a vaca, individualmente, cita-se: nível de produtividade, característica anatômica dos tetos e úbere, estágio de lactação, número de lactações/crias, perfil nutricional e imunológico (Verbeke *et al.*, 2014; Ruegg, 2016; Santos; Fonseca, 2019; Maalaoui *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2022).

Ao nível de rebanho e para diminuir a casuística de mastite é importante os cuidados quanto ao manejo nutricional, pois vacas em escore corporal adequado, conforme escala de Edmonson *et al.* (1989), (3 a 3,5 na escala até 5) e com suplementação de micronutrientes que favoreçam o sistema imunológico contribuem para saúde do úbere; o ambiente limpo, arejado e tranquilo colaboram não apenas com menor carga microbiana como também com menor estresse do animal e consequentemente com sua saúde. Ainda, o manejo higiênico da ordenha, que

diminuiu riscos de transmissão da mastite; e o perfil de microrganismos mais prevalentes no rebanho, onde há características de patogenicidade e transmissibilidade que são intrínsecas de cada um (Verbeke *et al.*, 2014; Santos; Fonseca, 2019; Rahimi *et al.*, 2021; Bari *et al.*, 2022).

Como fatores de risco relacionados a vaca, tem-se o período de lactação, vacas em período periparto apresentam maior risco de apresentarem mastite clínica, principalmente, devido ao déficit nutricional e do sistema imunológico nessa fase de transição. Enquanto que a mastite subclínica é maior quando mais avançado o estágio de lactação. Também, a paridade da vaca aumenta o risco de apresentar mastite e da recorrência de casos e menor chance de cura bacteriológica (Breen *et al.*, 2009; Fávero *et al.*, 2015; Maalauoi *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2022).

Apesar do número de lactações ser um fator de risco para maior ocorrência de mastite, essa doença em novilhas ou vacas primíparas também é preocupante em alguns rebanhos. E, apesar de não estar totalmente esclarecido, aponta-se como causas, a infecção intramamária ter ocorrido na fase de aleitamento, pela mamada cruzada entre as bezerras; ou após a primeira cobertura, por bactérias oportunistas da pele dos tetos que colonizam e invadem o canal dos tetos, por contaminação pelo ambiente com acúmulo de lama e umidade e por transmissão por moscas. Nesses casos, a mastite pode persistir por longos períodos o que pode desencadear o aumento da contagem de células somáticas (CCS) após o parto, desenvolvimento incompleto da glândula mamária e redução do potencial de produção de leite por toda sua vida produtiva (Vlieghe *et al.*, 2012; Bludau; *et al.*, 2014; Naqvi *et al.*, 2018; Santos; Fonseca, 2019)

Para mais, fatores relacionados as características anatômicas do úbere e das tetas como, fluxo de leite ou nível de produtividade, em que vacas com maior potencial produtivo são mais sensíveis à ocorrência da mastite; profundidade do úbere, deixando-os mais próximos ao chão; e hiperqueratose moderada ou severa, caracterizada pelo crescimento excessivo da pele da extremidade dos tetos, é fator de risco, uma vez que há alteração da condição da pele dos tetos, prejudicando a barreira primária contra a entrada de microrganismos (Breen *et al.*, 2009; Santos; Fonseca, 2019; Maalauoi *et al.*, 2021).

Outros fatores de risco, especialmente na mastite contagiosa, estão as mãos do ordenhador, panos de uso múltiplo para secagem dos tetos, teteiras desreguladas ou sem limpeza e manutenção inadequada, flutuações de vácuo e reversão do fluxo

de leite durante a ordenha, ainda, transmissão por moscas (Santos; Fonseca 2019; Zigo *et al.*, 2021; Bari *et al.*, 2022).

Diagnosticar e identificar esses diversos fatores relacionados à ocorrência e dificuldade de controlar a mastite nos rebanhos leiteiros são essenciais para os programas, afim de melhorar a sanidade, bem-estar e produção animal e qualidade e idoneidade dos produtos ofertados à população humana. Destacando que é essencial o acompanhamento do histórico do animal e dessa forma o registro é imprescindível ao longo do tempo e das lactações de cada animal do rebanho (Ruegg, 2017; Lavor *et al.*, 2019).

2.3 RESPOSTA IMUNE DA GLÂNDULA MAMÁRIA

A inflamação da glândula mamária é um dos componentes da resposta imune para eliminar os agentes etiológicos ou neutralizar toxinas produzidas por eles e auxiliar na regeneração do tecido mamário afetado.

O processo normal, não inflamatório, ou agravamento da doença depende de fatores relacionados a capacidade da resposta imune da vaca, da patogenicidade do agente agressor e de fatores ambientais que possam interferir no estresse animal. Após invasão e colonização do canal do teto e/ou glândula mamária por microrganismos ocorre o desencadeamento da resposta imune, participando do processo componentes físicos, celulares e moleculares que fazem parte da resposta imune inata e adquirida (Sordillo; Shafer-Weaver; De Rosa, 1996; Stelwagen *et al.*, 2009; Tizard, 2014; Chengolova *et al.*, 2021).

A primeira linha de defesa da glândula mamária é a imunidade inata, encontrando a barreira física e bioquímica do canal do teto, como a pele, o esfíncter e a queratina com ação antimicrobiana, sendo a primeira barreira contra microrganismos presentes no ápice do teto. Contribuem ainda, células que migram para o local, neutrófilos e macrófagos, entre outros componentes como sistema complemento, citocinas e lactoferrinas (Fang *et al.*, 2016; Chengolova *et al.*, 2021).

Após invasão por microrganismos ao lúmen da glândula mamária, as células epiteliais e macrófagos, que são células sentinelas, detectam os agentes agressores e interagem com células imunes locais tanto da imunidade inata quanto adquirida. Promovendo recrutamento maciço de neutrófilos por aumento de expressão de

mediadores pró-inflamatórios e peptídeos antimicrobianos (Stelwagen *et al.*, 2009; Kawai *et al.*, 2015; Rainard; Gilbert; Germon, 2022; Iso-Touru *et al.*, 2024).

Caso, o sistema imune inato não seja capaz de eliminar o agente agressor a imunidade adquirida é ativada e componentes como macrófagos, anticorpos e linfócitos também são ativados e diferenciados para o local. E assim, tanto o sistema imune inato quanto o adquirido atuam de forma complementar para aumentar a resistência do úbere contra infecções (Tizard, 2014; Chengolova *et al.*, 2021).

A ativação do sistema imune adquirido ocorre por meio da ligação de células T com peptídeos microbianos expressos em MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) de classe I e MHC de classe II, que, dependendo do estímulo, promove diferenciação da resposta adquirida em tipo 1, 2 e 3, sendo as do tipo 1 e 3 mais efetivas contra infecções bacterianas. A resposta imune adquirida do tipo 1 é direcionada para microrganismos intracelulares, aumentando a capacidade de eliminação de fagócitos e células infectadas. E, a do tipo 3, é caracterizada pelo recrutamento de neutrófilos e estímulo de defesas antimicrobianas epiteliais, contra bactérias e fungos extracelulares (Annunziato *et al.*, 2015; Cebon *et al.*, 2020; Iso-Touru *et al.*, 2024).

Já, a resposta imune adquirida do tipo 2, é caracterizada pela secreção especialmente de imunoglobulinas que atuam como opsoninas, na fagocitose de bactérias solúveis por ação de neutrófilos e macrófagos (Tizard, 2014; Rambault *et al.*, 2023). As principais imunoglobulinas presentes no leite são imunoglobulina (Ig) G1, IgG2, IgA e IgM, em que suas concentrações dependem da fase de lactação, estando aumentada no colostro ou durante a infecção da glândula mamária (Larson; Heary; Devery, 1980; Sordillo; Shafer-Weaver; De Rosa; 1996; Tizard, 2014).

As principais células encontradas no leite de vacas sadias são, predominantemente os macrófagos (35 - 79%), seguidos por linfócitos (16 - 28%), neutrófilos (3 - 26%) e células epiteliais mamárias (2 - 15%). Entretanto, após infecção da glândula mamária, os neutrófilos se tornam as células predominantes (> 92%) e eles, juntamente com os macrófagos têm a função de fagocitar as bactérias e outros antígenos durante a resposta imune inespecífica da vaca (Li *et al.*, 2014; Becheva; Gabrovska; Godjevargova, 2017). Também os linfócitos, tem importante papel na eliminação das bactérias através da resposta imune adquirida (Sordillo; Shafer-Weaver; De Rosa, 1996; Tizard, 2014; Ulfman *et al.*, 2020).

Diante da importância que o sistema imunológico tem em contribuir para uma resposta mais rápida e eficaz, com cura bacteriológica, dos casos de mastite, ressalta-se a necessidade de fortalecer esse sistema, especialmente por meio do manejo nutricional adequado, a fim de melhorar a capacidade de resposta imune da glândula mamária.

Esse manejo, deve garantir que micronutrientes essenciais estejam presentes na dieta como, selênio, vitamina E e A, betacaroteno, zinco, cobre que atuam no sistema imune como antioxidantes reduzindo os efeitos negativos dos radicais livres e melhorando a eficiência das células imunes e integridade de epitélios e mucosas (Ceballos-Marquez *et al.*, 2012; Ingvarsen; Moyes, 2013; Vasil *et al.*, 2017; Nelson *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018). Estas vantagens favorecem a menor incidência de infecções intramamárias e reduz a duração e gravidade da mastite clínica e CCS do leite (Santos; Fonseca, 2019).

Além de garantir os micronutrientes na dieta, também é importante prover outros cuidados com fatores que interfiram na capacidade da resposta imune como, garantir as necessidades energéticas da vaca no período periparto, devido a sua necessidade de glicose, como fonte de energia, para manter o bom funcionamento do sistema imune. Ainda vacas com cetose, tem menor disponibilidade de glicose no sangue, o que compromete o funcionamento dos neutrófilos. Também, neste período, há aumento das concentrações de cortisol no sangue, que conhecidamente reduz a função dos neutrófilos (Aleri *et al.*, 2016; Bruckmaier; Gross, 2017; Cobirka; Tancin; Slama, 2020).

Assim, é importante garantir que a vaca esteja em boa condição de escore corporal e adaptada a maior consumo de concentrado, para reduzir a mobilização de reserva corporal (Santos; Fonseca, 2019). Além de fornecer conforto térmico para evitar menor ingestão de nutrientes específicos e os efeitos imunossupressores do estresse térmico (Li *et al.*, 2014).

Outro contribuinte da resposta imune da glândula mamária é a microbiota intramamária, composta por uma diversidade de bactérias como *Ruminococcus*, *Oscillospira*, *Roseburia*, *Dorea*, *Prevotella*, *Bacteroides*, *Paludibacter*, *Bifidobacterium*, tendo papel importante na homeostasia imune. Secretando componentes antimicrobianos ou influenciando a expressão de genes da resposta imune (Derakhshani *et al.*, 2018; Andrews *et al.*, 2019; Bronzo *et al.*, 2020).

Como medida complementar no fortalecimento do sistema imune, existe vacinas que tem como objetivo maximizar a resposta imune adquirida da vaca contra patógenos específicos, aumentando a migração de neutrófilos para a glândula mamária e estimulando a produção de anticorpos. A vacinação tem como intuito prevenir novas infecções intramamárias, reduzir a gravidade de sintomas clínicos e auxiliar na eliminação de infecções crônicas (Sordillo; Shafer-Weaver; De Rosa, 1996; Ulfman *et al.*, 2018).

Os microrganismos mais comumente usados nas vacinas são: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* e coliformes (*Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. e *Klebsiella* spp.) ou derivados peptídicos entre outros (Ulfman *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018; Tomazi *et al.*, 2021). Vale ressaltar que, estudos para melhor caracterizar e compreender os mediadores do sistema imune inato e adquirido da glândula mamária da vaca estão sendo desenvolvidos. Com vistas a produzir vacinas mais eficientes no estímulo da resposta imune, tanto inata quanto adquirida, contra os diferentes microrganismos causadores de mastite bovina (Rainard *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2021; Rainard; Gilbert; Germon, 2022; Taponen; Myllys; Piorala, 2022; Raumbault *et al.*, 2023).

Além da capacidade do sistema imune da vaca, fatores relacionados aos agentes causadores da mastite também interferem na eficiência e intensidade da resposta. A exemplo, os *S. aureus* tem a capacidade de causar infecções subclínicas e crônicas pois conseguem escapar do sistema imune e regular negativamente a resposta imune da vaca (Fang *et al.*, 2016; abril *et al.*, 2020; Rambault *et al.*, 2023).

Em contrapartida, as bactérias mais comumente encontrados na ocorrência de mastite clínica, são bactérias Gram negativas apresentando lipopolissacarídeos (LPS) na camada externa da parede celular. O LPS atua como toxina bacteriana e está diretamente relacionada com a patogenicidade e resposta imune animal, assim como outros produtos metabólicos bacterianos e enterotoxinas (Sordillo; Shafer-Weaver; De Rosa, 1996; Tizard, 2014). Altas concentrações de LPS, leva a intensa migração de neutrófilos para a glândula mamária, podendo ocorrer endurecimento, inchaço, dor no quarto afetado, diminuição da produção de leite e alteração do aspecto do leite, febre, depressão, redução do consumo de alimento (Becheva; Gabrovska; Godjevargova, 2017; Santos; Fonseca, 2019).

2.4 CLASSIFICAÇÃO DA MASTITE

A mastite bovina normalmente é classificada de acordo com a forma de manifestação ou transmissão da doença. Em relação a manifestação ela pode ser classificada em mastite clínica ou mastite subclínica. E considerando sua forma de transmissão pode ser classificada em mastite contagiosa ou mastite ambiental.

As apresentações da mastite ocorrem especialmente devido aos diversos tipos de microrganismos que podem causar a doença. Existem agentes etiológicos de origem ambiental como os coliformes termotolerantes (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.), estreptococos ambientais (*S. uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus canis*), *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), fungos e algas, que normalmente tem sua transmissão ocorrendo do ambiente para a vaca, entre as ordenhas – mastite ambiental. Frequentemente, esses microrganismos não são tão bem adaptados a glândula mamária. Por isso, provocam uma resposta inflamatória mais intensa e leva ao aparecimento dos sintomas clínicos da doença – mastite clínica (Breen *et al.*, 2009; Ruegg, 2016; Santos; Fonseca, 2019).

A mastite clínica é caracterizada por alterações visíveis, como presença de grumos ou coágulos, pus, sangue ou aquosidade do leite. Esses sintomas podem estar ou não associados a sintomas de inflamação no úbere, como o edema, dor, endurecimento e febre local. Ou ainda, em casos mais graves, sintomas sistêmicos da doença como aumento da temperatura retal, depressão, desidratação, diminuição do consumo de alimentos e da produção de leite. A mastite grave é menos comum, ocorrendo de 5 a 10% dos casos de mastite clínica e normalmente são causadas por enterobactérias, especialmente *E. coli*. Contudo, tem impacto significativo devido alta taxa de mortalidade e perdas na produção de leite (Lavor *et al.*, 2019; Salat *et al.*, 2023).

Desta forma, a mastite clínica, a depender da severidade do caso, pode ser classificada em leve, quando há somente alteração no leite; moderada, se há alteração no leite e no úbere; e grave, quando existe alteração no leite, úbere e sinais sistêmicos da doença (Saini *et al.*, 2012; Lavor *et al.*, 2019; Santos; Fonseca, 2019; Lopes *et al.*, 2022).

Outros microrganismos tem sua fonte de infecção o úbere da vaca, são eles, *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma* spp. e *Corynebacterium bovis*, sendo transmitidos durante a ordenha, de vaca a vaca ou entre os tetos – mastite

contagiosa. Estas bactérias são melhores adaptadas à glândula mamária, induzindo menor resposta imunológica ou possuindo mecanismos de evasão do sistema imune que facilitam sua persistência dentro da glândula. Desta forma, permanece de maneira silenciosa, não havendo alterações visíveis no leite e nem no úbere. Porém, há alterações na composição do leite e aumento da CCS (CCS > 200.000 células/mL) – mastite subclínica (Ruegg; Pantoja, 2013; Lavor *et al.*, 2019; Santos; Fonseca, 2019; Kabelitz *et al.*, 2021; Lopes *et al.*, 2022).

Apesar de haver essa classificação entre agentes causadores de mastite contagiosa e ambiental, sabidamente a partir da biologia molecular, alguns patógenos podem ter característica de transmissão tanto contagiosa, sendo apresentada quando é isolado de diversas vacas o mesmo tipo de cepa bacteriana; quanto ambiental, quando as cepas isoladas são diferentes, indicando fontes diferentes de transmissão (Zadoks *et al.*, 2011; Wente; Kromker, 2020; Kabelitz *et al.*, 2021).

2.5 PRINCIPAIS MICRORGANISMOS CAUSADORES DA MASTITE

Cada um dos agentes etiológicos da mastite bovina, bactérias, fungos e algas, tem atributos diferentes que os definem e contribuem para outras características encontradas na mastite bem como eficiência no tratamento antimicrobiano.

S. aureus são responsáveis por 20 a 50% dos casos de mastite contagiosa, são bactérias Gram-positivas, tem maior poder de invasão nos tecidos da glândula mamária, conseguem evadir do sistema imune, formam abscessos com presença de pus e fibrose, tem sobrevivência intracelular, capacidade de produzir toxinas e de formação de biofilmes (Babra *et al.*, 2013; Konemam *et al.*, 2018; Shah *et al.*, 2019). Todas essas características às tornam menos responsivas ao tratamento com antimicrobianos, seja por resistência adquirida ou por características próprias que dificultam a chegada do antimicrobiano em concentração adequada no local onde se encontram. Normalmente a cura bacteriológica é baixa, de 0 a 40% para novilhas e apenas até 10% para o restante da categoria, essa diferença é devido, especialmente, ao epitélio da glândula mamária de fêmeas mais velhas ser mais profundo o que facilita o escape dos estafilococos de seu reconhecimento e dificilmente é erradicada do rebanho (Oliveira *et al.*, 2012; Mesquita *et al.*, 2019; Shah *et al.*, 2019).

Apesar do úbere ser o principal reservatório de *S. aureus*, outras fontes podem ser consideradas como a pele do animal e dos ordenhadores, lesões de tetos e jarrete e, moscas. Outro fator a ser considerado é que novilhas de reposição podem ser fontes de infecção, uma vez que bezerras podem ter sua glândula mamária infectadas por *S. aureus* que permanece latente até a primeira lactação (Vlieghe *et al.*, 2012; Rainard *et al.*, 2018).

Os *S. agalactiae* são bactérias Gram-positivas, formando cadeias de cocos, incriminados em até 60% dos casos de mastite no Brasil. Podem ser responsáveis também por casos clínicos esporádicos, faz uma colonização não invasiva e podem formar biofilmes. A antibioticoterapia apresenta resultados satisfatórios com grande cura bacteriológica, cerca de 90 a 95% dos casos, em curto período de tratamento. Sua transmissão é estritamente contagiosa, sendo um patógeno obrigatório do úbere (Saini *et al.*, 2012; Wente; Kromker, 2020). A infecção por *S. agalactiae* leva a rápida redução na produção de leite, porém apresenta altas taxas de cura após tratamento, que quando associado a implementação de medidas de controle e descarte de vacas com infecção crônica, permite considerável diminuição na ocorrência e até mesmo a erradicação (Keefe, 2012; Kabelitz *et al.*, 2021; Zigo *et al.*, 2021).

Mycoplasma spp. são bactérias sem parede celular rígida com crescimento lento e microaerófilas, sendo sua identificação difícil devido a necessidade de técnicas microbiológicas específicas (Konemam *et al.*, 2018). Esse agente é altamente contagioso e resistente ao tratamento com antibióticos, especialmente aos que atuam na parede celular, e persistem por toda vida produtiva da vaca sendo importante fonte de infecção. A transmissão pode ocorrer pelas mãos do ordenhador, equipamentos de ordenha e aerossóis. Leva a redução imediata da produção do leite e pode haver alteração da cor, tornando-o amarelo ou aquoso. Aquisição de vacas infectadas é a principal forma de entrada do agente no rebanho, juntamente com manejo higiênico inadequado, que ajudam a manter a transmissão de vaca a vaca (Nicholas; Fox; Lysnyansky, 2016; Gelgie; Korsa; Dego, 2022; Suzuki *et al.*, 2024).

Corynebacterium spp. também são agentes contagiosos da mastite subclínica, porém considerado agente secundário com baixo potencial patogênico. Não reduz produção do leite, gordura, proteína e caseína, causa moderado aumento de CCS. Contudo pode-se observar diminuição de teores de lactose e sólidos não gordurosos. E, não se considera o tratamento durante a ordenha (Gonçalves *et al.*, 2016; Santos; Fonseca, 2019).

A *E. coli*, responsável por 60 a 80% dos casos clínicos de mastite, são bactérias Gram-negativas, fermentadoras de lactose, causa predominantemente a mastite clínica, normalmente em casos leves (60 a 70%), tendo duração rápida, menor que 10 dias, e apresentam altos níveis de cura espontânea (Pol; Ruegg, 2007; Breen *et al.*, 2009; Suojala *et al.*, 2013). A intensidade da doença está mais associada a capacidade de resposta imune da vaca do que ao tipo da cepa infectante, apresentando maior frequência dos casos no início da lactação, principalmente pelo menor poder de resposta nessa fase (Santos; Fonseca, 2019; Zigo *et al.*, 2021).

Existe uma linha de pesquisa que sugere que *E. coli*, devido plasticidade de seu genoma, evoluiu para cepas patogênicas capazes de causar doenças na glândula mamária – *E. coli* patogênica mamária (MPEC), sendo proposto como novo patótipo. Esse ocorreu por aquisição de fatores de virulência específicos que às capacitaram a invadir a glândula mamária, sobreviver e permanecer no leite, causando infecção mais persistente e na forma subclínica e resistente a diversos antimicrobianos utilizados nos tratamentos (Spigel *et al.*, 2008; Richards *et al.*, 2015; Went *et al.*, 2020; Jung *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2021).

Klebsiella spp. são bacilos Gram-negativos, capsulados, ocorrendo em até 30% dos casos clínicos de mastite, apresentando casos mais severos, com maiores perdas na produção. São mais patogênicas e com envolvimento em muitos casos de repetição, com risco de transmissão cruzada entre espécie de humanos e vacas. Ainda, apresentam cursos longos de infecção com mais de 100 dias de duração, ocorrendo casos clínicos esporádicos com percurso subclínico, menor taxa de cura espontânea (20 a 40%) e não responde bem ao tratamento (Santos; Fonseca, 2019; Jinming *et al.*, 2023;).

Os *S. uberis* e *S. dysgalactiae*, recuperados em torno de 25% dos casos clínicos, muito associado com manejo higiênico inadequado ou associado a cama úmida, apresenta período prolongado da infecção, podendo se comportar também como mastite subclínica, sendo bem responsivos ao tratamento com antimicrobiano (Pol; Ruegg, 2007; Mesquita *et al.*, 2012; Santos; Fonseca, 2019). O maior risco de novas infecções ocorre no período seco e nos primeiros meses de lactação. Existe uma diversidade de cepas que podem estar mais adaptadas à glândula mamária e outras menos, o que as torna mais patogênica (Zadoks *et al.*, 2011; Wente; Kromker, 2020).

Além dessas bactérias, tem-se os estafilococos coagulase negativo que se tornaram muito prevalentes em casos de mastite, sendo considerados microrganismos oportunistas e secundários e que habitam a pele e canal do teto. Não causam significativa diminuição da produção e nem alteração na composição do leite, porém promovem aumento significativo da CCS. Diferente da mastite causada por *S. aureus*, elas apresentam melhores taxas de cura espontânea e de resposta aos tratamentos antimicrobianos (Mello *et al.*, 2020; Ceciliani *et al.*, 2021; Taponen; Myllys; Piorala, 2022; Wang *et al.*, 2023).

Outros agentes não bacterianos que causam mastite são os fungos, que têm baixa frequência na ocorrência da mastite, apesar de não responder ao tratamento com antibacteriano, pode haver cura espontânea. E as algas, *Prototheca sp.*, que causa mastite clínica e subclínica com alta CCS e reduzida produção de leite. Tem alta prevalência ambiental, é uma zoonose, não responde ao tratamento e animais positivos não deve permanecer no rebanho devido ao alto risco de manutenção e infecção de outras vacas. Apresenta incidência esporádica entre 0,1 a 5% das amostras, entretanto em surtos pode atingir até 30% das vacas (Scaccabarozzi *et al.*, 2011; Ruegg, 2016; Gonçalves *et al.*, 2016; Kano, 2019).

Assim sendo, é importante identificar o agente etiológico envolvido na ocorrência da mastite nos rebanhos, bem como avaliar seu perfil de resistência para implementar medidas de tratamento, controle e prevenção de novos casos, uma vez que, o agente etiológico possui características intrínsecas que favorecem ou não a cura clínica e/ou bacteriológica na vaca. Além disso, por promover adequado uso de antimicrobianos, diminuindo a ocorrência de resistência e transferência de genes de resistência para outros microrganismos inclusive de seres humanos, proporcionando menor riscos à saúde humana (Mesquita *et al.*, 2019; Benites *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2022).

2.6 DIAGNÓSTICO DA MASTITE

Os métodos de diagnóstico da mastite são essenciais na avaliação da saúde do úbere, fornecendo informações acerca da frequência de vacas doentes e sadias no rebanho, agente etiológico envolvido nos casos e frequência de casos novos e crônicos de mastite, bem como, fatores de risco envolvidos (idade, estágio de lactação, época do ano). O diagnóstico precisa ser rápido, precoce e específico para

prevenção da mastite e manejo e/ou terapia adequada (Kromker; Leimbach, 2017; Sharum *et al.*, 2021; Bari *et al.*, 2022).

A mastite clínica é caracterizada por alterações visíveis no leite e/ou úbere associada ou não com sinais sistêmicos da doença. Assim, para o diagnóstico da mastite clínica é utilizado a caneca de fundo escuro ou caneca telada coletando os primeiros jatos de leite a fim de detectar alterações visíveis no leite como presença de grumos ou coágulos, pus, sangue ou aquosidade. Além das alterações no leite, deve-se realizar a inspeção do úbere ou quarto mamário afetado observando a presença ou não de inflamação e verificação de sintomas sistêmicos na vaca (Langoni *et al.*, 2017; Martins *et al.*, 2020; Tommasoni *et al.*, 2023).

Esses sinais contribuem para a classificação da mastite clínica em leve (alterações apenas no leite), moderada (alterações no leite e no úbere e/ou tetas) ou grave (alterações no leite, úbere e sinais sistêmicos da doença). Essa classificação auxilia na determinação do tratamento, se apenas local ou sistêmico, se terapia prolongada ou não, ou uso de terapia suporte (Pinzón-Sánchez; Ruegg, 2011; Verbeke *et al.*, 2014; Langoni *et al.*, 2017).

No diagnóstico da mastite subclínica, no qual há alterações na composição do leite, havendo, entre outras, alterações na quantidade das células somáticas, sendo considerada positivas, vacas com CCS superiores a 200.000 células/mL. O método de CCS pode ser realizado pelo microscópico ou por equipamentos eletrônicos automatizados e permite a realização de grande número de análises em pouco tempo. Para um diagnóstico mais rápido e versátil, foi desenvolvido kits Somaticell® e Ekomilk scan® com resultados comparados à contagem eletrônica realizada em laboratório. O teste permite sua utilização em campo com resultados imediatos da mastite bovina (Dias, 2007; Rosa *et al.*, 2009; Adkins; Middleton, 2018; Martins *et al.*, 2020; Monte *et al.*, 2021).

Outro método que avalia indiretamente a quantidade de células somáticas presente no leite é o CMT (*California Mastitis Test*), que é um método mais prático e de menor custo realizado diretamente no rebanho. Teste indireto, que estima a CCS com base na gelatinização ou viscosidade da mistura do leite com o reagente em uma relação 1:1, ou seja, 2mL de leite adicionando 2mL do reagente de CMT (detergente aniônico neutro), realizado em cada quarto mamário individualmente. O reagente promove a lise celular, liberação de ácido nucléico e formação de uma matriz semelhante a gel. O resultado é dado em cinco escores, negativo, traços, fracamente

positivo (+), positivo (++) ou fortemente positivo (+++), conforme sumarizado na Tabela 1 (Philpot; Nickerson, 2002; Dias, 2007; Rosa *et al.*, 2009; Duarte; Freitas; Bexiga, 2015; Wethal; Svendsen; Heringstad, 2020; Tommasoni *et al.*, 2023).

Tabela 1 - Interpretação do *California Mastitis Test* (CMT) e valores aproximados de células somáticas equivalentes

Classificação	Formação do gel	Células somáticas por mL
0+	Ausente	0 - 200.000
Traço	Pequena formação	150.000 - 500.000
+	Pequena a moderada	400.000 - 1.500.000
++	Moderada	800.000 - 5.000.000
+++	Consistente	>5.000.000

Fonte: Philpot; Nickerson (2002).

O *Wisconsin Mastitis Test* (WMT) é um teste de laboratório, que utiliza o mesmo reagente que o CMT. Entretanto, a reação não é estimada, mas sim medida pela altura do gel em tubo, o que leva a resultados mais precisos, eliminando a subjetividade do teste de CMT (Dias, 2007; Duarte; Freitas; Bexiga, 2015; Martins *et al.*, 2020; Wethal; Svendsen; Heringstad, 2020).

Outro teste para medir a saúde do úbere é por meio da condutividade do leite, este teste analisa a variação de íons devido ao aumento da permeabilidade vascular que ocorre durante inflamação do úbere. O que leva a modificações na condutividade elétrica do leite. Pode medir o aumento nos níveis de sódio, potássio, cálcio, magnésio, cloreto e pH. Método utilizado na detecção de mastite em robôs de ordenha (Duarte; Freitas; Bexiga, 2015; Wethal; Svendsen; Heringstad, 2020).

O diagnóstico microbiológico é uma importante ferramenta, pois direciona o tratamento, auxiliando o produtor a agir no foco, em medidas de controle e prevenção voltadas para o agente causador da mastite. Há as culturas realizadas em laboratório, em que o leite deve ser colhido assepticamente em frasco limpo e estéril e enviado, resfriado ou congelado, o mais rapidamente para o laboratório para ser processado. Há ainda, *kits* que permitem a identificação etiológica da mastite em até 24 horas na própria propriedade rural, com custos menores e pequena estrutura a ser montada. A identificação do agente etiológico de forma rápida contribui significativamente com a tomada de decisão mais assertiva no tratamento empregado e medidas de controle da mastite (Adkins; Middleton, 2018; Monte *et al.*, 2021; Zadocks *et al.*, 2023).

Além desses, existem outros métodos de diagnóstico, não tão amplamente usados, devido a custos, disponibilidade e/ou padronização. Entre eles, os testes de genotipagem e fenotipagem, que incluem transcriptoma, proteômica, reação em cadeia da polimerase (PCR) e sua variada aplicação (PCR em tempo real, multiplex), MALDI-TOF MS, AFLP, RFLP, MLVA, imunoenaios, biomarcadores (Kalmus *et al.*, 2013; Duarte; Freitas; Bexiga, 2015; Barreiro *et al.*, 2017; Kovacic *et al.*, 2019; Nirala *et al.*, 2020; Iso-Touru *et al.*, 2024).

Na rotina da propriedade rural, é recomendado realizar diariamente o teste da mastite clínica e, ao menos, mensalmente o teste da mastite subclínica em todas as vacas em lactação, exceto as vacas com casos clínicos ou em tratamento e as com menos de sete dias de lactação (Santos; Fonseca, 2019; Monte *et al.*, 2021).

2.7 TRATAMENTO

Os antimicrobianos são empregados no processo de controle e prevenção da mastite a fim de eliminar os casos existentes ou prevenir novos casos. Em razão da importância do uso de antimicrobianos para a manutenção da saúde, do bem-estar da vaca e da produtividade leiteira, preconiza-se que o tratamento com antimicrobianos seja realizado de forma prudente e responsável, visando minimizar os riscos de resistência bacteriana, manter a eficácia do uso a longo prazo e reduzir resíduos no leite. Desta forma, é grande a preocupação com novos manejos de controle e tratamento que busquem mais efetividade nos programas de mastite, com significativa redução do uso de antimicrobianos (McCubbin *et al.*, 2022; Zhang; Boonyayatra; Niu, 2022).

Para avaliar a eficácia do tratamento empregado, pode definir como critérios, a cura clínica, na qual há eliminação dos sintomas por pelo menos 14 dias após o tratamento; cura bacteriológica, em que há resultado negativo na cultura realizada nos dias 14 e 21 após tratamento; e redução da CCS para valores inferiores a 200.000 células/mL (Santos; Fonseca, 2019; McCubbin *et al.*, 2022).

O sucesso do tratamento varia de acordo com as características da vaca, como idade, estágio de lactação, *status* do sistema imune, severidade da mastite clínica, histórico de casos de mastite clínica ou subclínica, CCS e número de quartos afetados; patógeno causador, referente a sua patogenicidade e sensibilidade aos antimicrobianos; e protocolo de tratamento, considerando espectro de atividade da

droga, via de administração, concentração no local da infecção e duração do tratamento (Tiwari *et al.*, 2013; Kromker; Leimbach, 2017; Sharun *et al.*, 2021).

Apesar do teste de sensibilidade do patógeno aos antimicrobianos, sugerirem as drogas mais eficazes, nem sempre a taxa de cura é 100% garantida, devido a divergências dos resultados encontrados *in vitro* e *in vivo*. Nesse sentido, é importante mencionar que a biologia e adaptabilidade do patógeno ao hospedeiro pode alterar variadas situações que os torna mais resistentes à ação dos antimicrobianos. Situações como adaptação à glândula mamária, desenvolvimento de microabscessos, formação de biofilme, são fatores que tornam os antimicrobianos ineficientes, sendo frequente em infecções intramamárias causadas por *S. aureus* (Kromker; Leimbach, 2017; Rainard *et al.*, 2018).

Vários são os protocolos de tratamento para mastite, como tratamento durante a lactação, secagem de vaca antecipada, tratamento da vaca seca, tratamento completo de secagem, selante, secagem permanente do teto ou descarte da vaca. A escolha de cada um depende de condições relacionadas a vaca, ao patógeno e ao tipo de mastite e visa o uso racional de antimicrobianos. Evitando-se usar para aqueles tetos ou vacas que não tem critérios para inclusão no protocolo de tratamento com antimicrobiano (Hassan *et al.*, 2020; Zigo *et al.*, 2021; McCubbin *et al.*, 2022; Zhang; Boonyayatra; Niu, 2022).

O tratamento durante a lactação, normalmente é indicado para vacas com mastite clínica. Entretanto, como alguns agentes etiológicos tem alta taxa de cura espontânea, nem sempre é necessário o uso de antimicrobianos. Por exemplo, mastite clínica leve ou moderada causado por bactérias Gram-negativas, como *E. coli*, pode ser tratada somente com anti-inflamatório não esteroide e aguardar o desaparecimento das alterações do leite até 36 horas (Kromker; Leimbach, 2017; Santos; Fonseca, 2019; Zigo *et al.*, 2021).

Apenas nos casos sem expectativa de cura e sensibilidade aos antimicrobianos, ou quando a vaca se encontra em imunossupressão (período de transição, intenso balanço energético negativo e ocorrência de outras doenças), ou ainda nos casos grave da doença é indicado o uso de antimicrobianos (Suojola *et al.*, 2013; Ruegg, 2017; Santos; Fonseca, 2019).

A duração mais recomendada é a de tratamento curto, de três a quatro dias, no entanto, para patógenos como *S. agalactiae* é recomendado tratamento estendido com duração de sete dias. Para o restante, a indicação é o tratamento curto, pois não há

evidências de que aumentar o tempo de duração aumentará as chances de cura bacteriológica. (Tiwari *et al.*, 2013; Santos; Fonseca, 2019; Van Den Borne *et al.*, 2019).

O protocolo de tratamento de vacas com mastite clínica grave deve realizar a terapia com antimicrobiano intramamário associada a terapia de suporte com fluidoterapia via oral (sonda esofágica) e/ou sistêmica, uma vez que a desidratação é o sintoma com maior risco imediato de morte do animal. Recomenda-se também a administração injetável de antibióticos contra bactérias Gram-negativas, devido a probabilidade de bacteremia. Ainda, administração de anti-inflamatórios não esteroidal para diminuir resposta inflamatória e consequentemente sintomas de dor, desconforto e febre (Roberson, 2012; Suojala *et al.*, 2013; Langoni *et al.*, 2017).

Quando não se conhece o patógeno causador da mastite clínica, nem o histórico da vaca recomenda-se o tratamento imediato da vaca em lactação após o diagnóstico dos casos clínicos pelo teste da caneca (Santos; Fonseca, 2019).

A secagem antecipada é recomendada para vacas em estágios avançados de lactação, baixa produção, com prenhez confirmada e com alta CCS durante mais de dois meses consecutivos. Visto que, a taxa de cura destas infecções com tratamento de vaca seca é superior àquela observada durante a lactação (Santos; Fonseca, 2019; Hassan *et al.*, 2020).

A terapia da vaca seca utiliza antimicrobiano intramamário e é recomendado para os casos de mastite subclínica na lactação, ou histórico clínico de repetições na lactação. Possibilita a redução de aproximadamente 80% das infecções existentes na secagem (origem contagiosa) e ainda controla o aparecimento de novas infecções no período seco (origem ambiental), otimizando a produção de leite na lactação seguinte (Cameron; Keefe, 2014; Naqvi *et al.*, 2018; Weber *et al.*, 2021; McCubbin *et al.*, 2022; Rowe *et al.*, 2023).

Os melhores resultados no tratamento da vaca seca, são provavelmente, devido à ausência do efeito diluidor causado pelo leite durante o período de lactação e melhor distribuição e ação por período maior de tempo (Cameron *et al.*, 2015; Derakhshani *et al.*, 2018). Outro efeito benéfico nesse tipo de tratamento é a não geração de descarte do leite e risco mínimo de resíduo, quando o período mínimo de carência é respeitado.

A mastite subclínica (em que o leite pode ser vendido), diferentemente da mastite clínica (em que o leite não pode ser vendido para consumo humano), não é

recomendado o tratamento durante a lactação, pois é economicamente inviável. Salvo, se o rebanho apresentar alta prevalência de mastite subclínica por *S. agalactiae*, que apresenta redução de CCS no tanque, melhoria na produção de leite e eliminação da fonte de infecção para o restante do rebanho (Steeneveld *et al.*, 2011; Langoni *et al.*, 2017; Gussmann *et al.*, 2019).

A terapia completa de secagem, que inclui a terapia da vaca seca mais o selante, é indicada apenas para vacas/tetos que apresentaram alta CCS no final da lactação. Este tratamento inclusive, se mostrou mais eficaz na prevenção de novas infecções intramamárias no período seco e de mastite clínica no pós-parto (Mutze *et al.*, 2012; Rabiee; Lean, 2013; Hassan *et al.*, 2020; Rowe *et al.*, 2023). Devido ao uso racional de antimicrobianos, não é recomendado que todas as vacas sejam tratadas com antimicrobianos no período seco. Desta forma, é indicada para receber o protocolo de tratamento completo de secagem, vacas primíparas com valores de CCS >100.000 células/mL e vacas pluríparas com CCS > 200.00 células/mL ou com exame microbiológico positivo (Zecconi *et al.*, 2019; Weber *et al.*, 2021; McCubbin *et al.*, 2022; Rowe *et al.*, 2023).

A terapia com selante funciona como barreira física no canal dos tetos, prevenindo novas infecções intramamárias por patógenos ambientais na glândula mamária da vaca após o término da lactação. Essas infecções ocorrem porque a formação do tampão de queratina demora entre uma a duas semanas após a secagem, ou até mais tempo, para selar totalmente o canal do teto. Sendo assim, o esfíncter permanece aberto, sendo um fator de risco para entrada de microrganismos ambientais (Mutze *et al.*, 2012; Naqvi *et al.*, 2018; Hassan *et al.*, 2020).

Desta forma, o selante é indicado para todas as vacas/tetos sadios ou na associação com a terapia da vaca seca, contribuindo para menor ocorrência de mastite no início da lactação e menor uso de antimicrobianos em vacas sem CCS alta no final da lactação anterior (Rowe *et al.*, 2020; McCubbin *et al.*, 2022).

Secagem permanente do teto ou descarte da vaca, são decisões difíceis de serem tomadas pelo produtor, pois vários fatores estão envolvidos na relação custo-benefício, como perda da produção de leite pelo teto e/ou vaca, custo com reposição de nova vaca, produção e genética animal entre outros. A decisão deve considerar outros fatores como, o patógeno envolvido, quando ele não responde ao tratamento (leveduras, *Mycoplasma* spp., *Prototheca* spp., *Serratia* spp.); a vaca, considerando seu nível de produção leiteira, eficiência reprodutiva, ocorrência de outras doenças; e

a ocorrência de mastite, em que vacas que mantêm alta CCS durante a lactação e com histórico de mais de três casos clínicos de mastite na mesma lactação e que não respondem ao tratamento durante a lactação e da vaca seca, apresentam baixa taxa de cura e são potenciais fonte de transmissão de mastite contagiosa (Nicholas; Fox; Lysnyasnky, 2016; Alves *et al.*, 2017; Ruegg, 2018; Dos Anjos *et al.*, 2019). Desta forma, o descarte pode ser recomendado quando a vaca em análise não tem justificativa, econômica ou sanitária, de permanecer no rebanho.

Após o tipo de terapia a ser indicado para cada caso, deve-se ter cuidados básicos na aplicação dos medicamentos intramamários, de forma que permita a distribuição uniforme dos medicamentos no interior do úbere, sem causar a introdução de bactérias ou lesão no canal do teto. É necessário ter atenção, também com as condições de higiene da bisnaga, das mãos do aplicador e do teto (Tiwari *et al.*, 2017; Santos; Fonseca, 2019).

Outros cuidados são com o período de carência dos antibióticos, que deve ser estritamente respeitada para evitar a ocorrência de resíduos no leite. Quando o tratamento intramamário é feito em um único quarto com mastite ocorre absorção do antimicrobiano do leite para a corrente sanguínea, e posteriormente há transferência dos resíduos do antibiótico para os demais tetos. Assim, deve-se descartar o leite de todos os quartos, durante o período de carência, conforme as recomendações da bula. Os resíduos de antimicrobianos no leite podem acarretar perdas como, prejuízos da imagem do leite como alimento seguro para os consumidores, riscos de saúde pública, perdas de processamento do leite e perdas na bonificação ao produtor (Langoni *et al.*, 2017; Santos; Fonseca, 2019).

Tratamentos alternativos são novas perspectivas de sucesso nos tratamentos empregados além de redução do uso de antimicrobianos, sendo que alguns necessitam de mais estudos para comprovações ou efetividade *in vivo* ou viabilidade financeira. Esse é o caso do *S. aureus*, microrganismos considerados de grande problema nos rebanhos leiteiros, devido suas características intrínsecas de resistência. Muitos estudos são voltados para seu tratamento e tem demonstrado atividade contra eles ou outras espécies resistentes. Estudos com bacteriófagos tem apresentado ação contra microrganismos formadores de biofilmes, sendo estáveis, altamente líticos além de induzirem resposta humoral e memória imunológica (Tiwari *et al.*, 2014; Varela-Ortiz *et al.*, 2018; Titze *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2021). Também as endolisinas derivadas de bacteriófagos são efetivas contra patógenos Gram-positivos

por degradação de sua parede celular ou desestruturação de biofilme (Fenton *et al.*, 2013; Breyne *et al.*, 2017).

Formulações de antimicrobianos associados com peptídeos (defensinas, catelicinas, bacteriocinas) são capazes de invadir o microrganismo e ainda, tem importância no mecanismo da resposta imune da vaca (Langer *et al.*, 2017; Gurão *et al.*, 2017; Moravej *et al.*, 2018; Castelani *et al.*, 2019; Amaral *et al.*, 2022). Uso de probióticos, especialmente as bactérias ácido lácticas, tem aumentado a proteção contra mastite, podendo ser adicionadas como suplemento na alimentação ou inoculadas via intramamária apresentando potente atividade imunomoduladora. Os probióticos formam biofilmes que inibem crescimento de agentes causadores de mastite, mostrando importante papel na prevenção de novos casos (Rainard; Foucras, 2018; Hu *et al.*, 2019; Pellegrino *et al.*, 2019).

A fitoterapia é um tratamento promissor no tratamento de mastite e sem efeitos adversos, sendo considerado antibacteriano, anti-inflamatório, analgésico e imunomodulador (Xu *et al.*, 2015; Tiwari *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2019). Terapia fundamentada em nanopartículas, com uso de ouro, prata, cobre, própolis têm sido estudados para tratamento de mastite com resultados positivos. Apresentando efeitos contra *S. aureus*, *S. aureus* resistente a meticilina e vancomicina, *S. agalactiae* (Algharib *et al.*, 2017; Zuh *et al.*, 2018; Castelani *et al.*, 2019; Kalinska *et al.*, 2019).

Terapia com células tronco auxilia na manutenção da saúde do úbere, uma vez que tem atividade antibacteriana, melhora a resposta imune e ainda auxilia no restabelecimento do tecido epitelial da glândula mamária (Cahuascano *et al.*, 2019; Peralta *et al.*, 2020). A pulsoterapia, pode quebrar o tecido cicatricial e melhorar a revascularização do tecido mamário e consequentemente melhorar a produção leiteira de vacas com mastite (Leitner *et al.*, 2018).

2.8 CONTROLE DA MASTITE

Implantação de medidas de controle da mastite são essenciais para melhorar a produtividade, saúde e bem-estar das vacas, qualidade do leite e dos subprodutos lácteos. Desse modo, é importante conhecer os dados do rebanho em relação a ocorrência de mastite clínica e subclínica; produtividade das vacas; manejo nutricional; manejo higiênico da ordenha, dos equipamentos e do ambiente; manejo de tratamento durante a lactação e no período seco; treinamento periódico de

colaboradores; bem como os prejuízos econômicos ocorridos. Para tal, é necessária uma rotina de ordenha e de coleta de dados para avaliação do rebanho leiteiro (Stelwagen *et al.*, 2009; Santos; Fonseca, 2019; Zigo *et al.*, 2021).

Os objetivos básicos do controle da mastite são reduzir as novas infecções intramamárias, reduzir a duração e eliminar casos existentes e monitorar continuamente a saúde da glândula mamária dos animais que integram o rebanho. A redução de novas infecções pode ser obtida por medidas de higiene de ordenha (pré e pós-*dipping*) e de manejo do ambiente, adequado funcionamento do sistema de ordenha, uso de selantes de tetos na secagem, aumento da capacidade de resposta imune da vaca (Hovinen; Pyorala, 2011; Simões; Sá; Sá, 2016; Maalaoui *et al.*, 2021; Zigo *et al.*, 2021).

Por outro lado, a eliminação de infecções existentes e redução da duração pode ser obtido pelo tratamento de vaca seca, descarte de vacas com mastite crônica e o tratamento durante a lactação, quando recomendado. Finalmente, o monitoramento continuado das vacas individualmente e do rebanho, serve para avaliar o sucesso das medidas de controle introduzidas e a necessidade de medidas adicionais mais específicas (Hovinen; Pyorala, 2011; Oliveira, 2015; Malaoui *et al.*, 2021).

Implantações de medidas de controle e alterações de manejo do rebanho devem levar em consideração as prioridades, os objetivos e as características individuais do produtor, a situação financeira e o potencial de crescimento da propriedade rural. Deve-se considerar que as mudanças devem ser empregadas aos poucos e de acordo com as prioridades, sendo feita com base na facilidade de implantação; impacto da mudança na melhoria da saúde úbere, custos e retorno econômico associado (Santos; Fonseca, 2019; Bari *et al.*, 2022).

O *National Mastitis Concil* (2001) recomenda um programa de controle completo da mastite fundamentado em 10 pontos:

1. Implantar rotina de coleta de dados sobre sanidade do úbere: realizar diagnóstico da mastite clínica diariamente e subclínica mensalmente, identificando a vaca, o quarto afetado e a intensidade da reação, data e duração do caso e tratamento utilizado;
2. Definir metas de indicadores de sanidade do úbere do rebanho: a partir dos indicadores de CCS, ocorrência da mastite clínica e subclínica mensal e identificação dos agentes causadores de mastite;

3. Manter as vacas em ambiente limpo e confortável: o ambiente onde as vacas permanecem deve ser limpo, confortável e com lotação adequada, reduzindo contaminação dos tetos e risco de novos casos de mastite ambiental, bem como estresse animal. Além disso, importante manter a higiene e limpeza das instalações das vacas secas e em lactação e da maternidade;
4. Excelente rotina de ordenha: teste da caneca de fundo preto, desinfecção dos tetos antes da ordenha, secagem com papel descartável individualizada para cada teto, tempo correto da colocação das unidades de ordenha;
5. Rotina de manutenção e uso adequado do equipamento de ordenha: equipamento deve passar por avaliação e manutenção periódica para garantir o bom funcionamento e manutenção da saúde da glândula mamária. Ainda, haver treinamento dos ordenhadores para evitar falhas no uso da ordenhadeira;
6. Tratamento da mastite clínica quando recomendado: casos de mastite clínica devem ser tratados prioritariamente com base na identificação etiológica ou imediatamente após diagnóstico para retorno imediato da produção normal. A escolha do medicamento deve considerar o histórico do rebanho e as informações sobre os agentes causadores e o leite deve ser descartado durante o tratamento e o período de carência;
7. Controle da mastite na secagem: recomenda-se que todas as vacas que tiveram mastite subclínica ou clínica devem receber tratamento da vaca seca. As vacas sadias (baixa CCS e se histórico de mastite clínica na lactação) podem ser tratadas somente com selante de tetos na secagem;
8. Descarte e/ou segregação de vacas com mastite crônica: devem ser ordenhadas por último ou selecionadas para descarte, pois são potenciais fontes de infecção e tem baixa taxa de cura bacteriológica;
9. Implantação de medidas de biossegurança contra a mastite contagiosa: obter informação quanto a sanidade do úbere das vacas adquiridas, realizar diagnóstico da mastite e cultura e identificação de agentes caso obtenha resultado positivo nos testes de diagnóstico, segregar vacas com problemas como alta CCS ou com histórico de mastite contagiosa;

10. Avaliação periódica das medidas de controle de mastite: para identificar se as metas de sanidade do úbere foram atingidas ou se necessitam de ajustes. Algumas medidas como manejo de ordenha e protocolos de tratamento precisam ser constantemente avaliadas devido a dinâmica dos agentes causadores, mudanças de colaboradores, variações sazonais e disponibilidade de novas tecnologias.

Outras medidas adicionais recomendadas aos programas de controle da mastite são manejo nutricional adequado, minimizando o balanço energético negativo e que vise o fortalecimento do sistema imunológico da vaca (Ceballos-Marquez *et al.*, 2012; Vlieghe *et al.*, 2012; Ingvarssen; Moyes, 2013; Nelson *et al.*, 2018). Implantar linha de ordenha para evitar a transmissão de patógenos durante a ordenha, ordenhando na ordem as vacas primíparas e as que não tem histórico de mastite, seguindo as que tiveram mastite, mas que estão curadas, as vacas com mastite subclínica e por fim as que estão com mastite clínica. Lembrando que o leite das vacas com mastite clínica ou em tratamento deve ser descartado (Vlieghe *et al.*, 2012; Zigo *et al.*, 2021; Bari *et al.*, 2022).

Atenção deve ser dada à formação de linha de ordenha, devido novilhas poderem estar infectadas com *S. aureus*, por exemplo, e representar uma importante fonte de infecção na ordenha de parceiras lactantes não infectadas, representando um desafio na biossegurança (Vlieghe *et al.*, 2012). E ainda, outras vacas adquirirão a infecção e não serem diagnosticadas. Assim, é imprescindível a avaliação constante da saúde do úbere, a partir do período de colostro (4º ao 6º dia) inclusive com CMT, para correta definição de fatores de risco (Nickerson; Kautz; Nace, 2013).

Também é importante o controle de moscas em propriedades que tenham problemas, porque elas podem atuar como vetores na transmissão de patógenos (Vlieghe *et al.*, 2012; Bludau; *et al.*, 2014; Naqvi *et al.*, 2018; Rainard *et al.*, 2018). E, em rebanhos com alta prevalência de novilhas (> 15%) ou primíparas com mastite no primeiro mês de lactação é indicativo de problema durante a criação das bezerras e/ou novilhas. Neste caso, recomenda-se evitar mamada cruzada na fase de criação das bezerras, ambiente adequado para essa categoria sendo limpo, higiênico e separado das vacas multíparas, reduzir incidência de edema no úbere. Deve ainda, minimizar estresse próximo ao parto e avaliar tratamento de vaca seca de novilhas e/ou aplicação de selantes de tetos no pré-parto. Uma vez que o tratamento apresente altas

taxas de cura, menor será a perda na produção leiteira e menor CCS (Borm *et al.*, 2006; Vlieghe *et al.*, 2012; Bludau *et al.*, 2014; Naqvi *et al.*, 2018).

É importante monitorar constantemente a saúde do úbere das vacas e os fatores de risco, bem como avaliar as medidas de controle empregadas, adequando-as à situação da propriedade rural, devendo haver rotina na coleta de dados, para facilitar a tomada de decisão. Assim, o processo se torna dinâmico e com melhores resultados no controle e prevenção da mastite.

Para isso, alguns pontos devem ser sempre observados, como o aumento de novas infecções, podendo indicar deficiência das medidas de prevenção, principalmente durante a ordenha e no manejo do ambiente. Fatores de risco como a rotina da ordenha, escore de extremidade de tetos (hiperqueratose), condição de higiene das vacas antes da ordenha, condição de higiene das camas e do ambiente. Realizar cultura microbiológica, no mínimo das vacas com mastite crônica, para identificar o agente causador e as medidas recomendadas para o tratamento na lactação ou no período seco, secagem antecipada ou definitiva do quarto afetado, segregação ou descarte (Steenefeld *et al.*, 2011; Gussmann *et al.*, 2019).

Alta CCS nas vacas (> 15%) no 1º mês de lactação é sugestivo de novas infecções durante o período seco ou infecções da lactação anterior que não curaram durante o período seco (infecções crônicas) (Benites *et al.*, 2002; Berry; Hogeveen; Hillerton, 2004; Bari *et al.*, 2022). Contribui ainda, acompanhamento com médico veterinário, para identificar os fatores de risco e avaliar a saúde do úbere das vacas; definir metas de curto prazo e metas de controle; planejar e implantar medidas de controle e ferramentas de monitoramento adequadas para a realidade de cada propriedade rural.

2.9 ROTINA DE ORDENHA

Para a produção de leite de alta qualidade, recomenda-se que as vacas sejam alojadas em ambiente adequado e que estejam implementadas nas propriedades rurais boas práticas de ordenha para reduzir o risco de mastite. Devendo assim, proporcionar ambiente limpo e seco para vacas em lactação, vacas secas e maternidade; boas condições de higiene e saúde do úbere e tetos antes da ordenha; manejo de ordenha visando reduzir a contaminação ambiental dos tetos; manutenção

apropriada e utilização correta do equipamento de ordenha (Hovinen; Pyorala, 2011; Bradley *et al.*, 2018; Campos *et al.*, 2022).

A rotina de ordenha é um dos pontos críticos de controle da mastite pois podem aumentar os riscos de novas infecções intramamárias através da falta de higiene do úbere e tetos e do ordenhador, falta de rotina de procedimentos da ordenha, funcionamento e higiene do equipamento de ordenha. Os princípios básicos de rotina eficiente de ordenha são: ordenhadores bem capacitados; ordenha de tetos limpos e secos; desinfecção dos tetos antes da ordenha; adequada estimulação da ejeção do leite; ordenha eficiente e rápida do leite; desinfecção dos tetos após a ordenha. Esses princípios, juntamente com equipamentos de ordenha bem mantidos e utilizados, previnem novos casos de mastite e reduzem o risco de lesões nos tetos (Hovinen; Pyorala, 2011; Dang *et al.*, 2013; Santos; Fonseca, 2019; Zigo *et al.*, 2021).

Apesar da rotina da ordenha ser planejada de acordo com as condições de cada propriedade, há princípios básicos de rotina de ordenha que pode ser feita para qualquer rebanho. Principais etapas da rotina de ordenha (Massote *et al.*, 2019; Santos; Fonseca, 2019; Zigo *et al.*, 2021):

1. Entrada das vacas na sala de ordenha: que seja realizada de forma tranquila e sem agressões, uma vez que situações de estresse da vaca antes da ordenha desencadeia liberação de adrenalina e dificulta a descido do leite;
2. Higiene e lavagem completa das mãos do ordenhador com água e sabão: as mãos do ordenhador pode ser fonte de contaminação e transmissão de agentes como *S. aureus*, assim é importante a higienização adequada, bem como o uso durante o processo de ordenha de luvas para reduzir a transmissão e manter a integridade da pele das mãos;
3. Lavagem dos tetos: deve ser evitada em vacas com tetos visivelmente limpos, sendo necessária apenas em vacas com tetos sujos com matéria orgânica. Nesses casos, utilizar mangueira de baixa pressão e lavar somente os tetos, evitando molhar o úbere que não entra em contato com as teteiras ou mãos do ordenhador;
4. Retirar os primeiros jatos de leite: retirar os primeiros três a quatro jatos de leite em caneca telada ou de fundo escuro. Com esse procedimento realiza-se o diagnóstico da mastite clínica, além de estimular os tetos

para descido do leite (estimula a ocitocina que tem concentração máxima após 60 a 90s) e retirar os primeiros jatos de leite com maior contaminação microbiana;

5. Desinfecção dos tetos antes da ordenha (*pré-dipping*): aplicar ou imergir o desinfetante em cada teto da vaca e deixar agir por 30 segundos. Essa etapa reduz a contaminação dos tetos antes da ordenha, diminuindo os riscos de novas infecções causadas por agentes ambientais. Os desinfetantes mais usados são a base de iodo, clorexidina e cloro (hipoclorito de sódio);
6. Secagem dos tetos: secar completamente os tetos individualmente com papel toalha descartável ou toalhas de tecido individuais. Reduz a contaminação bacteriana, evita a presença de resíduos de desinfetante no leite e deslizamento de teteiras;
7. Colocação das teteiras: colocar as teteiras de forma adequada para evitar flutuações de vácuo, deslizamento de teteiras, desconforto para a vaca e trabalho adicional para ordenhador. Colocação adequada da teteira evita riscos de novos casos de infecção intramamárias e aumento da contagem bacteriana total no taque;
8. Ordenha e retirada das teteiras: a fase de ordenha deve ser acompanhada cuidadosamente para recolocar as teteiras imediatamente após deslizamento e em caso de não haver extrator automático de teteira, o ordenhador deve desligar o vácuo e retirar manualmente as teteiras. Nesta fase, deve-se evitar a sobre-ordenha, por ser uma das principais causas de hiperqueratose dos tetos. Não se recomenda pressionar o conjunto de ordenha para baixo no final da ordenha, pois aumenta o risco de lesão da extremidade dos tetos e entrada de ar nas teteiras;
9. Desinfecção dos tetos após a ordenha (*pós-dipping*): solução desinfetante deve ser aplicada, preferencialmente com aplicador sem retorno para evitar a contaminação da solução desinfetante, em toda superfície dos tetos que entra em contato com as mãos do ordenhador e/ou teteiras. Os principais produtos utilizados são: iodo, clorexidina, ácido láctico, hipoclorito de sódio, dióxido de cloro. Procedimento essencial para reduzir contaminação da pele dos tetos por patógenos

contagiosos causadores de mastite que tiveram contato com teto durante a ordenha (resíduos de leite contaminado de vacas infectadas e bactérias ambientais). Desta forma, reduz a colonização do canal do teto por estes patógenos. Entretanto, esse procedimento não é recomendado para sistemas de produção com bezerro ao pé da vaca. Após o *pós-dipping* ocorre a saída das vacas da sala de ordenha;

10. Fornecimento de dieta para a vaca pós-ordenha: é recomendável fornecer dieta fresca ou manejar a vaca para local com disponibilidade de pastagem. Manejo importante para manter a vaca em pé durante aproximadamente 90 minutos. Esse tempo é necessário para fechamento completo do canal do teto, evitando que a vaca se deite e haja contaminação ambiental da extremidade do teto;
11. Desinfecção das teteiras entre ordenhas: recomendada entre lotes ou vacas com alto risco de transmissão de mastite contagiosa. Tendo a finalidade de reduzir a transmissão de mastite contagiosa entre vacas durante a ordenha. Entretanto, essa medida tem limitações quando realizada em todas as vacas, pois tem a questão do tempo e operacional e ainda da troca de desinfetante constante, uma vez que o mesmo vai perdendo a eficiência à medida que entra em contato com resíduos de leite.

Dentre os procedimentos de rotina há a subdivisão em fases, como a entrada (tópicos 1 e 2), pré-ordenha (tópicos 3, 4, 5, 6 e 7), que visa reduzir a contaminação dos tetos, diagnosticar mastite clínica e estimular a descido do leite; ordenha (tópico 8); e pós-ordenha (tópicos 9 e 10).

Para que haja bom desempenho na rotina da ordenha é importante que tenha descrição detalhada do protocolo operacional escrito, adequadas condições de trabalho e treinamento dos ordenhadores e instalação bem planejada da ordenha. Sendo essencial monitorar a rotina de ordenha pelo desempenho dos ordenhadores, qualidade do leite e saúde do úbere das vacas (Tongel, 2005; Hovinen; Pyorala, 2011)

A linha de ordenha é uma medida que auxilia no controle da mastite entre as vacas durante a ordenha. Entretanto, deve-se realizar diagnóstico periódico da mastite subclínica, para segregação das vacas positivas, o que pode dificultar o manejo e implantação da linha de ordenha. Outro fator que prejudica é o fato de vacas mesmo com CCS baixa poderem estar infectadas e serem fonte de infecção. Para mais, vacas

com mastite clínica devem ser ordenhadas separadamente devido a alteração na composição e aspecto do leite e, especialmente, presença de resíduos de antimicrobianos no leite (Massote *et al.*, 2019; Santos; Fonseca, 2019).

REFERÊNCIAS

- ABRIL, A. G. *et al.* *Staphylococcus aureus* exotoxins and their detection in the dairy industry and mastitis. **Toxins**. v. 12, 2020.
- ACOSTA, A. C. *et al.* Mastite em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 36, 2016.
- ADIKNS, P. R. F.; MIDDLETON, J. R. Methods for diagnosing mastitis. **Veterinary Clinical Food Animal**. v. 34, 2018.
- ALERI, J. W. *et al.* Periparturient immunosuppression and strategies to improve dairy cow health during the periparturient period. **Research Veterinary Science**. v. 108, 2016.
- ALGHARIB *et al.* Basic concepts, recent advances, and future perspectives in the diagnosis of bovine mastitis. **Journal Veterinary Science**. v. 25, 2024.
- ALVES *et al.* *In vitro* algicidal effect of guanidine on *Prototheca zopfii* genotype 2 strain isolated from clinical and subclinical bovine mastitis. **Letters Applied Microbiology**. v. 6, 2017.
- ALVES, D. D. S. **Levantamento da incidência de mastite subclínica na bacia leiteira do alto sertão sergipano**. 2021. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Zootecnia) – Universidade Federal de Sergipe, Nossa Senhora da Glória, 2021. Disponível em: https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/14612/2/Donnes_Souza_Alves.pdf. Acesso em: 01 de março de 2024.
- AMARAL, J. R. V. *et al.* Bacteriocin producing *Streptococcus agalactiae* strains isolates from bovine mastitis in Brazil. **Microorganisms**, v. 10, 2022.
- ANDREWS, T.; NEHER, D. A.; WEICHT, T. R.; BARLOW, J. W. Mammary microbiome of lactating organic dairy cows varies by time, tissue site, and infection status. **Plos One**. v. 14, 2019.
- ANNUNZIATO, F. *et al.* The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 135, 2015.
- BABRA, C. *et al.* The persistence of biofilm-associated antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical bovine mastitis cases in Australia. **Folia Microbiology**. v. 58, 2013.
- BARDHAN, D. Estimates of economic losses due to clinical mastitis in organized dairy farm. **Indian Journal of Dairy Science**. v. 66, 2013.
- BARI *et al.* Subclinical mastitis in dairy cows in South-Asian countries: a review of risk factors and etiology to prioritize control measures. **Veterinary Research Communication**. v. 46, 2022.

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

BECHEVA, Z.; GABROVSKA, K.; GODJEVARGOVA, T. Ensaio microscópico de imunofluorescência de neutrófilos e células somáticas em leite bovino. **Agrícola Alimentar Imunologia**. v. 28, 2017.

BENITES, N. R. *et al.* Genotypic evaluation of antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine clinical mastitis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 73, 2021.

BERRY, E. A.; HOGEVEEN, H.; HILLERTON, J. E. Decision tree analysis to evaluate dry cow strategies under UK conditions. **Journal of Dairy Research**. v. 71, 2004.

BLUDAU, M. J. *et al.* Mastitis in dairy heifers: prevalence and risk factors. **Veterinary Journal**. v. 202, 2014.

BLUM, S. *et al.* Identification of a bovine mastitis *Escherichia coli* subset. **Veterinary Microbiology**. v. 132, 2008.

BORN, 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, 2006.

BRADLEY, A. *et al.* Pan-European agreement on dry cow therapy. **Veterinary Record**. v. 182, 2018.

BREEN, J. E.; GREEN, M. J.; BRADLEY, A. J. Quarter and cow risk factors associated with the occurrence of clinical mastitis in dairy cows in the United Kingdom. **Journal of Dairy Science**. v. 92, 2009.

BREYNE, K. *et al.* Efficacy and safety of a bovine-associated *Staphylococcus aureus* phage cocktail in a murine model of mastitis. **Frontiers Microbiology**. v. 28, 2017.

BRONZO, V. *et al.* The Role of innate immune response and microbiome in resilience of dairy cattle to disease: the mastitis model. **Animals**. v. 11, 2020.

BRUCKMAIER, R. M.; GROSS, J. J. Lactational challenges in transition dairy cows. **Animal Production Science**. v. 57, 2017.

CACIANO, A. C. F. *et al.* Prevalência da mastite bovina em propriedades situadas no município de Jarú/RO. **Revista Contemporânea**. v. 3, 2023.

CAMERON, M. *et al.* Evaluation of selective dry cow treatment following on-farm culture: risk of postcalving intramammary infection and clinical mastitis in the subsequent lactation. **Journal of Dairy Science**. v. 97, 2014.

CAMERON, M. *et al.* Evaluation of selective dry cow treatment following on-farm culture: Milk yield and somatic cell count in the subsequent lactation. **Journal of Dairy Science**. v. 98, 2015.

CAMPOS, B. *et al.* Diversity and pathogenesis of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis: current understanding and future perspective. **BMC Veterinary Research**. v. 18, 2022.

CASTELANI, L. *et al.* Short communication: Activity of nisin, lipid bilayer fragments and cationic nisin-lipid nanoparticles against multidrug-resistant *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**. v. 102, 2019.

CEBALLOS-MÁRQUES, A. *et al.* Bulk tank milk selenium and its association with milk production parameters in Canadian dairy herds. **Canadian Veterinary Journal**. v. 53, 2012.

CECILIANI, F. *et al.* The untargeted lipidomic profile of quarter milk from dairy cows with subclinical intramammary infection by non-*aureus* staphylococci. **Journal of Dairy Science**. v. 104, 2021.

CHENGOLOVA, Z.; ATANASOVA, M.; GODJEVARGOVA, T. Contagem de neutrófilos e células CD4+ do leite relacionadas à incidência natural de mastite em bovinos Jersey. **Pesquisa Laticínios**. v. 88, 2021.

COBIRKA, M.; TANCIN, V.; SLAMA, P. Epidemiology and classification of mastitis. **Animals**. v. 10, 2020.

CUNHA, A. F.; SOUZA, F. N.; COELHO, K.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Prevalência, etiologia e fatores de risco de mastite clínica em rebanhos leiteiros de Viçosa-MG. **Acta Veterinaria Brasilica**. v. 10, 2016.

DALANEZI, F. M. *et al.* Influence of pathogens causing clinical mastitis on reproductive variables of dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 103, 2020.

DERAKHSHANI, H. *et al.* Composition of the teat canal and intramammary microbiota of dairy cows subject to antimicrobial dry cow therapy and internal teat sealant. **Journal of Dairy Science**. v. 101, 2018.

DIAS, J. A. *et al.* Prevalência e fatores de risco associados à mastite subclínica em rebanhos fornecedores de agroindústrias familiares de Rondônia. In: II CONGRESSO INTERNACIONAL DE PECUÁRIA LEITEIRA DA AMAZÔNIA OCIDENTAL, 69, 2021, Rio Branco - Acre. **Anais [...]** EDUFAC: Rio Branco – Acre, p. 69, 2021. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/227866/1/cpafro-18618.pdf>. Acesso em: 02 de março de 2024.

DIAS, R. V. C. D. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. **Acta Veterinaria Brasilica**. v. 1, 2007.

DORNELES, E. M. S. *et al.* Genetic diversity and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococcus* isolates from bovine mastitis in Minas Gerais. **Brazilian Microbiology Open**. v. 8, 2019.

DOS ANJOS, C. *et al.* Angicidal effect of blue light on pathogenic *Prototheca* species. **Protodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 26, 2019.

DUARTE, C. M.; FREITAS, P. P.; BEXIGA, R. Technological advances in bovine mastitis diagnosis: an overview. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 27, 2015.

EDMONSON, A. J. *et al.* A body condition scoring chart for Holstein cows. **Journal of Dairy Science**. v. 72, 1989.

FANG, L. *et al.* Genome-wide transcription and post-transcriptional regulation of innate immune and defense responses of bovine mammary gland to *Staphylococcus aureus*. **Frontiers Cell and Infection Microbiology**. v. 6, 2016.

FÁVERO, S. *et al.* Factors associated with mastitis epidemiologic indexes, animal hygiene, and bulk milk bacterial concentrations in dairy herds housed on compost bedding. **Livestock Science**. v. 181, 2015.

FENTON, M. *et al.* Bacteriophage-derived peptidase chapk eliminates and prevents staphylococcal biofilms. **Hindaw**. 2013.

GAO, J. *et al.* Incidence of clinical mastitis and distribution of pathogens on large Chinese dairy farms. **Journal of Dairy Science**. v. 100, 2017.

GELGIE, A. E.; KORSA, M. G. DEGO, O. K. *Mycoplasma bovis* mastitis. **Current Research in Microbiology Science**. v. 3, 2022.

GONÇALVES, J. L. *et al.* Bovine subclinical mastitis reduces milk yield and economic return. **Livest Science**. v. 210, 2018.

GONÇALVES, 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. **Veterinary Journal**. v. 209, 2016.

GUO, M. *et al.* Bacteriophage cocktails protect dairy cows against mastitis caused by drug resistant *Escherichia coli* infection. **Frontiers Cell and Infection Microbiology**. v. 11, 2021.

GUSSMANN, M. *et al.* Economic and epidemiological impact of different intervention strategies for subclinical and clinical mastitis. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 166, 2019.

HADRICH, J. C.; WOLF, C. A.; LOMBARD, J.; DOLAK, T. M. Estimating milk yield and value losses from increased somatic cell count on US dairy farms. **Journal of Dairy Science**. v. 101, 2018.

HASSAN, A. *et al.* Humic substances isolated from clay soil may improve the ruminal fermentation, milk yield, and fatty acid profile: a novel approach in dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**. v. 268, 2020.

HEIKKILÄ, A. M.; LISKI, E.; PYÖRÄ, S.; TAPONEN, S. Pathogen-specific production losses in bovine mastitis. **Journal of Laticinos Science**. v. 101, 2018.

HOGVEEN, H.; HUIJPS, K.; LAM, T. J. G. M. Economic aspects of mastitis: new developments. **New Zealand Veterinary Journal**. v. 59, 2011.

- HOVINEN, M.; PYORALA, S. Invited review: udder health of dairy cows in automatic milking. **Journal of Dairy Science**. v. 94, 2011.
- HU, X *et al.* Targeting gut microbiota as a possible therapy for mastitis. **Eur J Clin Microbiology Infection Disease**. v. 38, 2019.
- INGVARTSEN, K. L.; MOYES, K. Nutrition, immune function and health of dairy cattle. **Animal**. v. 7, 2013.
- JINMING, J. *et al.* Prevalence and risk factors of *Klebsiella* spp. in milk samples from dairy cows with mastitis – a global systematic review. **Frontiers in Veterinary Science**. v. 10, 2023.
- JUNG, D. *et al.* Comparative genomic analysis of *Escherichia coli* isolates from cases of bovine clinical mastitis identifies nine specific pathotype marker genes. **Microbiol Genomics**. v. 7, 2021.
- KABELITZ, T. *et al.* The role of *Streptococcus* spp. in bovine mastitis. **Microorganisms**. v. 9, 2021.
- KALINSKA, A.; JAWORSKI, S.; WIERZBICKI, M.; GOLEBIEWSKI, M. Silver and copper nanoparticles-an alternative in future mastitis treatment and prevention? **International Journal of Molecular Sciences**. v. 20, 2019.
- KALMUS, P. *et al.* Milk haptoglobin, milk amyloid A, and N- acetyl- β -glucosaminidase activity in bovines with naturally occurring clinical mastitis diagnosed with a quantitative PCR test. **Journal of Dairy Science**. v. 96, 2013.
- KANO, R. Emergence of fungal-like organisms: *Prototheca*. **Mycopathologia**. v. 185, 2019.
- KAWAI, K. Dynamics of lingual antimicrobial peptide, lactoferrin concentrations and lactoperoxidase activity in the milk of cows treated for clinical mastitis. **Animal Science Journal**. v. 86, 2015.
- KEEFE, G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. **Veterinary Clinical of North America: Food Animal Practice**. v. 28, 2012.
- KLAAS, I. C.; ZADOKS, R. N. An update on environmental mastitis: challenging perceptions. **Transboundary and Emerging Disease**. v. 65, 2018.
- KONEMAN, E. W. *et al.* (2018). **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas**. 7^a ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. 1854 p, ISBN 978-85-277-3318-2.
- KOVACIC, M. *et al.* Paraoxonase-1 activity and lipid profile in dairy cows with subclinical and clinical mastitis. **Journal of Applied Animal Research**. v. 47, 2019.
- KROMKER, V.; LEIMBACH, S. Mastitis treatment - Reduction in antibiotic usage in dairy cows. **Reproduction in Domestic Animal**. v. 52, 2017.

LANGER, M. J. *et al.* Tipologia de manejo de ordenha: análise de fatores de risco para a mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 37, 2017.

LANGONI, H. *et al.* Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 17, 2017.

LARSON, B. L.; HEARY, H. L. Jr.; DEVERY, J. E. Immunoglobulin production and transport by the mammary gland. **Journal of Dairy Science**. v. 63, 1980.

LAVON, Y., M. *et al.* Two approaches to improve fertility of subclinical mastitic dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 99, 2019.

LEITNER, G.; ZILBERMAN, D.; PAPIROV, E.; SHEFY, S. Assessment of acoustic pulse therapy (APT), a non-antibiotic treatment for dairy cows with clinical and subclinical mastitis. **Plos One**. v. 13, 2018.

LI, N. *et al.* Role of somatic cells on dairy processes and products: a review. **Dairy Science Technology**. v. 94, 2014.

LOPES, T. S. *et al.* Species identification and antimicrobial susceptibility profile of bacteria associated with cow mastitis in Southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 42, 2022.

MAALAOUI, A. *et al.* Prevalence of bovine mastitis and main risk factors in Tunisia. **Tropical Animal Health Production**. v. 53, 2021.

MARÉCHAL, C. L.; THIÉRY, R.; VAUTOR, E.; LOIR, Y. L. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products – A review. **Dairy Science Technology**. v. 91, 2011.

MARTINS, L. *et al.* Chronic subclinical mastitis reduces milk and components yield at the cow level. **Journal Dairy Research**. v. 13, 2020.

MARTINS, L. *et al.* Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá-MT. **Ciência Animal Brasileira**. v.11, 2010.

MCCUBBIN, K. D. *et al.* Invited review: selective use of antimicrobials in dairy cattle at drying-off. **Journal of Dairy Science**. v. 105, 2022.

MELLO, P. L. *et al.* Prevalência da mastite subclínica e associação dos agentes etiológicos com a contagem de células somáticas de vacas leiteiras da região sudoeste do Paraná. **Veterinária e Zootecnia**. v. 19, 2012.

MELLO, P. L. *et al.* *Staphylococcus* spp. isolated from bovine subclinical mastitis in different regions of Brazil molecular typing and biofilm gene expression. analysis by RT-qPCR. **Antibiotics**. v. 9, 2020.

MESQUITA, A. A. *et al.* Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in family-owned dairy herds in the state of Minas Gerais, Brazil. **Veterinária Notícias**. v. 25, 2019.

MESQUITA, A. A. *et al.* *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*: prevalence, resistance to antimicrobials, and their relationship with the milk quality of dairy cattle herds in Minas Gerais state, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 39, 2019.

MESQUITA, A. Q. *et al.* Association of tlr4 polymorphisms with subclinical mastitis in brazilian holsteins. **Brazilian Journal of Microbiology**. v 43, 2012.

MONTE, A. M. *et al.* Contagem de células somáticas em leite cru refrigerado de produtores individuais através de métodos rápidos. **Research, Society and Development**. v. 10, 2021.

MUTZE, K *et al.* The effect of dry cow antibiotic with and without an internal teat sealant on udder health during the first 100 d of lactation: a field study with matched pairs. **Journal Dairy Research**. v. 79, 2012.

NAQVI, S. A.; BUCK, J.; DUFOUR, S.; BARKEMA, H. W. Udder health in Canadian dairy heifers during early lactation. **Journal of Dairy Science**. v. 101, 2018.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **National Mastitis Council Recommended Mastitis Control Program**. 2001. Disponível em: <https://www.nmconline.org/wp-content/uploads/2016/08/RECOMMENDED-MASTITIS-CONTROL-PROGRAM-International.pdf>. Acesso em: 27 de fevereiro de 2024.

NELSON, C. D. *et al.* Symposium review: Targeting antimicrobial defenses of the udder through an intrinsic cellular pathway. **Journal of Dairy Science**. v. 101, 2018.

NICHOLAS, R. A.; FOX, L. K.; LYSNYANSKY, I. *Mycoplasma* mastitis in cattle: to cull or not to cull. **Veterinary Journal**. v. 216, 2016.

NICKERSON, S. C.; KAUTZ, F. M.; NACE, E. L. Managing mastitis in dairy heifers to improve overall herd health. **UGA Cooperative Extension**. Boletim 1416, 2013.

NIERO, T. S.; GLIENKE, C. L.; DICK, G.; OLIVEIRA, H. M. Prevalência de mastite bovina no planalto de Santa Catarina. **Ciência Animal**. v. 31, 2021.

NIRALA, N. R.; HAREL, Y.; LELLOUCHE, J. P.; SHTENBERG, G. Ultrasensitive haptoglobin biomarker detection based on amplified chemiluminescence of magnetite nanoparticles. **Journal Nanobiotech**. v. 18, 2020.

OLIVEIRA, P. V. C. *et al.* Avaliação da qualidade do leite cru e prevalência de mastite no município de Mossoró-RN. **Brazilian Journal of Development**. v. 6, 2020.

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

OLIVEIRA, J. *et al.* Fatores de risco associado à mastite bovina microrregião Garanhuns, Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 32, 2012.

- PELLEGRINO, M. S. *et al.* *In Vitro* characterization of lactic acid bacteria isolated from bovine milk as potential probiotic strains to prevent bovine mastitis. **Probiotics, Antimicrob Proteins**. v. 11, 2019.
- PERALTA, O. A. *et al.* Safety and efficacy of a mesenchymal stem cell intramammary therapy in dairy cows with experimentally induced *Staphylococcus aureus* clinical mastitis. **Scientific Reports**. v. 10, 2020.
- PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. Vencendo a luta contra a mastite. **Naperville: Westfalia Landtechnik do Brasil LTDA**. 2002.189 p.
- PINTO, M. S. *et al.* Prevalência e etiologia da mastite bovina em propriedades rurais da região noroeste Paulista. **Brazilian Journal of Development**. v. 7, 2021.
- PINZÓN-SÁNCHEZ, C.; RUEGG, P. L. Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastite. **Journal of Dairy Science**. v. 94, 2011.
- POL, M.; RUEGG, P. L. Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of gram-positive mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**. v. 90, 2007.
- RABIEE, A. R.; LEAN, I. J. The effect of internal teat sealant products (teatseal and orbeseal) on intramammary infection, clinical mastitis, and somatic cell counts in lactating cows: a meta-analysis. **Journal of Dairy Science**. v. 96, 2013.
- RAHIMI, K.; FAERCH, N. A.; VENO, M. T.; KJEMS, J. Nanopore long-read sequencing of circRNAs. **Methods**. v. 196, 2021.
- RAINARD, P. *et al.* Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. **Transboundary and Emerging Disease**. v. 65, 2018.
- RAINARD, P. *et al.* Type 3 immunity: a perspective for the defense of the mammary gland against infections. **Veterinary Research**. v. 51, 2020.
- RAINARD, P.; FOUCRAS, G. A critical appraisal of probiotics for mastitis control. **Frontiers Veterinary Science**. v. 5, 2018.
- RAINARD, P.; GILBERT, F. B.; GERMON, P. Immune defenses of the mammary gland epithelium of dairy ruminants. **Frontiers Immunology**. v. 13, 2022.
- RAMBAULT, M. *et al.* Neutrophils expressing major histocompatibility complex class II molecules circulate in blood and milk during mastitis and show high microbicidal activity. **Journal of Dairy Science**. v. 106, 2023.
- RIBEIRO, M. E. R. *et al.* Ocorrência de mastite causada por nocardia spp. em rebanhos de unidades de produção leiteira no sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**. v. 12, 2006.
- RICHARDS, V. P. *et al.* Genome based phylogeny and comparative genomic analysis of intra-mammary pathogenic *Escherichia coli*. **Plos One**. v. 10, 2015.

ROBERSON, J. R. Treatment of clinical mastitis. **Veterinary Clininal North America: Food Animal Practive.** v. 28, 2012.

ROSA, M. S. *et al.* Boas Práticas de Manejo - Ordenha. **Jaboticabal:** Funep, 2009.

ROWE, S. M. *et al.* Randomized controlled trial investigating the effect of 2 selective dry-cow therapy protocols on udder health and performance in the subsequent lactation. **Journal of Dairy Science.** v. 103, 2020.

ROWE, S. M. *et al.* Selective dry-cow therapy can be implemented successfully in cows of all milk production levels. **Journal of Dairy Science.** v. 106, 2023.

RUEGG, P. L. A 100-year review: mastites detection, managemet, and prevention. **Journal of Dairy Science.** v. 100, 2017.

RUEGG, P. L. Making antibiotic treatment decisions for clinical mastitis. **Veterinary Clinical North America Food Animal Practive.** v. 34, 2018.

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

SABEDOT, C. *et al.* Prevalência de agentes etiológicos de mastite em bovinos leiteiros criados em sistema de alojamento do tipo *compost barn* na região Oeste de Santa Catarina. **Observatorio de LaEconomia Latinoamericana.** v. 21, 2023.

SAINI, V. *et al.* Antimicrobial resistance profiles of common mastitis pathogens on Canadian dairy farms. **Journal of Dairy Science.** v. 95, 2012.

SALAT, O.; LEMAIRE, G.; DUREL, L.; PERROT, F. Etiology of severe mastitis in French dairy herds. **Plos One.** v. 18, 2023.

SANTOS, L. L. *et al.* Mastites clínicas e subclínicas em bovinos leiteiros ocasionadas por *Staphylococcus* coagulase-negativa. **Revista Instituto Adolfo Lutz.** v. 70, 2011.

SANTOS, A. S.; MENDONÇA, T. O.; MUNIZ, I. M. Prevalência de mastite bovina em rebanhos leiteiros no município de Rolim de Moura e adjacências, Rondônia. **Pubvet.** v. 14, 2020.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Controle de mastite e qualidade do leite – Desafios e soluções.** 1. ed. Pirassununga-SP, 2019, 301 p. ISBN 978-85-915913-1-2

SCACCABAROZZI, L. *et al.* Short communication: Epidemiology and genotyping of *Candida rugosa* strains responsible for persistent intramammary infections in dairy cows. **Journal Dairy Science.** v. 94, 2011.

SCHUKKEN, Y. H. *et al.* Host- response patterns of intramammary infections in dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology.** v. 144, 2011.

SHAH, M. S. *et al.* Methicillin resistance genes and *in vitro* biofilm formation among *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in India. **Comparative Immunology and Microbiology Infectious Diseases.** v. 64, 2019.

SHARUM, K. *et al.* Advances in therapeutic and managemental approach of bovine mastitis: a comprehensive review. **Veterinary Quartely.** v. 41, 2021.

SILVA, A. C.; LAVEN, R.; BENITES, N. R. Risk Factors associated with mastitis in smallholder dairy farms in southeast Brazil. **Animals.** v. 11, 2021.

SILVA, J. G. *et al.* *mecA* positive *Staphylococcus* spp. in bovine mastitis, milkers, milking environment, and the circulation of different MRSA clones at dairy cows farms in the Northeast region of Brazil. **Microbiology.** v. 52, 2022.

SIMÕES, T. V. M. D.; SÁ, C. O.; SÁ, J. L. **Comunicado técnico** – prevenção e controle da mastite bovina baseados no número de células somáticas. EMBRAPA, 2016.

SIVA, A. C.; SILVA, F. F.; BETT, V. Prevalência de mastites em vacas leiteiras do município de Carlinda (MT), no ano de 2016. **PubVet.** v. 11, 2017.

SORDILLO, L. M.; SHAFER-WEAVER, K.; DE ROSA, D. Immunobiologia da glândula mamária. **Journal Dairy Science.** v. 80, 1996.

STEENEVELD, W.; WERVEN, T. V.; BARKEMA, H. W.; HOGVEEN, H. Cow-specific treatment of clinical mastitis: Na economic approach. **Journal Dairy Science.** v. 94, 2001.

STELWAGEN *et al.* Immune components of bovine colostrum and milk. **Journal Animal Science.** v. 87, 2009.

SUOJALA, L.; KAARTINEN, L.; PYORALA, S. Treatment for bovine *Escherichia coli* mastitis – na evidence-based approach. **Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics.** v. 36, 2013.

SUZUKI, K.; KANEKO, F.; MATSUSHITA, A.; HATA, E. Outbreaks of bovine mastitis caused by specific *Mycoplasma bovis* strains recurring at multi-year intervals. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation.** v. 0, 2024.

TAPONEN, S.; MYLLYS, V.; PYORALA, S. Somatic cell count in bovine quarter milk samples culture positive for various *Staphylococcus* species. **Acta Veterinary Scandinavica.** v. 64, 2022.

TITZE, I.; LEHNHERR, T.; LEHNHERR, H.; KROMKER, V. Efficacy of bacteriophages Against *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. **Pharmaceutical.** v. 13, 2020.

TIWARI, R. *et al.* Antibiotic resistance – an emerging health problem: causes, worries, challenges and solution – a review. **Intenational Journal of Current Research.** v. 5, 2013.

TIWARI, R. *et al.* Bacteriophage therapy for safeguarding animal and human health: a review. **Pak Journal Biology Science.** v. 17, 2014.

- TIWARI, R. *et al.* Herbal immunomodulators – a remedical panacea for designing and developing effective drugs and medicines: current cenário and future prospects. **Current Drug Metabolism**. v. 19, 2018.
- TIWARI, R. *et al.* Mammary gland pathology subsequent to acute infection with strong versus weak biofilm forming *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: A Pilot Study Using NonInvasive Mouse Mastitis Model. **Plos One**. v. 12, 2017.
- TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. 9^a ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 1217 p. ISBN 978-85-352-7966-5
- TOMAZI, T. *et al.* Association of herd-level risk factors and incidence rate of clinical mastitis in 20 Brazilian dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 161, 2018.
- TOMMASONI, C.; FIORE, E.; LISUZZO, A.; GIANESELLA, M. Mastitis in dairy cattle: on-farm diagnostics and future perspectives. **Animals**. v. 13, 2023.
- TONGEL, P. M. Mastitis - a milk thief. Institute of Scientific and Technical Information for Agriculture. **Nitra**. 2005.
- TSUGAMI, Y. *et al.* Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid influence milk production ability via different early responses in bovine mammary epithelial cells. **Experimental Cell Research**. v. 400, 2021.
- ULFMAN, L. H. *et al.* Effects of bovine immunoglobulins on immune function, allergy, and infection. **Frontiers in Nutrition**. v. 5, 2018.
- VAN DEN BORNE, B. H. P. *et al.* Intramammary antimicrobial treatment of subclinical mastitis and cow performance later in lactacion. **Journal Dairy Science**. v. 102, 2019.
- VARELA-ORTIZ, D. F. *et al.* Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from subclinical bovine mastitis case and *in vitro* efficacy of bacteriophage. **Veterinary Research Communications**. v. 42, 2018.
- VASIL, M. *et al.* Effect of peroral supplementation with selenium and vitamin E during late pregnancy on udder health and milk quality in dairy cows. *Potravinarstvo Slovak* **Journal Food Science**. v. 11, 2017.
- VERBEKE, J. *et al.* Pathogen-specific incidence rate of clinical mastitis in Flemish dairy herds, severity, and association with herd hygiene. **Journal of Dairy Science**. v. 97, 2014.
- 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, 2012.
- WANG, M. *et al.* Genome-wide dna methylation and transcriptome integration associates dna methylation changes with bovine subclinical mastitis caused by *Staphylococcus chromogenes*. **International Journal Molecular Sciences**. v. 24, 2023.

WANG, M. *et al.* Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* cultured from raw milk taken from dairy cows with mastitis in Beijing, China. **Frontiers Microbiology**. v. 9, 2018.

WEBER, L. P. *et al.* Prevalence and risk factors for esbl/ampc-E. coli in pre-weaned dairy calves on dairy farms in Germany. **Microorganisms**. v. 9, 2021.

WENTE, N.; KROMKER, V. *Streptococcus dysgalactiae* - Contagious or Environmental? **Animals**. v. 10, 2020.

WENTE, N. *et al.* Recurrent mastitis – persistent or new infections? *Vet Microbiol.* v. 244, 2020.

WETHAL, K. B.; SVENDSEN, M.; HERINGSTAD, B. A genetic study of new udder health indicator traits with data from automatic milking systems. **Journal of Dairy Science**. v. 103, 2020.

Xu, J. *et al.* The diversities of staphylococcal species, virulence and antibiotic resistance genes in the subclinical mastitis milk from a single chinese cow herd. **Microbial Pathogenesis**. v. 88, 2015.

YANG, W. T. *et al.* Effective treatment of bovine mastitis with intramammary infusion of angelica dahurica and rheum officinale extracts. **Hindawi**. 2019.

ZADOCKS, R. N. *et al.* A framework for evaluation of on-farm mastitis diagnostics in Australia. **Australian Veterinary Journal**. v. 102, 2023.

ZADOCKS, R. N. *et al.* Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. **Journal Mammary Gland Biology Neoplasia**. v. 16, 2011.

ZECCONI, A. *et al.* Assessment of subclinical mastitis diagnostic accuracy by differential cell count in individual cow milk. **Italian Journal Animal Science**. v. 18, 2019.

ZHANG, T.; BOONYAYATRA, S.; NIU, G. Association of mastitis and farm management with contamination of antibiotics in bulk tank milk in southwest, China. **Animals**. v. 12, 2022.

ZHOU, M. *et al.* Role of long polar fimbriae type 1 and 2 in pathogenesis of mammary pathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Dairy Science**. v. 104, 2021.

ZIGO, F. *et al.* Maintaining optimal mammary gland health and prevention of mastitis. **Frontiers Veterinary Science**. v. 8, 2021.

**CAPÍTULO III. CARACTERIZAÇÃO DE REBANHOS E PREVALÊNCIA
DA MASTITE BOVINA EM MUNICÍPIOS DA BACIA LEITEIRA DA
REGIÃO OESTE MARANHENSE**

3.1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina está associada a diversos fatores relacionados ao animal, especificamente estado imunológico, nutricional, características morfológicas do úbere e tetos e ocorrência de outros episódios de mastite clínica ou subclínica na lactação corrente ou em lactações anteriores. Além disso, a fatores relacionados ao ambiente como higiene do local, dos equipamentos e do ordenhador. E ainda, relacionados ao agente etiológico, com características intrínsecas de patogenicidade e virulência que influenciam tanto na manifestação da sintomatologia da mastite, quanto no tratamento e/ou cura clínica e bacteriológica do animal (Ruegg, 2017; Lopes *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2022).

É a doença de produção mais prevalente no rebanho leiteiro, que pode afetar negativamente tanto a produção quanto a composição do leite por períodos curtos, longos e até mesmo com efeito de repetições em lactações subsequentes (Verbeke *et al.*, 2014; Silva; Laven; Benites, 2021). A ocorrência da mastite tem grande variedade entre os rebanhos leiteiros, devido as diferenças no manejo higiênico-sanitário-nutricional empregado em cada propriedade rural. E leva a prejuízos econômicos significativos a depender do agente etiológico envolvido, estágio de lactação e paridade da vaca, número de ocorrências na lactação corrente ou em lactações anteriores. Estima-se que ocorre cerca de 21% de diminuição na produção total de leite em casos de mastite (Oliveira, 2015; Acosta *et al.*, 2016; Gonçalves *et al.*, 2018; Correia *et al.*, 2024).

A mastite subclínica causa maiores prejuízos na propriedade leiteira, por ter seu diagnóstico, muitas das vezes não empregado nos rebanhos e passando a doença despercebida pelos produtores. Acrescido de seu caráter infeccioso, sendo transmitida de vaca a vaca, podendo contaminar diversas fêmeas durante a lactação. Levando a diminuição na produção e alteração na composição do leite e com ocorrência de 15 a até 40 vezes maior do a mastite clínica, podendo corresponder de 90 a 95% dos casos diagnosticados nos rebanhos leiteiros (Oliveira *et al.*, 2015; Silva; Laven; Benites, 2021).

Entretanto, atenção também deve ser dada aos casos de mastite clínica, em que há aparecimento de sinais de alteração do leite, úbere e/ou animal e que normalmente é transmitida de patógenos presentes no ambiente para a vaca via canal do teto. Aproximadamente 30% dos prejuízos econômicos da mastite são devido aos

casos clínicos incidindo em gastos com medicamentos, atendimento do médico veterinário, mão-de-obra e, em algumas vezes, perda do animal e custos com reposição dos animais. Além disso, prejuízos relacionados ao descarte do leite durante o tratamento e período de carência de cada antimicrobiano utilizado, riscos de resíduos no leite e consequentemente riscos à saúde pública (Oliveira *et al.*, 2015; Langoni *et al.*, 2017; Gonçalves *et al.*, 2018; Kabelitz *et al.*, 2021).

Portanto, medidas de controle da mastite devem ser empregadas a fim de diminuir a ocorrência, melhorando a saúde e bem-estar das vacas, com consequente aumento da produtividade e maximização dos lucros. Logo, o diagnóstico da mastite clínica e subclínica, bem como a identificação etiológica, é essencial para detectar animais positivos e indicar o tratamento mais adequado para cada caso. De igual forma, cuidados devem ser direcionados para o manejo higiênico na ordenha, como medidas de higiene do ordenhador, equipamentos e instalações, lavagem dos tetos (quando necessário), *pré-dipping*, secagem dos tetos, *pós-dipping*. Manejo nutricional adequado para cada categoria de produção, bem como o fornecimento de alimento imediatamente após o término da ordenha são medidas essenciais para todos os tipos de rebanho leiteiro (Santos; Fonseca, 2019; Rahimi *et al.*, 2021; Bari *et al.*, 2022).

Dada a importância da mastite bovina nos rebanhos leiteiros, objetivou-se determinar a ocorrência da mastite nos rebanhos leiteiros oriundos de dois municípios de uma microrregião da bacia leiteira do oeste maranhense, assim como avaliar as condições de manejo higiênico, sanitário e ambiental dos rebanhos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Descrição da Área de Estudo e dos Rebanhos Amostrados

A pesquisa ocorreu nos municípios de Imperatriz e São Francisco do Brejão, localizados na região Oeste da bacia leiteira do Maranhão. Imperatriz possui um rebanho de 12.485 vacas ordenhadas, com produção de 10.450 mil litros de leite/ano, que o coloca na 8ª posição da produção leiteira do estado e São Francisco do Brejão possui 11.277 vacas ordenhadas com uma produção de 10.375 mil litros de leite/ano, ficando na 9ª posição, conforme dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2022).

Os rebanhos foram incluídos no estudo por uma amostragem não-probabilística, por conveniência, pertencentes a propriedades leiteiras dos

municípios pesquisados. Por meio de uma parceria com o Serviço Nacional de Aprendizagem Rural (SENAR - MA) foram incluídas propriedades leiteiras assistidas por eles nos dois municípios da pesquisa. Os critérios de inclusão considerados no estudo foram: (i) mais de 15 vacas em lactação; (ii) destinação do leite para comércio; (iii) fácil acesso às propriedades e disponibilidade de participação na pesquisa.

No período de agosto de 2021 a dezembro de 2023, foram alocados na amostra 31 rebanhos, com um total de 868 vacas em período de lactação. Dezesete rebanhos (54,83%) e 364 vacas (41,93%) amostradas pertenciam ao município de Imperatriz; e 14 rebanhos (45,17%) e 504 vacas (58,07%) pertenciam ao município de São Francisco do Brejão.

3.2.2 Diagnóstico da Mastite e Coleta de Dados

Nos rebanhos visitados, foi realizado diagnóstico da mastite clínica e subclínica em todas as vacas em lactação. Para a mastite clínica foi realizado o teste da caneca telada ou de fundo preto. Além disso, os casos positivos eram avaliados quanto a sua severidade em: mastite clínica leve, quando apresentava apenas alterações no leite da vaca; moderada, quando existia alterações no leite e sinais de inflamação no úbere; e grave, quando presença de alterações no leite, úbere e sinais sistêmicos da doença, de acordo com Langoni *et al.* (2017) e Tommasoni *et al.* (2023).

Para a mastite subclínica foi utilizado o *California Mastitis Test* (CMT) para cada quarto mamário individualizado e o resultado avaliado em função do grau de gelatinização ou viscosidade da mistura de partes iguais de leite e reagente (2mL de cada). Sendo os resultados expressos em cinco escores: (i) negativo (não há formação de gel); (ii) traços (leve formação de gel); (iii) + (fracamente positivo); (iv) ++ (reação positiva); (v) +++ (fortemente positivo), segundo Dias (2007) e Tammasoni *et al.* (2023).

Em cada propriedade foi aplicado um questionário ao proprietário ou colaborador para coleta de dados referente a condições socioeconômicas e acerca do conhecimento sobre mastite que o produtor possuía e características gerais do rebanho como manejo higiênico, sanitário, ambiental e nutricional e condições das instalações (Apêndice A).

3.2.3 Análise Estatística

Os dados coletados foram tabulados em planilhas do Microsoft Excel 2019® e analisados pelo programa estatístico Jamovi® versão 2.4.14. Foi também utilizado o programa WinPepi para comparação da produção média diária de leite nos dois municípios do estudo. Dessa forma, foram extraídas e comparadas frequências e estimativas de parâmetros da população de estudo, para caracterização das condições socioeconômicas, produtivas, de infraestrutura e sanitárias da bovinocultura de leite, dos rebanhos avaliados. Estes municípios foram comparados em relação à área das propriedades, ao número de vacas em lactação e à produção de leite, através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, porque as variáveis quantitativas dependentes não apresentaram distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wil.

A pesquisa de associação entre variáveis preditoras e mastite foi feita através de regressão logística. Para inclusão nesta análise da variável preditora numérica área de produção, esta foi transformada em qualitativa ordinal, sendo consideradas como minifúndio as propriedades com até 74 hectares (ha), pequena de 75 a 300 ha, média de 301 a 1.125 ha e grande acima de 1.126 ha. Essa transformação foi feita conforme as determinações atualizadas do INCRA em sua Lei nº 13.465 de 2017. Esta dispõe sobre os módulos fiscais como unidade de medida agrária, representando área mínima necessária para propriedades rurais serem consideradas economicamente viáveis. O mesmo foi feito com as variáveis categoria de produção e renda. A primeira com três níveis de produção (baixa: até 100 l/leite/dia; média: de 101 a 200 l/leite/dia; e alta: acima de 201 l/leite/dia) e a segunda compreendendo os níveis B (mais de seis salários mínimos), C (de quatro a cinco salários mínimos) e; D/E (até 3 salários mínimos). Nas análises estatísticas foi utilizado um nível de significância de 0,05.

Para avaliação dos casos de mastite nas vacas e os tetos afetados, foi considerado o agrupamento por município, uma vez que houve diferença significativa entre a ocorrência da mastite nos diferentes municípios ($p < 0,05$). Sendo utilizado a estatística descritiva com suas frequências, tabela de contingência, qui-quadrado e razão de prevalência.

3.2.4 Aspectos Éticos

A pesquisa foi cadastrada e aprovada no Conselho de Ética em Pesquisa (CEP) pelo número CAAE 69505323.6.0000.5554. A participação na pesquisa ocorreu de forma voluntária, sendo assinado em Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para cada propriedade rural visitada (Apêndice B).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Caracterização da Atividade Leiteira

Os 31 rebanhos leiteiros avaliados, pertencentes aos municípios de Imperatriz e de São Francisco do Brejão, eram compostos por vacas mestiças, em criação extensiva e com produção média de 5,58 litros/leite/dia. As 364 vacas avaliadas e pertencentes aos rebanhos de Imperatriz produziram diariamente 2.445 litros de leite, o que corresponde a uma produção média diária por vaca de 6,72 litros. Em São Francisco do Brejão, as 504 vacas avaliadas produziram diariamente 2.546 litros de leite, com produção média diária por vaca de 5,05 litros.

Assim, para cada 200 vacas, sendo metade de cada município, foram produzidos, em média por dia, 1.177 litros de leite. Destes, 57,09% por vacas de Imperatriz e 42,91% por vacas de Brejão. Estas duas proporções são significativamente diferentes $\chi^2=47.370$ e $p < 0,00$. A diferença das produções de leite diárias por vaca foi de 14,18% a favor de Imperatriz, com intervalo de confiança a nível de 95% variando de 10,1% a 18,3%. Conforme dados da Produção Pecuária Municipal – PPM do IBGE no ano de 2024 (IBGE, 2024), ao longo dos anos, vem ocorrendo variação na produção leiteira destes municípios alterando sua posição no ranqueamento, onde São Francisco do Brejão passou da 5ª posição em 2017 para a 9ª posição em 2022 e Imperatriz da 12ª posição para a 8ª posição nos mesmos anos, respectivamente.

A pecuária leiteira vem sofrendo redução desde o ano de 2020 quando atingiu o recorde da série com produção de 35,3 bilhões de litros de leite, sendo o Nordeste a única região que apresentou crescimento nos últimos dois anos, crescimento esse observado desde o ano de 2017 (IBGE, 2024). Entretanto, como pontuado por Carvalho (2023), uma série de eventos ocorreram e culminaram com o desinvestimento ou abandono na cadeia produtiva do leite, entre elas, o aumento dos

valores dos insumos e, em parte, acreditando que o arrendamento da terra para produção de grãos seja mais atrativo.

Contribuindo ainda, a globalização e menores barreiras comerciais entre países tornam o mercado mais competitivo e países com maior custo de produção e menor qualidade, eficiência e estrutura produtiva acabam tendo maiores dificuldades no mercado (Carvalho, 2023). Fatores que podem ter contribuído mais fortemente para perda da produtividade observada em São Francisco do Brejão. Além disso, em análise aos dados do IBGE (2024), o incremento na quantidade de vacas ordenhadas entre os dois municípios também apresentou diferença, em que Imperatriz de 2017 a 2022 teve aumento de 31%, já em São Francisco do Brejão esse aumento foi de apenas 7%.

Conforme os dados levantados no estudo e apresentados na tabela 1, pode-se observar que os entrevistados, em sua maioria, se classificam na classe D/E, o que corresponde a renda de até três salários mínimos, com área de exploração fundiária de minifúndios e pequenas propriedades e importante participação de membros da família na atividade leiteira.

Tabela 1 – Caracterização socioeconômica de 31 rebanhos leiteiros localizados nos municípios de Imperatriz e São Francisco do Brejão, estado do Maranhão

VARIÁVEIS	N	OMISSO	CONTAGENS	% DO TOTAL	% ACUMULADA
ESCOLARIDADE	19	12			
EFMa			1	5,3	5,3
EFMe			7	36,8	42,1
EM			7	36,8	78,9
ES			4	21,1	100
CLASSE RENDA	14	17			
B			2	14,3	14,3
C			3	21,4	35,7
D/E			9	64,3	100
ÁREA PROPRIEDADE	17	14			
Minifúndio			9	52,90	52,90
Pequena			7	41,2	94,10
Média			1	5,9	100,00
TRABALHADORES MEMBROS DA FAMÍLIA	17	14			
Não			5	29,40	29,40
Sim			12	70,60	100,00
ATIVIDADE LEITEIRA	19	12			
Primária			18	94,7	94,7

Secundária	1	5,3	100
------------	---	-----	-----

Legenda: N: número de rebanhos com respostas; Omisso = número de propriedades que não responderam; Contagens = número de respostas para cada alternativa; EFMa = Ensino Fundamental Maior; EFMe = Ensino Fundamental Menor; EM = Ensino Médio; ES - Ensino Superior; Classe renda: B = mais de 6 salários mínimos; C = de 4 a 5 salários mínimos; D/E = até 3 salários mínimos.

Fonte: Arquivo da autora (2024).

Foi observado que os entrevistados apresentam nível de instrução superior ao levantado pelo censo agropecuário no ano de 2017 para o Maranhão, em que o ensino fundamental menor e ensino médio correspondem a 36,8% para cada nível de instrução nesta pesquisa, enquanto o censo levantou índices de 14,45 e 8,31% respectivamente (IBGE, 2017). Entretanto, apesar do maior grau de instrução dos proprietários, não foi observado incremento no que diz respeito a melhorias nas condições de informação, gestão e assistência técnica. Já que, 57,1% não fazem gestão financeira e apenas 20% têm acompanhamento mensal do médico veterinário, entretanto, segundo relato dos entrevistados, o acompanhamento é feito por possuírem parentesco próximo com esses profissionais.

A gestão financeira na produção leiteira é extremamente útil para avaliar a rentabilidade e sucesso da produção, além de direcionar medidas de controle e prevenção especificamente para as vacas. Aliado a isto, a assistência veterinária é necessária para avaliação do manejo higiênico, sanitário, nutricional, *status* de saúde da vaca, protocolos de tratamento e viabilidade de descarte de animais, a fim de promover um produto mais rentável, de maior qualidade e menor riscos à saúde do consumidor (Acosta *et al.*, 2016; Lavor *et al.*, 2019; Santos; Fonseca, 2019).

Outro dado relevante é a área das propriedades, em que a maioria (94,1%) era de minifundiários e pequenos produtores, e em 70,6% com membros da família trabalhando nas fazendas. Santos *et al.* (2020), avaliando o censo agropecuário do Maranhão, relata que a área dos estabelecimentos dos agricultores familiares vem reduzindo, chegando a uma média de 20,20 hectare (ha) por propriedade no ano de 2017. Especialmente devido à maior área de propriedades não familiares, que correspondem a uma média de 284,61 ha por estabelecimento, sendo estes responsáveis por apenas 14,85% do total de propriedades rurais no estado. Além disso, havendo uma perda de terras para as monoculturas de soja e eucalipto a partir dos anos de 1990.

Ao que se refere ao conhecimento dos proprietários sobre mastite e gestão, nota-se que eles afirmaram ter conhecimento sobre a doença, bem como prejuízos com a sua ocorrência. Entretanto, apesar de a maioria receber assistência do SENAR

e/ou participar de entidade de classe, não realizavam gestão financeira e nem tinham acompanhamento periódico com médico veterinário (Tabela 2).

Tabela 2 – Caracterização do conhecimento sobre mastite e gestão de 31 rebanhos leiteiros localizados nos municípios de Imperatriz e São Francisco do Brejão, estado do Maranhão

VARIÁVEIS	N	OMISSO	CONTAGENS	% DO TOTAL	% ACUMULADA
CONHECIMENTO SOBRE MASTITE	27	4			
Não			3	11,1	11,1
Pouco			3	11,1	22,2
Sim			21	77,8	100
PREJUÍZO COM MASTITE	31	0			
Não			10	32,3	32,3
Sim			21	67,7	100
ASSISTÊNCIA SENAR	31	0			
Não			14	45,2	45,2
Sim			17	54,8	100
PARTICIPA ENTIDADE DE CLASSE	19	12			
Não			9	47,4	47,4
Sim			10	52,6	100
GESTÃO FINANCEIRA	28	3			
Não			16	57,1	57,1
Parcial			2	7,1	64,3
Sim			10	35,7	100
GESTÃO SANITÁRIA	18	13			
Sim			18	100	100
ASSISTÊNCIA VETERINÁRIA	20	11			
Não			6	30	30
Mensal			4	20	50,00%
Semestral			2	10	60,00%
Raramente			8	40	100

Legenda: N: número de rebanhos com respostas; Omitido = número de propriedades que não responderam; Contagens = número de respostas para cada alternativa.

Fonte: Arquivo da autora (2024).

Em se tratando de conhecimento sobre a doença, 77,8% conheciam sobre a mastite, porém quando indagados sobre a gestão sanitária, mesmo sendo relatada que era realizada em 100% dos rebanhos, foi observado que era basicamente em relação à imunização dos animais. Uma vez que, a saúde do úbere por meio do diagnóstico da mastite era realizada em 32,3% dos rebanhos (n= 10/31). Todavia, em 12,9% (n= 4/31) dos rebanhos apenas era realizado o teste da caneca para mastite

clínica, e somente uma propriedade, realizava diariamente o teste. Para o CMT, 9,7% (n= 3/31) realizavam, sendo que duas propriedades realizavam o teste esporadicamente e uma quinzenalmente, porém, dessa última, de forma incorreta, não obedecendo a relação de 1:1 (leite:reagente). Um total de 9,7% (n= 3/31) realizavam os dois testes, caneca e CMT, entretanto, apenas uma realizava diariamente o teste da caneca e mensalmente o CMT. O restante, 67,7% (n= 21/31), não realizava nenhum teste de diagnóstico para mastite.

Apesar dos produtores terem conhecimento sobre a doença, esse saber não foi suficiente pra serem implementadas medidas preventivas na ocorrência da doença. Assim, os prejuízos causados pela mastite são subestimados na produção leiteira e, não se constatou incrementos no manejo higiênico, sanitário e ambiental nas propriedades, mesmo sendo a atividade principal em 94,7% dos rebanhos visitados. Esse resultado pode explicar a baixa renda declarada, classe D/E, para 64,3% dos produtores entrevistados. Oliveira (2015) e Zigo *et al.* (2021) também observaram em suas pesquisas que os prejuízos causados pela mastite eram subestimados pelos produtores amostrados.

A tabela 3 apresenta os dados que caracterizam a infraestrutura do local de ordenha e destino do leite, observando que, normalmente a ordenha era realizada no próprio curral, sem nenhuma infraestrutura acrescentada e nem limpeza adequada, com destino do leite, preferencialmente a laticínios.

Tabela 3 - Caracterização do local, armazenamento e destino do leite de 31 rebanhos leiteiros localizadas nos municípios de Imperatriz e São Francisco do Brejão, estado do Maranhão

VARIÁVEIS	N	OMISSO	CONTAGENS	% DO TOTAL	% ACUMULADA
LOCAL	31	0			
Curral			21	67,7	67,7
Galpão			10	32,3	100
TIPO PISO	31	0			
Chão Batido			24	77,4	77,4
Cimentado			7	22,6	100
INSTALAÇÃO LOCAL ORDENHA	15	16			
Alvenaria			5	33,3	33,3
Madeira			10	66,7	100
LIMPEZA DO LOCAL	31	0			
Diária			8	25,8	25,8
Não			14	45,2	71,0

Raramente			4	12,9	83,9
Semanal			5	16,1	100
ARMAZENAMENTO DO LEITE	21	10			
Latão			14	66,7	66,7
Tanque refrigeração			7	33,3	100
DESTINO LEITE	30	1			
Laticínio			25	83,3	83,3
Produção subprodutos			1	3,3	86,7
Venda direta leite cru			4	13,3	100

Legenda: N: número de rebanhos com respostas; Omisso = número de propriedades que não responderam; Contagens = número de respostas para cada alternativa.

Fonte: Arquivo da autora (2024).

Os dados constantes na tabela 3, evidenciam pouco investimento na produção, e mesmo o Maranhão estando com o melhor índice de modernização agropecuária da região Nordeste, muito ainda há de ser feito para alcançar melhorias na produtividade e qualidade leiteira. De acordo com Alcantata e Bacha (2023), a modernização no Brasil no setor rural vem ocorrendo ao longo das últimas décadas, porém há uma desigualdade na incorporação dessa modernização nas diferentes mesorregiões do país, ficando as regiões Norte e Nordeste com os menores desempenhos. Necessitando que haja melhor desenvolvimento nessas regiões e ainda que ela, de fato, alcance os pequenos produtores rurais.

No estado do Maranhão, o leite foi o produto de origem animal de maior destaque, responsável por 74,6% do valor total de produção, ressalta-se que, nessa análise não consta dados referente à produção de carne animal, uma vez que o IBGE não realiza esse levantamento. Assim, apesar do destaque da cadeia leiteira, os produtores não possuem visibilidade nacional, ficando o Nordeste em terceiro lugar no *ranking* de produção de leite, contribuindo com 16,5% da produção total e o Maranhão representando apenas 7% da produção do Nordeste (IBGE, 2022). Ainda, no ano de 2021, o estado registrou a 17ª maior produção leiteira e o 10º maior rebanho de vacas ordenhadas do país (IMESC, 2023). Esses dados demonstram a baixa eficiência produtiva dos rebanhos, ressaltando a necessidade de investimentos financeiros, técnicos e de infraestrutura.

A Secretaria de Política Agrícola (SPA) projeta para o agronegócio, para até o ano de 2030, que apenas os produtores mais eficientes, que se adaptarem à nova realidade de adoção de tecnologia, melhorias na gestão e maior eficiência técnica e econômica permanecerão no mercado (MAPA, 2023). Desta forma, espera-se que

políticas públicas se voltem para promover melhorias no setor, não apenas na promoção da quantidade produzida, como também na qualidade do produto, promovendo concessões de créditos, melhorias na infraestrutura e nos órgãos de pesquisa e assistência rural, uma vez que, a região tem potencial para crescimento.

Em relação ao armazenamento e destino do leite produzido verificou-se também a necessidade de melhorias na manutenção da qualidade do leite, em que, grande parte dos produtores armazenam seu leite em latões (66,7%), sem refrigeração, e, na maioria das vezes, esse produto não consegue chegar à indústria no tempo de até duas horas após serem ordenhados, conforme preconizado pela Instrução Normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018 do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). E que esse tempo de espera em temperatura inadequada favorece a multiplicação de microrganismos presentes no leite e, conseqüentemente, diminui sua qualidade industrial (Hogeveen; Huips; Lam, 2011).

Verificou-se ainda que, 88, 41% (4.488/5.076 litros/leite/dia) do leite produzidos nos rebanhos visitados é entregue a laticínios, passando, conseqüentemente por inspeção sanitária. Essa porcentagem é maior que a encontrada no Brasil, que segundo dados do IBGE (2022), 69,1% do leite produzido no país é inspecionado. Entretanto, atenção deve ser dada ao que refere a qualidade do leite, tanto no tocante às condições higiênicas, quanto às condições de sanidade das vacas e de instalações dos locais. Uma vez que estes fatores estão diretamente relacionados à qualidade da matéria-prima e de seus derivados, não conseguindo a indústria melhorar o produto recebido e tendo sérios prejuízos com produto de má qualidade.

3.3.2 Associação de Preditores com a Mastite Bovina nos Rebanhos

O manejo de bezerro ao pé, lavagem dos tetos quando muito sujos, ordenha mecânica, assistência do SENAR e duas ordenhas apresentaram associação positiva com a ocorrência de mastite ($p < 0,05$), ao passo que essa associação foi negativa em relação à utilização de pano coletivo na secagem dos tetos e nível médio de produção ($p < 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4 – Associação de diferentes preditores com a mastite bovina levantados em 31 rebanhos leiteiros pertencentes aos municípios de Imperatriz e São Francisco do Brejão, estado do Maranhão

PREDITOR	VIF	p	ODDS RATIO	INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	
				LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
DIAGNÓSTICO	1,77				
Sim – Não		0,944	1,020	0,5793	1,797
BEZERRO AO PÉ	2,48				
Sim – Não		< ,001	9,618	4,334	21,343
LAVAGEM TETOS	1,54				
Quando muito sujo – Não		0,042	3,278	1,045	10,285
Sim – Não		0,792	0,9158	0,4763	1,761
PRÉ-DIPPING	1,68				
Sim – Não		0,621	1,166	0,6334	2,150
OFERTA ALIMENTO APÓS ORDENHA	1,27				
Sim – Não		0,525	1,149	0,7481	1,766
TIPO ORDENHA	1,80				
Mecânica – Manual		< ,001	5,435	2,972	9,940
ASSISTÊNCIA SENAR	1,27				
Sim – Não		0,006	2,207	1,248	3,902
FREQUÊNCIA ORDENHA	1,09				
2 – 1		< ,001	2,232	1,597	3,121
CATEGORIA DE PRODUÇÃO	1,04				
Alta – Baixa		0,428	1,153	0,811	1,640
Média – Baixa		0,041	0,649	0,428	0,983
SECAGEM DOS TETOS	1.49				
Pano coletivo - Não		0,024	0,355	0,144	0,874
Papel toalha - Não		0,458	0,593	0,149	2,321

Legenda: VIF = grau de multicolinearidade.

Fonte: Arquivo da autora (2024).

Foi observado que, no geral, não há manejo de ordenha adequado e que medidas básicas de controle da mastite não são empregadas ou são de forma inadequada. Desta forma, alguns fatores de risco para a mastite já avaliados e consolidados na literatura não conseguiram ser observados no presente trabalho. A exemplo, em nenhum rebanho era empregada linha de ordenha, apenas um realizava o pós-*dipping*, somente duas propriedades realizavam secagem dos tetos com papel toalha, entretanto não de forma individualizada por teto. Ainda, o diagnóstico não era realizado adequadamente e o pré-*dipping* realizado apenas em três rebanhos.

Na análise, o manejo de bezerro ao pé, presente em 71,42% (n= 15/21) dos rebanhos, foi o que mais teve associação com o risco aumentado da vaca ter mastite. Normalmente, os produtores acreditam que, devido a saliva do bezerro, não há necessidade de realizar pré-*dipping* pois essa secreção teria efeito positivo na

redução da mastite ambiental e no caso do repasse com bezerros após a ordenha, também não é recomendado aplicar pós-*dipping* em função do risco de ingestão de desinfetantes pelos bezerros, podendo ser feito o pós-*dipping* depois da mamada do bezerro (Rosa *et al.*, 2009; Mendonça; Guimarães; Brito, 2012), prática não observada nos rebanhos. E, em todas as propriedades que utilizavam o bezerro ao pé, não era realizado o pré e pós-*dipping* e nem a secagem dos tetos. Fatores estes que podem ter contribuído para maior ocorrência da mastite.

A ordenha mecânica contribuiu com uma probabilidade de 5,4 vezes maior de os animais adquirirem mastite. Para a implementação da ordenha mecanizada é importante aplicar medidas de limpeza e desinfecção dos tetos e do equipamento de ordenha, realizar linha de ordenha, bem como manutenção periódica da ordenhadeira. Diversos são os riscos advindos da ordenha mecânica sem os devidos cuidados, a exemplo, entrada de vácuo que pode retornar o leite e contaminar quartos saudáveis, pressão aumentada ou por tempo prolongado favorecendo a hiperqueratose, o leite de vacas infectadas pode contaminar as teteiras que ao entrar em contato com a pele de outros tetos podem contaminá-los (Santos; Fonseca, 2019; Zigo *et al.*, 2021; Bari *et al.*, 2022). Assim, implementar tecnologia sem aliar ao manejo adequado de limpeza e desinfecção dos tetos, bem como do equipamento de ordenha, além de falta de manutenção do equipamento e treinamento dos ordenhadores se mostraram fatores de risco para a mastite.

A lavagem dos tetos quando muito sujo, contribuiu com um aumento de 3,2 vezes de ocorrer a doença. Para Santos e Fonseca (2019), a forma adequada de lavar os tetos é com jato de água de baixa pressão e realizar depois o pré-*dipping* e secagem dos mesmos. Desta forma, foi demonstrado que mesmo lavando os tetos quando recomendado, se não for feito de maneira adequada, pode trazer prejuízos no controle da mastite.

O aumento na frequência da ordenha de uma para duas vezes ao dia aumentou 2,2 vezes a chance da doença ocorrer. Que, pode ter ocorrido devido ao fato de maior exposição da vaca aos agentes etiológicos da mastite, aumentando o risco de infecção intramamária, potencializado pelo manejo inadequado da ordenha. Além disso, caso não haja suporte nutricional para o aumento da produção pode gerar balanço energético negativo, estresse e levar a menor resistência a microrganismos (Maalaoui *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2022).

Em relação à categoria média de produção, com quantidade variando de 101 a 200 litros/leite/dia, apresentou fator protetor para a ocorrência da mastite, diminuindo em 0,64 vezes a chance de ter a doença. Essa diferença pode ter ocorrido devido ao tipo de ordenha em que na propriedade de alta produção 100% era mecânica, enquanto que na média foi de 20%. Não se pode indicar que a maior ocorrência pudesse ter sido pelo maior nível produtivo da vaca, uma vez que a média de produção das vacas da categoria de rebanho de produção média foi de 7,75 litros/leite, enquanto que as de rebanho de alta produção foi de 6,6 litros/leite.

A secagem de tetos, mesmo com pano coletivo, mostrou associação negativa com a mastite, protegendo 0,35 vezes as vacas. Como a maioria dos rebanhos (87%) não realizam a secagem dos tetos, qualquer que seja o procedimento foi considerado benéfico como proteção para a ocorrência da mastite. A secagem dos tetos é necessária no manejo de ordenha promovendo a remoção física de microrganismos e diminuindo o deslizamento das teteiras. Além disso, diminui os resíduos de desinfetantes no leite, importante tanto para o processamento do leite na indústria quanto para a saúde pública (Santos; Fonseca, 2019; Zigo *et al.*, 2021).

Rebanhos que recebiam assistência do SENAR (54,83%) apresentaram maior chance, 2,2 vezes a mais, de terem vacas com mastite. Atenção especial deve ser dada a esse ponto, pois mesmo com os técnicos visitando mensalmente as propriedades, promovendo conhecimentos sobre gestão e sanidade dos rebanhos, não foi o suficiente para que os produtores tivessem menos prejuízos com a mastite, principal doença da bovinocultura leiteira. Demonstrando que não apenas conhecimento, mas que estímulos e investimentos devem ser empregados em toda cadeia leiteira para que os produtores se sintam mais conscientes e engajados na melhoria da produtividade, bem-estar e qualidade leiteira de seu rebanho. Assim, políticas públicas e vários órgãos e instituições públicas e privadas precisam estar inseridas no desenvolvimento e fortalecimento da cadeia leiteira do estado.

3.3.3 Avaliação da Mastite Bovina nos Rebanhos

A ocorrência da mastite apresentou diferença significativa ($p < 0,01$) entre os municípios de Imperatriz e São Francisco do Brejão. No geral, a frequência da mastite encontrada foi de 45,4% ($n = 394/868$) das vacas analisadas nos dois municípios, em que para Imperatriz a prevalência foi de 52,19% ($n = 190/364$) e em São Francisco do

Brejão de 40,47% (n= 204/504) Sendo a mastite clínica diagnosticada em 3% das vacas (26/868) e a mastite subclínica em 43,6% (n= 378/868). A somatória de vacas com mastite clínica e subclínica ultrapassa o total de vacas com mastite devido algumas vacas apresentaram tanto mastite clínica como mastite subclínica em tetos diferentes (Tabela 5).

Tabela 5 – Distribuição da ocorrência da mastite de 868 vacas avaliadas pertencentes a 31 rebanhos dos municípios de Imperatriz e São Francisco do Brejão, estado do Maranhão

CLASSIFICAÇÃO		MUNICÍPIO		% ACUMULADA
		IMPERATRIZ	SÃO FRANCISCO DO BREJÃO	
MASTITE	SIM (%)	190 (21,9)	204 (23,5)	45,4
	NÃO (%)	174 (20,0)	300 (34,6)	100
MASTITE CLÍNICA	SIM (%)	16 (1,8)	10 (1,2)	3
	NÃO (%)	348 (40,1)	494 (56,9)	100
MASTITE SUBCLÍNICA	SIM (%)	184 (21,2)	194 (22,4)	43,6
	NÃO (%)	180 (20,7)	310 (35,7)	100

Fonte: Arquivo da autora (2024).

A frequência de mastite encontrada foi alta nos dois municípios variando de 12,5 a 85% nos rebanhos. A razão é de 14,53 (n= 378/26) casos de mastite subclínica para cada caso de mastite clínica. Esses dados demonstram a importância que a mastite tem nos rebanhos leiteiros e a magnitude dos prejuízos ocorridos neles associados à doença. Apesar de mastite ser uma doença multifatorial e de difícil erradicação no rebanho, ocorrência acima de 15% é preocupante pois acarreta prejuízos em toda cadeia produtiva, desde o produtor, com vacas com menor nível de produção, maior descarte de leite, gastos com medicamentos e assistência veterinária, perdas de animais e maior reposição, problemas reprodutivos das vacas, saúde do úbere comprometida e consequentemente leite de menor qualidade (Ribeiro *et al.*, 2006; Acosta *et al.*, 2016).

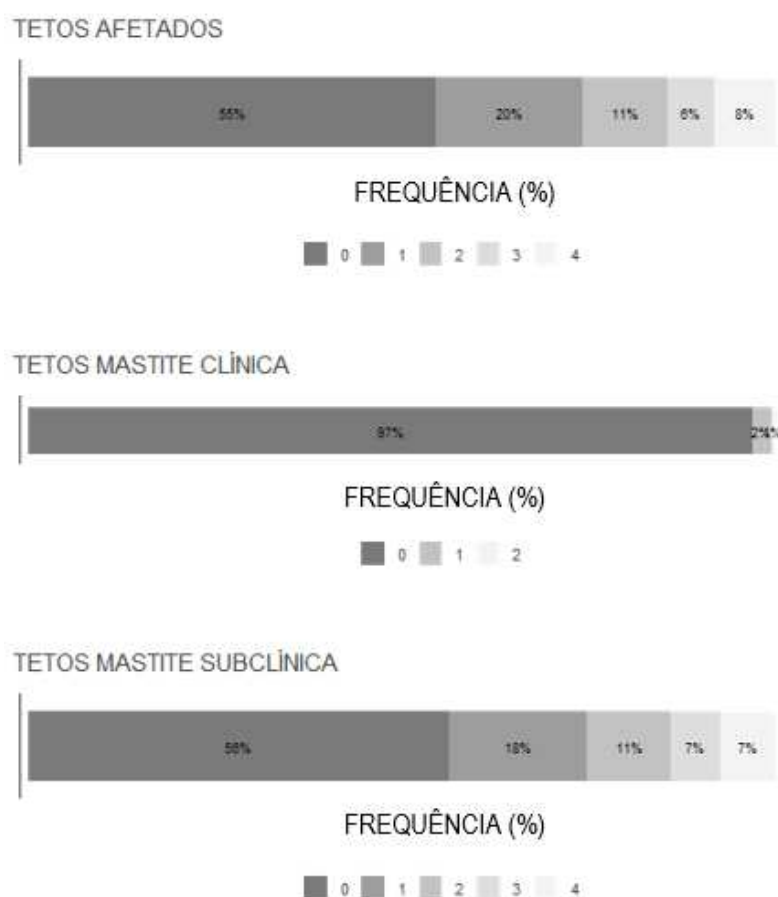
Especialmente a mastite subclínica causa alterações físico-químicas no leite levando a diminuição de caseína, gordura, lactose, potássio, cálcio e pH e aumento de albumina sérica, plasmina, teor de ácidos graxos, sódio e cloro e alterações bacteriológicas (Blum *et al.*, 2020; Tsugani *et al.*, 2021). Que levam a menor rendimento industrial de fabricação, de qualidade, de vida de prateleira do leite e derivados lácteos, de competitividade no mercado, alterações nas características

originais da bebida e de seus derivados, além do maior risco à saúde pública. Em que alguns microrganismos são potenciais produtores de enterotoxinas, incriminadas em toxinfecção alimentar, e de transferir genes de resistência a antimicrobianos a outras bactérias (Benites *et al.*, 2021; Rambault *et al.*, 2023).

Apesar dos prejuízos com mastite serem difíceis de calcular, porque diversos fatores estão envolvidos, alguns trabalhos estimam as perdas e demonstram que vacas infectadas deixam de produzir até 3 litros/leite/dia, chegando a 1.095 litros/ano/vaca (Simões; Oliveira, 2012; Gonçalves *et al.*, 2018; HadriHch *et al.*, 2018). Adicionado a isso, há os custos com tratamento das vacas e descarte de leite, estimando valores médios de R\$ 166,00 a R\$ 310,00 a depender de fatores ligados à vaca e ao patógeno envolvido (Simões; Oliveira, 2012; Oliveira, 2015).

Em se tratando das 394 vacas com mastite, a maior ocorrência foi para vacas com um teto afetado (19%) e a menor para vacas com os três quartos mamários comprometidos (6%) (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Porcentagem de tetos afetados geral e com mastite clínica e subclínica em 394 vacas diagnosticadas com mastite pertencentes a 31 rebanhos leiteiros de Imperatriz e São Francisco do Brejão, estado do Maranhão



Fonte: Arquivo da autora (2024).

Observa-se que a mastite subclínica além de maior ocorrência apresenta maior taxa de frequência em mais de um teto, aumentando os prejuízos. Muito provavelmente devido sua maior disseminação durante a ordenha, ponto crítico para a transmissão da mastite e onde não se observou manejo higiênico e sanitário adequado. E ainda, sendo a mastite subclínica silenciosa e não se empregando métodos de diagnóstico, espera-se maior ocorrência e maiores danos provocados. Esses resultados evidenciam a necessidade de implantação de diagnóstico para realizar manejo higiênico, sanitário e de tratamento adequado para a mastite subclínica a fim de minimizar os prejuízos provocados por ela.

Diante do exposto, é inegável a necessidade de implantação, nos rebanhos em geral, de medidas de controle para melhorar a produtividade, saúde e bem-estar das vacas e qualidade do leite e seus subprodutos. Medidas estas voltadas para o diagnóstico contínuo da mastite clínica e subclínica a fim de identificar, segregar e tratar de forma adequada as vacas a partir de seu *status* de saúde do úbere; manejo nutricional que favoreça o estado imunológico da vaca, bem como mantenha seu nível de produção e escore corporal adequado.

Ainda, medidas de higiene de ordenha como pré e pós-*dipping*, secagem dos tetos, bem como manejo higiênico do ambiente, mantendo-o limpo, seco e arejado, que além de diminuir a carga microbiana também diminui o estresse das vacas. Outrossim, promover adequado uso e funcionamento do sistema de ordenha mecânica, para evitar transmissão da mastite durante a ordenha e lesões nos tetos das vacas. Além disso, ofertar alimento para as vacas após a ordenha, para que se mantenham em pé por pelo menos 90 minutos, tempo necessário para fechamento do canal do teto. E promover treinamento constante dos colaboradores, para que haja rotina nas práticas de manejo da ordenha.

3.4 CONCLUSÃO

A infraestrutura empregada nos rebanhos leiteiros é incipiente, assim como a gestão sanitária e financeira, o manejo de ordenha e o monitoramento da saúde do úbere das vacas contribuem para elevada ocorrência de casos de mastite. O produtor precisa fazer gestão financeira, zootécnica e sanitária de seu rebanho para que ele não subestime os prejuízos causados pela mastite e dispense cuidados essenciais

para sua produção, a fim de produzir com maior qualidade, promover bem-estar ao seu rebanho e obter maior lucro e conseguir se fortalecer no mercado, cada vez mais competitivo. Faz-se necessários maiores investimentos técnicos, financeiros e maior engajamento do produtor na cadeia produtiva, assim como a união de entidades públicas e privadas, para que haja fortalecimento da cadeia produtiva do leite, prospectando reconhecimento e valorização real no estado do Maranhão.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A. C. *et al.* Mastite em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 36, 2016.
- ALCANTARA, I. R.; BACHA, C. J. C. A modernização desigual da agropecuária brasileira de 206 a 2017. **Revista de Economia Contemporânea**. v. 27, 2023.
- BARI, D. S. *et al.* Subclinical mastitis in dairy cows in South-Asian countries: a review of risk factors and etiology to prioritize control measures. **Veterinary Research Communications**. v. 46, 2022.
- BENITES, N. R. *et al.* Genotypic evaluation of antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine clinical mastites. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 73, 2021.
- CARVALHO, G. R. Oferta e demanda de leite no Brasil em 2022. *In: Anuário Leite 2023: leite: baixo carbono*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2023. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1154264/1/Anuario-Leite-2023.pdf>. Acesso em: 08 de abril de 2024.
- CORREIA, D. C. Economic losses caused by mastitis and the influence of climate variation on the occurrence of the disease in a dairy cattle farm in Southern Brazil. **Trop. Animal Health and Production**. v. 56, 2024.
- DIAS, R. V. C. D. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. **Acta Veterinária Brasilica**. v. 1, 2007.
- GONÇALVES, J. L. *et al.* Bovine subclinical mastitis reduces milk yield and economic return. **Livest Science**. v. 210, 2018.
- HADRICH, J. C.; WOLF, C. A.; LOMBARD, J.; DOLAK, T. M. Estimating milk yield and values losses from increased somatic cell count on US dairy farms. **Journal of Dairy Science**. v. 101, 2018.
- HOGVEEN, H.; HUIJPS, K.; LAM, T. J. G. M. Economic aspect of mastitis: new developments. **New Zealand Veterinary Journal**. v. 59, 2011.
- IBGE. **Censo agropecuário 2017**. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/21814-2017-censo-agropecuário.html?=&t=publicacoes>. Acesso em: 08 de abril de 2024.
- IBGE. **Pesquisa da Pecuária Municipal**, 2024. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ma/pesquisa/24/76693>. Acesso em: 08 de abril de 2024.
- IMESC. **Diagnóstico socioeconômico do estado do Maranhão**, 2023. Disponível em: https://1d9391f4-d86c-4020-8ff1-bd5514d9ad23.filesusr.com/ugd/c03b7f_e7d987a5626449e5a448b3ceb05ab348.pdf. Acesso em: 08 de abril de 2024.

KABELITZ, T. *et al.* The role of *Streptococcus* spp. in bovine mastitis. **Microorganisms**. v. 9, 2021.

LANGONI, H. *et al.* Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 17, 2017.

LAVON, Y., M. *et al.* Two approaches to improve fertility of subclinical mastitic dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 99, 2019.

LOPES, T. S. *et al.* Species identification and antimicrobial susceptibility profile of bactéria associated with cow mastites in Southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 42, 2022.

MAALAOUI, A. *et al.* Prevalence of bovine mastitis and main risk factors in Tunisia. **Tropical Animal Health Production**. v. 53, 2021.

OLIVEIRA, C. S. F. (2015). **Análise epidemiológica e bioeconômica da mastite bovina em rebanhos brasileiros**. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2015. p. 82.

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

OLIVEIRA, J. *et al.* Fatores de risco associado à mastite bovina na microrregião Garanhuns, Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 32, 2012.

RAHIMI, K.; FAERCH, N. A.; VENO, M. T.; KJEMS, J. Nanopore long-read sequencing of circRNAs. **Methods**. v. 196, 2021.

RAMBAULT, M. *et al.* Neutrophils expressing major histocompatibility complex class II molecules circulate in blood and milk during mastitis and show high microbicidal activity. **Journal of Dairy Science**. v. 106, 2023.

RIBEIRO, M. E. R. *et al.* Ocorrência de mastite causada por nocardia spp. em rebanhos de unidades de produção leiteira no sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**. v. 12, 2006.

ROSA, M. S. *et al.* **Boas Práticas de Manejo** - Ordenha. Jaboticabal: Funep, 2009.

RUEGG, P. L. A 100-year review: mastites detection, managemet, and prevention. **Journal of Dairy Science**. v. 100, 2017.

SANTOS, I. P. *et al.* Agricultura familiar no Maranhão: Uma breve análise do Censo Agropecuário 2017. **Revista Economia do Nordeste**. v. 51, 2020.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Controle de mastite e qualidade do leite – Desafios e soluções**. 1. ed. Pirassununga-SP, 2019, 301 p. ISBN 978-85-915913-1-2

SILVA, A. C.; LAVEN, R.; BENITES, N. R. Risk Factors Associated With Mastitis in Smallholder Dairy Farms in Southeast Brazil. **Animals**. v. 11, 2021.

SILVA, J. G. *et al.* mecA positive *Staphylococcus* spp. in bovine mastitis, milkers, milking environment, and the circulation of different MRSA clones at dairy cows farms in the Northeast region of Brazil. **Microbiology**, v. 52, 2022.

SIMÕES, T. V. M. D.; OLIVEIRA, A. A. Mastite bovina: considerações e impactos econômicos. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2012. Disponível em: http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2012/doc_170.pdf. Acesso em: 05 de abril de 2024.

TOMMASONI, C.; FIORE, E.; LISUZZO, A.; GIANESELLA, M. Mastitis in dairy cattle: on-farm diagnostics and future perspectives. **Animals**. v. 13, 2023.

TSUGAMI, Y. *et al.* Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid influence milk production ability via different early responses in bovine mammary epithelial cells. **Experimental Cell Research**. v. 400, 2021.

VERBEKE, J. *et al.* Pathogen-specific incidence rate of clinical mastitis in Flemish dairy herds, severity, and association with herd hygiene. **Journal of Dairy Science**. v. 97, 2014.

ZIGO, F. *et al.* Maintaining optimal mammary gland health and prevention of mastitis. **Frontiers Veterinary Science**. v. 8, 2021.

CAPÍTULO IV. PERFIL ETIOLÓGICO DE AGENTES CAUSADORES DA MASTITE BOVINA EM DOIS MUNICÍPIOS DA BACIA LEITEIRA DO MARANHÃO

4.1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina, caracterizada pela inflamação da glândula mamária, acarreta importantes prejuízos na bovinocultura leiteira tendo como principal causa microrganismos como bactérias, fungos e algas, especialmente as bactérias. Os agentes etiológicos envolvidos em casos de mastite são classificados, a depender da virulência, em dois tipos: (i) agentes principais (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, estreptococos ambientais e coliformes); (ii) secundários (*Staphylococcus coagulase negativa* (SCN), *Corynebacterium* spp.) (Ruegg, 2016; Santos; Fonseca, 2019; Wang *et al.*, 2023).

Ainda, os microrganismos podem ser agrupados quanto a forma de transmissão e principal reservatório em contagiosos, estando incriminados as bactérias *S. aureus*, *S. agalactiae*, *Mycoplasma* spp. e *Corynebacterium* spp. tendo como reservatório o úbere das vacas e a transmissão ocorrendo durante a ordenha. É classificada em ambiental, sendo os coliformes como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., os estreptococos ambientais (*Streptococcus uberis*, *S. dysgalactiae* e outros, e os *Enterococcus* spp.), sendo o ambiente o principal reservatório e sua transmissão ocorrendo preferencialmente entre as ordenhas, do ambiente com acúmulo de matéria orgânica e umidade para o canal do teto das vacas (Lavor *et al.*, 2019; Lopes *et al.*, 2022).

Os patógenos envolvidos na mastite contagiosa são bem adaptados à glândula mamária, causando infecções persistentes, de forma subclínica e com eventuais episódios de mastite clínica. Os microrganismos causadores da mastite ambiental são considerados oportunistas e menos adaptados ao úbere, normalmente causam mastite clínica por períodos mais curtos, mas podem desenvolver infecções crônicas. Ainda, podem diminuir abruptamente a produção leiteira e levar a morte da vaca, em 5 a 10% dos casos (Lavor *et al.*, 2019; Salat *et al.*, 2023).

A identificação do agente etiológico é importante pois colabora com a indicação adequada do protocolo de tratamento, contribuindo com o uso racional de antimicrobianos e menor possibilidade de resíduos no leite, e de medidas de controle e prevenção específicas para os determinados patógenos envolvidas nos casos de mastite. Uma vez que apresentam fatores de patogenicidade, grau de virulência e resposta aos antimicrobianos intrínsecos, além de desencadearem resposta imune com características específicas que podem facilitar ou dificultar sua eliminação e

consequentemente influenciar no período de ocorrência da infecção na glândula mamária.

Desta forma, objetivou-se com o estudo verificar o perfil de agentes etiológicos envolvidos nos casos de mastite bovina em rebanhos de dois municípios da bacia leiteira do Maranhão.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Amostras de Leite

No período de maio a dezembro de 2023 foram coletadas 313 amostras de leite de 17 rebanhos leiteiros compostos por vacas mestiças, com criação extensiva e com sistema de ordenha manual ou mecânica. As propriedades pertenciam aos municípios de Imperatriz e São Francisco do Brejão, todos pertencentes a microrregião da bacia leiteira do estado do Maranhão.

As vacas em lactação foram previamente diagnosticadas para a mastite clínica, através do teste da caneca telada, e mastite subclínica, pelo *California Mastitis Test* (CMT). A coleta de leite foi realizada apenas de vacas positivas para mastite, procedendo a assepsia do teto com álcool a 70%, secagem com papel toalha e coleta do leite em frasco estéril. O frasco era imediatamente identificado e acondicionado sob refrigeração. O processamento das amostras ocorreu no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Veterinária da Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão – UEMASUL, campus de Imperatriz - MA.

4.2.2 Cultura, Isolamento e Características Fenotípicas das Amostras

As 313 amostras de leite foram repicadas em ágar base enriquecido com 5% de sangue de equino, ágar MacConkey e ágar Sabouraud com cloranfenicol, incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Na sequência foi verificado o crescimento microbiológico e suas características coloniais nos meios de cultura, características morfológicas e tintoriais por meio da coloração de Gram, realizados os testes fenotípicos necessários para cada grupo de microrganismos. Os testes foram específicos para identificação de espécies de cocos Gram-positivos (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp.), bacilos Gram-positivos (*Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp. e *Listeria* spp.), bacilos Gram-negativos (enterobactérias) e leveduras (células leveduriformes) conforme Koneman (2018).

Para a identificação dos isolados, foi realizado a cultura de uma única colônia e, posteriormente, a partir dos clones dessa colônia, realizado os testes bioquímicos. Para a identificação fenotípica de espécies de *Staphylococcus* foram realizados os testes de catalase, coagulase em tubo, fermentação do manitol, maltose, trealose e Vogues-Proskauer. Para as espécies de *Streptococcus* e *Enterococcus* os testes de catalase, crescimento em caldo BHI (Brain Heart Infusion) com 6,5% de NaCl e bile-esculina. Os bacilos Gram-positivos eram verificados suas características morfológicas, presença de esporos e realização dos testes de catalase, caldo BHI com 6,5% de NaCl, bile-esculina e motilidade em meio SIM. Os bacilos Gram-negativos foram repicados em meio de ágar TSI (Triple Sugar Iron), LIA (Lysine Iron Agar), Citrato de Simmons, ágar bile-esculina e SIM (Meio Motilidade e Indol sendo verificada produção de Indol pelo reativo de Kovacs. E as células leveduriformes, verificação do seu crescimento em ágar Sabouraud com cloranfenicol e suas características morfológicas na coloração de Gram.

4.2.3 Análise Estatística

Os resultados foram anotados em planilhas, tabulados pelo Microsoft Excel 2019® e analisados pelo programa estatístico Jamovi® versão 2.4.14. Sendo realizada estatística descritiva e suas frequências.

4.2.4 Aspectos Éticos

A pesquisa foi protocolada e aprovada na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão sob o número 2112220422.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das amostras analisadas, em 247 (78,91%) foram identificadas bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus*. Foi identificado *Bacillus* spp. em 51 amostras, seguido por *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp. em 11 e 4 amostras, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 – Identificação fenotípica em 313 amostras de leite coletadas de vacas diagnosticadas com mastite oriundas de 17 rebanhos leiteiros pertencentes a Imperatriz e São Francisco do Brejão, estado do Maranhão

AGENTES ETIOLÓGICOS	DIAGNÓSTICO VACA		DIAGNÓSTICO REBANHO	
	N	% DO TOTAL	N	% DO TOTAL
<i>Staphylococcus aureus</i>	90	28,8	10	58,82
<i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativa	88	28,1	16	94,12
<i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva	69	22	13	76,47
Não-aureus				
<i>Bacillus</i> spp.	51	16,3	10	58,82
<i>Streptococcus</i> spp.	11	3,5	5	29,41
<i>Enterococcus</i> spp.	4	1,3	1	5,88

Fonte: Arquivo da autora (2024).

A bactéria mais isolada no estudo foi *Staphylococcus* spp., em que os SCN esteve presente em 94,12% (n= 16/17) dos rebanhos, SCP em 76,47% (n= 13/17) e *S. aureus* em 58,82% (n= 10/17). Outro gênero recorrente nas propriedades foi o *Bacillus* spp. identificado em 10 rebanhos. O gênero *Streptococcus* spp. foi isolado em 5 rebanhos e *Enterococcus* spp. isolados em um rebanho apenas.

Pesquisas que versam sobre a mesma temática demonstram a maior ocorrência de *Staphylococcus* spp. como agente etiológico envolvido nos casos de mastite, reportando valores que variam de 30 a 85% em rebanhos e de 5 a 85% entre vacas (Contreras; Rodríguez, 2011; Langoni *et al.*, 2015; Moritz; Moritz, 2016; Mesquita *et al.*, 2019; Kurosawa *et al.*, 2020; Kuhn *et al.*, 2021; Eleodoro; Fagnani, 2022; Lopes *et al.*, 2022; Gomes *et al.*, 2023). O conhecimento da prevalência dos principais agentes etiológicos incriminados em casos de mastite nos rebanhos é de relevante importância, pois eles interferem diretamente no programa de controle, prevenção e tratamento indicado. Os *S. aureus* considerados patógenos contagiosos e classificados como principais envolvidos na ocorrência da mastite, apresentam patogenicidade que conduz à significativa diminuição na produção e, ainda importante alterações na composição do leite. Ademais, provocam consideráveis prejuízos em toda cadeia leiteira, desde o produtor até à indústria, perpassando ainda com riscos à saúde pública (Sousa *et al.*, 2017; Andrade *et al.*, 2021).

O tratamento de infecções da glândula mamária por *S. aureus* tem menor taxa de cura bacteriológica, chegando a 40% para novilhas e apenas 10% para as outras categorias, essa diferença é devido, especialmente, ao epitélio da glândula mamária de fêmeas mais velhas ser mais profundo o que facilita o escape dos estafilococos de

seu reconhecimento, sendo difícil de ser erradicado do rebanho. Ainda, a baixa taxa de cura também está associada a suas características patogênicas, em que a bactéria consegue escapar do sistema imune, tem maior poder de invasão nos tecidos mamários, formam abscessos com presença de pus e fibrose, sobrevive intracelularmente e são capazes de formar biofilmes. Esses fatores dificultam o reconhecimento e eliminação do agente pelo sistema imune da vaca e ainda impede que antimicrobianos atinjam concentrações adequadas para causar a morte bacteriana. Além do fato, de adquirirem resistência aos antimicrobianos o que torna o cenário ainda mais complicado e preocupante (Babra *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2019; Mesquita *et al.*, 2019; Andrade *et al.*, 2021; Francisco *et al.*, 2021).

Quanto aos estafilococos não-aureus (ENA), tanto os coagulase negativa quanto os coagulase positiva, são considerados oportunistas e secundários e habitam preferencialmente a pele do úbere e canal do teto, e a mão do homem. Normalmente, são implicados em causar uma inflamação leve e limitada redução na produção de leite. Entretanto, elevam a celularidade do leite em até oito vezes, comparada às vacas sadias, causando prejuízos na qualidade do leite e bonificação/pagamento do produtor (Langoni *et al.*, 2015; Santos; Fonseca, 2019; Silva; Rizzo, 2019). Em contrapartida, outros autores encontraram acentuada redução na produção de leite e contagem de células somáticas (CCS), demonstrando intensa resposta inflamatória e persistência da infecção. E observaram que diferentes espécies estão envolvidas em diferentes respostas, com maior ou menor intensidade nas alterações induzidas (Vlieghe *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014; Zimmermann; Araujo, 2017).

Além disso os ENA, são capazes de formar biofilmes, sendo considerado o fator de virulência mais importante na patogenia da mastite e que dificulta sua eliminação (Vlieghe *et al.*, 2012; Francisco *et al.*, 2021). Medidas de controle dirigidas ao manejo de ordenha são essenciais para o contingenciamento desses microrganismos contagiosos, com destaque para a utilização de pré e pós-*dipping*, higiene do ordenhador e uso de luvas durante a ordenha. No tratamento é relatado maiores taxas de cura, inclusive cura espontânea (Mello *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2023). Todavia, porcentagens podem ser inferiores devido à formação de biofilmes e por esses agentes apresentarem variedade de genes de resistência a antimicrobianos dificultando sua eliminação e, ainda capacidade de produzirem enterotoxinas com risco iminente à saúde alimentar dos humanos (Oikonomou *et al.*, 2012; Langoni *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2022; Fazoli *et al.*, 2023; Gomes *et al.*, 2023).

Os *Bacillus* spp. apresentaram ocorrência de 16,3% (n= 51/313). Resultados obtidos em outros trabalhos variaram de 1,3 a 10,2% (Zimmermann; Araujo, 2017; Xiangbin *et al.*, 2020; Lopes *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 2022). Esses são bastonetes formadores de endósporos, tendo como principal fonte de infecção o ambiente contaminado ou iatrogênica por meio do tratamento intramamário da vaca. Causa significativas perdas econômicas e importante intoxicação alimentar em seres humanos, por produzirem várias enzimas e toxinas deteriorantes em produtos lácteos (Swartz; Christina, 2016; Owusu-Kwarteng *et al.*, 2017; Meng *et al.*, 2022; Eid *et al.*, 2023).

Podem sobreviver a processos térmicos, devido à formação de esporos que, mesmo sofrendo danos, tem a capacidade de se recuperarem devido alguns genes e, manterem a capacidade de multiplicação (Warda *et al.*, 2015; Eid *et al.*, 2023). Ainda, são resistentes a antimicrobianos beta-lactâmicos por produzirem enzimas lactamases e resistentes também a outros antimicrobianos por transferência horizontal de genes de resistência e capacidade de formação de biofilmes, tendo apresentado insucesso nos tratamentos (Rossi *et al.*, 2018; Zhai *et al.*, 2023).

Neste estudo, os *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp. foram isolados em menor porcentagem, 3,5 e 1,3% respectivamente, do total de isolados, e apesar de serem considerados um dos principais agentes causadores de mastite, nesta pesquisa não tiveram elevada prevalência. Ambos os agentes são cocos Gram-positivos e catalase negativa que podem causar tanto uma mastite contagiosa quanto ambiental e apesar de provocarem rápida diminuição na produção de leite, normalmente são bem responsivos aos tratamentos empregados, podendo apresentar cerca de 90 a 95% de cura bacteriológica, conseguindo ser erradicados do rebanho, caso haja medidas adequadas de controle e tratamento empregadas (Mesquita *et al.*, 2019; Wentz; Kromker, 2020; Kabelitz *et al.*, 2021; Zigo *et al.*, 2021).

Pelos resultados obtidos no estudo reafirma-se que o diagnóstico etiológico é necessário dentro dos rebanhos pois direciona medidas de controle, prevenção e tratamento adequada para cada tipo de agente, seja ele contagioso ou ambiental, devido suas especificidades. Adicionalmente, o diagnóstico dos agentes envolvidos em casos de mastite permite oportunizar uso adequado de antimicrobianos, diminuindo os custos com tratamento, evitando o desenvolvimento de resistência e minimizando os problemas na indústria láctea, por menor quantidade de resíduos no leite. Para mais, a ocorrência de resistência e transferência de genes de resistência

para outras bactérias, inclusive de seres humanos, minimizando riscos à saúde pública.

Considerável também é a implementação de medidas de controle e prevenção da mastite no rebanho para reduzir a ocorrência dos casos. Desta forma, é imprescindível que rotina de ordenha ocorram com adequada higiene dos tetos, como lavagem deles apenas daqueles com presença de matéria orgânica, realizar a aplicação do pré-*dipping*, secar com papel toalha individual, preferencialmente, fazer a ordenha, aplicar o pós-*dipping* e fornecer alimento para a vaca permanecer em pé após a ordenha. Esta rotina diária contribuirá para prevenir a ocorrência de novos casos tanto da mastite clínica, quanto subclínica no rebanho.

4.4 CONCLUSÃO

Este é um estudo inicial, mas importante, sobre o conhecimento dos agentes etiológicos envolvidos nos casos de mastite em dois municípios da bacia leiteira do Maranhão. Em que se constata a diversidade de agentes envolvidos com predominância de bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, com elevada frequência de *S. aureus*.

É imprescindível a implementação de medidas de controle nos rebanhos a fim de minimizar os danos causados. Outrossim, reforça-se a necessidade de mais trabalhos a serem desenvolvidos na área e que os produtores compreendam a necessidade de empregar o diagnóstico etiológico nas vacas com mastite a fim de implementar ou adequar medidas de controle, empregar protocolo de tratamento apropriado e promover uso racional de antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, N. C.; LARANJO, M.; COSTA, M. M.; QUEIROGA, M. C. Virulence factors in *Staphylococcus* associated with small ruminant mastitis: biofilm production and antimicrobial resistance genes. **Antibiotics**. v. 10, 2021.
- BABRA, C. *et al.* The persistence of biofilm-associated antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical bovine mastitis cases in Australia. **Folia Microbiology**. v. 58, 2013.
- BENITES, N. R. *et al.* Genotypic evaluation of antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine clinical mastitis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 73, 2021.
- CECILIANI, F. *et al.* The untargeted lipidomic profile of quarter milk from dairy cows with subclinical intramammary infection by non-*aureus* staphylococci. **Journal of Dairy Science**. v. 104, 2021.
- EID, R. H.; AREF, N. E.; IBRAHIM, E. S. Phenotypic diagnosis and genotypic identification of *Bacillus cereus* causing subclinical mastitis in cows. **Veterinary World**. v. 16, n. 15, 2023.
- ELEODORO, I. J.; FAGNANI, R. Agentes etiológicos e sensibilidade bacteriana na mastite subclínica no Brasil: uma revisão sistemática de dez anos. **Veterinary Italiana**. v. 4, 2022.
- FAZOLI, K. G. Z. *et al.* Resistance profile of bovine mastitis isolates, presence of the *mecA* gene and identification of ESBL producing strains from small rural dairy properties. **Animals**. v. 13, 2023.
- FRANCISCO, M. S. *et al.* Characterization of biofilms and antimicrobial resistance of coagulase-negative *Staphylococcus* species involved with subclinical mastitis. **Journal of Dairy Research**. v. 88, 2021.
- GOMES, A. F. N. *et al.* (2023). Perfil fenotípico de sensibilidade aos antimicrobianos de patógenos causadores de mastite subclínica em um rebanho mantido em compost barn. **In: Minas Láctea. 36º Congresso Nacional de laticínios**. Minas Gerais, 2023.
- JINMING, S. *et al.* Prevalence and risk factors of *Klebsiella* spp. in milk samples from dairy cows with mastitis – a global systematic review. **Frontiers Veterinary Science**. v. 10, 2023.
- KABELITZ, T. *et al.* The role of *Streptococcus* spp. in bovine mastitis. **Microorganisms**. v. 9, 2021.
- KONEMAN, E. W. *et al.* (2018). **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas**. 7ª ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. 1854 p, ISBN 978-85-277-3318-2.

KUHNEN, S. *et al.* Identification and antimicrobial susceptibility of milk pathogen isolated from dairy production systems. **Preventive Veterinary Medicine.** v. 194, 2021.

KUROSAWA, L. S. *et al.* Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. associados a mastite bovina. **Pubvet.** v. 14, n. 5, 2020.

LANGONI, H. *et al.* Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** v. 17, 2017.

LAVON, Y., M. *et al.* Two approaches to improve fertility of subclinical mastitic dairy cows. **Journal Dairy Science.** v. 99, 2019.

LOPES, T. S. *et al.* Species identification and antimicrobial susceptibility profile of bacteria associated with cow mastitis in Southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** v. 42, 2022.

MELLO, P. L. *et al.* *Staphylococcus* spp. isolated from bovine subclinical mastitis in different regions of Brazil molecular typing and biofilm gene expression. analysis by RT-qPCR. **Antibiotics.** v. 9, 2020.

MENG, L. *et al.* Characterization and spoilage potential of *Bacillus cereus* isolated from farm environment and raw milk. **Frontiers Microbiology.** v. 14, 2022.

MESQUITA, A. A. *et al.* *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*: prevalence, resistance to antimicrobials, and their relationship with the milk quality of dairy cattle herds in Minas Gerais state, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** v. 39, 2019.

MESQUITA, A. Q. *et al.* Association of tlr4 polymorphisms with subclinical mastitis in brazilian holsteins. **Brazilian Journal of Microbiology.** v 43, 2012.

MORITZ, F.; MORITZ, C. M. F. Resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. associados à mastite bovina. **Revista Ciência Veterinária e Saúde Pública.** v. 3, 2016.

OIKONOMOU, G. *et al.* Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomic 16s rDNA. **Plos One.** v. 7, 2012.

OLIVEIRA, R. P. *et al.* Diversity and emergence of multi-resistant *Staphylococcus* spp. isolated from subclinical mastitis in cows in of the state of Piauí, Brazil. **Veterinary Microbiology.** v. 53, 2022.

OWUSU-KWARTENG, J. *et al.* Prevalence, virulence factor genes and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* sensu lato isolated from dairy farms and traditional dairy products. **BMC Microbiology.** v. 17, 2017.

RAMBAULT, M. *et al.* Neutrophils expressing major histocompatibility complex class II molecules circulate in blood and milk during mastitis and show high microbicidal activity. **Journal of Dairy Science.** v. 106, 2023.

ROSSI, G. A. M. *et al.* Grupo *Bacillus cereus*: aspectos genéticos relacionados à segurança alimentar e ao processamento de laticínios. **Arquivo Instituto Biologia**. v. 85, 2018.

RUEGG, P. Minimizing the development of antimicrobial resistance on dairy farms: appropriate use of antibiotics for the treatment of mastitis. **Burleigh Dodds Science**. 2016.

SALAT, O.; LEMAIRE, G.; DUREL, L.; PERROT, F. Etiology of severe mastitis in French dairy herds. **Plos One**. v. 18, 2023.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Controle de mastite e qualidade do leite – Desafios e soluções**. 1. ed. Pirassununga-SP, 2019, 301 p. ISBN 978-85-915913-1-2

SHAH, M. S. *et al.* Methicillin resistance genes and *in vitro* biofilm formation among *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in India. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. v. 64, 2019.

SILVA, A. T. F.; RIZZO, H. Efeitos da mastite por *Staphylococcus* coagulase negativa sobre a qualidade do leite: uma revisão. **Revista Científica de Medicina Veterinária**. n. 32, 2019.

SILVA, N. C. C. *et al.* Characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in milk from cows with mastitis in Brazil. **Anton Leeuw**. v. 106, 2014.

SUOJALA, L.; KAARTINEN, L.; PYORALA, S. Treatment for bovine *Escherichia coli* mastitis – na evidence-based approach. **Journal Veterinary Pharmacology Therapeutic**. v. 36, 2013.

SWARTZ, T.; CHRISTINA, S. P. *Bacillus* spp. a practical summary for controlling mastitis dairy specialist. **Virginia Cooperative Extension**, United States, 2016.

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, 2012.

WANG, M. *et al.* Genome-wide dna methylation and transcriptome integration associates dna methylation changes with bovine subclinical mastitis caused by *Staphylococcus chromogenes*. **International Journal Molecular Science**. v. 24, 2023.

WARDA, A. K. *et al.* Influence of food matrix on outgrowth heterogeneity of heat damaged *Bacillus cereus* spores. **International Journal of Food Microbiology**. v. 201, 2015.

WENT, N.; KROMKER, V. *Streptococcus dysgalactiae* - Contagious or Environmental? **Animals**. v. 10, 2020.

XIANGBIN, C. *et al.* The prevalence of pathogens causing bovine mastitis and their associated risk factors in 15 large dairy farms in China: An observational study. **Veterinary Microbiology**. v. 247, 2020.

ZHAI, Z. *et al.* Prevalence, antimicrobial susceptibility, and antibiotic resistance gene transfer of *Bacillus* strains isolated from pasteurized milk. **Journal of Dairy Science**. v. 106, 2023.

ZIGO, F. *et al.* Maintaining optimal mammary gland health and prevention of mastitis. **Frontiers Veterinary Science**. v. 8, 2021.

ZIMERMANN, K. F.; ARAÚJO, M. E. M. Mastite bovina: agentes etiológicos e susceptibilidade a antimicrobianos. **Revista Ciências Exatas Terra e Ciências Agrárias**. v. 12, 2017.

**CAPÍTULO V. PESQUISA DE GENES TOXIGÊNICOS E DE
RESISTÊNCIA À METICILINA DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS
DE VACAS COM MASTITE**

5.1 INTRODUÇÃO

Espécies do gênero de *Staphylococcus* spp. são incriminados como principais causadores de mastite bovina em todo mundo (Vlieghe *et al.*, 2012; Bobbo *et al.*, 2017; Xiangbin *et al.*, 2020; Khasapane *et al.*, 2024). Devido principalmente seu arcabouço de mecanismos de patogenicidade e de resistência antimicrobiana, sua adaptabilidade à glândula mamária e sua forma de transmissão durante a ordenha, que garantem a sua invasão, desenvolvimento e persistência no local (Koneman *et al.*, 2018; Ren *et al.*, 2020; Andrade *et al.*, 2021).

A patogenicidade dos *Staphylococcus aureus* é caracterizada por diversos fatores, como a produção de: (i) proteínas secretoras – exotoxinas, dentre elas as citotoxinas que destroem as células do hospedeiro ou afetam suas funções; (ii) neurotoxinas que interferem na transmissão normal de impulsos nervosos; (iii) enterotoxinas que afetam as células que revestem o trato gastrointestinal; (iv) proteínas ligadas à superfície celular bacteriana e que colaboram na adesão às células do hospedeiro, evasão ou ativação do sistema imune e degradação do tecido do hospedeiro (Vanderghaeghen *et al.*, 2014; Koneman *et al.*, 2018).

Seu genoma apresenta flexibilidade com a presença de genes que codificam a formação de biofilmes, toxinas, resistência a antimicrobianos entre outros e que favorecem a sobrevivência em diversos ambientes (Ren *et al.*, 2020; Khasapane *et al.*, 2024). Dentre as diversas toxinas produzidas, tem-se as toxinas esfoliativas do tipo A (*eta*), B (*etb*), C (*etc*), D (*etd*) e E (*ete*) (Lee *et al.*, 1987; Yamoguchi *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2018; Pérez *et al.*, 2020). A toxina-1 da síndrome do choque tóxico – TSST-1 (*tst*) (Ruzim; Lindsay; Novick, 2001).

Além dos genes citados, outros genes que codificam resistência a antimicrobianos, também são importantes, como o gene *mecA*, que é responsável pela resistência à meticilina – MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina). Sendo importante sua identificação e monitoramento uma vez que contribuem para tomada de decisão nos protocolos de tratamento na produção animal, além dos animais poderem atuar como reservatórios zoonóticos destas cepas, o que poderia atingir, portanto, a cadeia alimentar. Ainda, este gene, avalia os riscos para população humana e promove compreensão da epidemiologia e das relações clonais das cepas circulantes (Smith, 2015; Wang *et al.*, 2018; Pérez *et al.*, 2020; Ramos *et al.*, 2023).

Para mais, esses genes que codificam toxinas e resistência dos *S. aureus* também são de grande relevância para a saúde pública, sendo os estafilococos os agentes patogênicos mais comumente incriminados em surtos e casos de intoxicações alimentares, seja pela transmissão por manipuladores, seja por produto de origem animal (Van Loo *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2019; Pal *et al.*, 2022; Ramos *et al.*, 2023). Em que, a intoxicação alimentar, atribuída à ingestão de toxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento, torna-se um risco para a saúde pública.

Além das toxinas, o perfil genético de resistência a antimicrobianos também é significativo por haver transferências verticais e horizontais de genes de resistência entre bactérias da mesma espécie e de espécies diferentes. Podendo assim, os animais atuarem como reservatórios dessas cepas, que poderiam, portanto, atingir a cadeia alimentar e aumentar os riscos de tratamentos maus sucedidos na medicina humana (Gonzalez *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018; Calahorrano-Moreno *et al.*, 2022).

Posto isto, devido à grande importância no que diz respeito à saúde animal e humana, é essencial obter informação sobre dos genes que codificam fatores de virulência e resistência e sua distribuição. Desta forma, objetivou-se com este estudo pesquisar genes toxigênicos e de resistência à meticilina em isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos de leite de vacas diagnosticadas com mastite.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Amostras Bacterianas

O total de 90 isolados de *S. aureus* recuperados de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite pertencentes a 11 rebanhos localizados nos municípios de Imperatriz (n= 5/11) e São Francisco do Brejão (n= 6/11), no estado do Maranhão, foram utilizadas nesta pesquisa. A coleta das amostras, recuperação e identificação dos isolados foi realizada no período de maio de 2023 a março de 2024. As amostras estavam armazenadas a -20°C em meio de manutenção, caldo BHI (Brain Heart Infusion) com glicerol a 15%, no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Veterinária - CCA/UEMASUL.

A recuperação dos isolados armazenados foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal do Norte do Tocantins para os ensaios biomoleculares. Os isolados foram descongelados, inoculados em caldo BHI,

após 24 horas de incubação à 35°C, uma alçada foi transferida e estriada por esgotamento em ágar PCA (Plate Count Ágar) com incubação à 35°C por 24 horas para purificação. Uma colônia da placa era novamente inoculada em caldo BHI e incubada sob as mesmas condições anteriores para posterior extração de DNA.

5.2.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada segundo Ribeiro Júnior *et al.* (2016) em que um mililitro da amostra isolada no caldo BHI era transferido para *ependorf* e centrifugada a 15.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante era descartado e adicionado 200 µL tampão Tris-EDTA (cloreto de Tris 10 mM, EDTA 1 mM [pH 8,0]) e colocado em banho-maria a 100°C por 15 minutos seguido por banho de gelo pelo mesmo tempo. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm por 3 minutos. Do sobrenadante, foi retirado 50µL, transferido para novo tubo de *ependorf* e guardado no freezer para posterior realização da PCR. Todos os materiais utilizados eram RNA e DNA free.

5.2.3 Condições de PCR Multiplex e Uniplex

Duas reações, uma multiplex para detecção de genes que codificam a síntese das toxinas esfoliativas A e B (*eta* e *etb*) e toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1; *tst*); e outra uniplex para detecção do gene *mecA*, foram realizadas utilizando os iniciadores de PCR descritos por Mehrotra *et al.* (2000) com condições de amplificação modificadas (Tabela 1). Cada ensaio de PCR foi emparelhado com um controle positivo (*S. aureus* ATCC 25923) e negativo (água ultrapura).

Tabela 1 – Genes codificadores de toxinas estafilocócicas, iniciadores, produtos de amplificação esperada e condições de reação para cada ensaio da reação em cadeia da polimerase

Gene	Primer	pb	Amplificação
<i>tst</i>	ACCCCTGTTCCCTTATCATC TTTTCAGTATTTGTAACGCC	326	94°C, 5 min; 35 x (92°C, 2 min; 57°C, 2 min; 72°C, 1 min) 72°C, 7 min
<i>eta</i>	GCAGGTGTTGATTTAGCATT AGATGTCCCTATTTTTGCTG	93	
<i>etb</i>	ACAAGCAAAAAGAATACAGCG GTTTTTGGCTGCTTCTCTTG	226	
<i>mecA</i>	ACTGCTATCCACCCTCAAAC CTGGTGAAGTTGTAATCTGG	163	95°C, 5 min 35 x (95°C, 1 min; 52°C, 30 s; 72°C, 45 s) 72°C, 5 min

Fonte: Menhotra *et al.* (2000) com modificações otimizadas.

A PCR foi realizada utilizando aproximadamente 50 ng de DNA, 100 nM de cada dNTP, 2,5 µL de tampão 10X, 75 mmol/L de MgCl₂, 20 pmol/L de cada primer, 2,5 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen, CA) e água ultrapura em quantidade suficiente para um volume final de 25 µL. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%, corados em solução de brometo de etídio 20 mg/L por 20 min e observados sob luz UV.

5.2.4 Análise Estatística

Os resultados foram tabulados em planilha do Microsoft Excel 2019® e analisados pelo programa Jamovi® versão 4.1.14. Foi feita análise descritiva dos dados e aplicado o teste *t* de Student para verificar associação significativa ($p < 0.05$) entre os genes de patogenicidade e os municípios pesquisados.

5.2.5 Aspectos Éticos

Não houve sujeito humano ou animal, desta forma não foi necessária aprovação em comitês de ética em pesquisa.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 90 isolados de *S. aureus*, 43 (47,77%) possuíam genes que codificavam alguma toxina estafilocócica (*eta*, *etb*, *tst*) e/ou de resistência à meticilina (*mecA*), sendo que em duas amostras foram identificados dois genes codificantes de fatores diferentes (*eta+mecA* e *eta+tst*). Os fatores de virulência para toxina esfoliativa, *eta* e *etb*, foram encontrados em 6 (6,66%) e 1 (1,11%) dos isolados, respectivamente. O gene *tst* foi o de maior ocorrência sendo identificado em 36 (40%) isolados e o gene *mecA* identificado em 2 (2,22%) amostras de *S. aureus* (Tabela 2 e Figura 1).

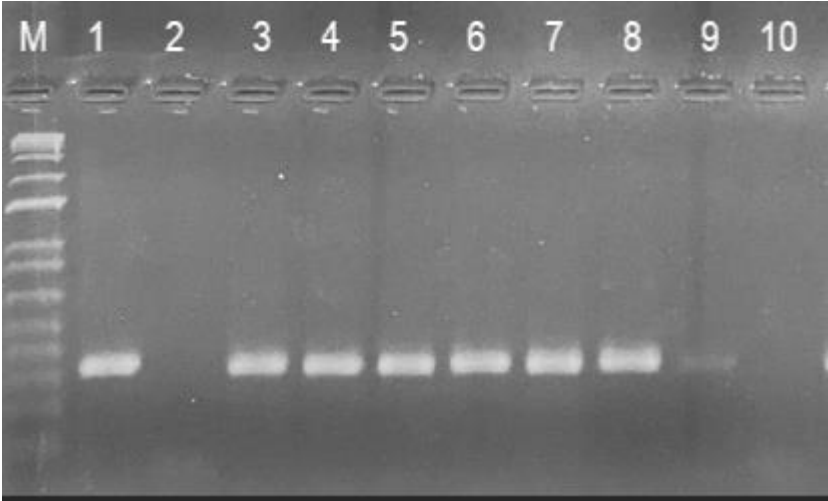
Tabela 2 – Perfil genético para produção de toxinas estafilocócicas e de resistência à meticilina a partir de isolados de *S. aureus* oriundos de vacas com mastite de rebanhos leiteiros por município de origem

REBANHO	MUNICÍPIO	ISOLADOS <i>S. aureus</i>	GENES			
			<i>eta</i>	<i>etb</i>	<i>tst</i>	<i>mecA</i>
1	IMPERATRIZ	4	0	0	0	0
2	IMPERATRIZ	6	1*	0	2	0
3	IMPERATRIZ	3	0	0	0	0
4	IMPERATRIZ	9	1	0	1	0

5	IMPERATRIZ	4	0	0	0	0
6	SÃO Fco BREJÃO	16	0	1	2	2**
7	SÃO Fco BREJÃO	4	0	0	4	0
8	SÃO Fco BREJÃO	15	1	0	13	0
9	SÃO Fco BREJÃO	6	1	0	4	0
10	SÃO Fco BREJÃO	20	2	0	9	0
11	SÃO Fco BREJÃO	3	0	0	1	0
TOTAL (%)		90 (100)	6 (6,66)	1 (1,11)	36 (40)	2 (2,22)

Legenda: SÃO Fco BREJÃO = SÃO FRANCISCO DO BREJÃO; *= isolado que apresentou genes *eta* e *tst*; **=isolado que apresentou genes *tst* e *mecA*.
Fonte: Arquivo da autora (2024).

Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose mostrando produtos de amplificação por PCR multiplex para genes *eta*, *etb* e *tst* de *Staphylococcus aureus*



Legenda: M = Marcador de Peso Molecular de DNA (escala de 100 bp); Amostras positivas para gene *tst* (326 bp) = 1, 3 a 9; Amostras negativas = 2 e 10. Todas as amostras foram negativas para genes *eta* e *etb*.
Fonte: Arquivo da autora (2024).

Ao nível de significância de 0,05 foi observado diferença entre os municípios para o gene *tst* e total de genes de patogenicidade identificados nos rebanhos dos dois municípios. Em que, dos isolados pertencentes ao município de São Francisco do Brejão, 60,93% (n= 39/64) apresentaram pelo menos um fator de patogenicidade pesquisado; e em Imperatriz 15,38% (n= 4/26) dos isolados tiveram algum gene pesquisado (Tabelas 2 e 3).

Tabela 3 – Teste *t* de Student para identificar associação entre genes de patogenicidade oriundos de *Staphylococcus aureus* dos municípios de Imperatriz e São Francisco do Brejão, estado do Maranhão

Genes de patogenicidade	Estatística	p
<i>eta</i>	-0,621	0,550
<i>etb</i>	-0,905	0,389

<i>tst</i>	-2,328 ^a	0,045
<i>mecA</i>	-0,905	0,389
Total	-2,508 ^a	0,033

Nota: H_a μ IMPERATRIZ ≠ μ SÃO FRANCISCO DO BREJÃO

Fonte: Arquivo da autora (2024).

A colonização da glândula mamária das vacas por *S. aureus*, especialmente de cepas que apresentam genes para produção de toxinas ou de resistência antimicrobiana e, conseqüentemente contaminação do leite por ela produzido, é uma questão importante tanto para os produtores de leite quanto para a saúde pública, devido ao risco da contaminação dos alimentos (Wang *et al.*, 2018). Isso se deve, ao elevado potencial patogênico dessa bactéria para os seres humanos por diversas vias, incluindo os produtos alimentares. Desta forma, atenção deve ser dada aos bovinos por contribuírem como fonte de infecção de *S. aureus*, que representa risco para a cadeia alimentar (Hennekinne *et al.*, 2010; Pérez *et al.*, 2020; Pal *et al.*, 2022; Ramos *et al.*, 2023).

Na saúde animal, esses e outros fatores de virulência de *S. aureus* são importantes para as bactérias pois fazem com elas consigam escapar do sistema imune e permanecer por longos períodos na glândula mamária da vaca (Koneman *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018; Andrade *et al.*, 2021). As toxinas esfoliativas A e B (*eta* e *etb*) e toxina da síndrome do choque tóxico (*tst*) são consideradas superantígenos apresentando forte atividade celular, que leva a excessiva liberação de citocinas pró-inflamatória, causando inflamação, dano ao tecido mamário e ainda, apresentam efeitos imunomoduladores nas células efectoras do sistema imune, atenuando sua resposta imunológica de eliminação dos agentes infecciosos (Seo *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2018; Pérez *et al.*, 2020).

A ocorrência encontrada neste estudo para os fatores de virulência foi de 47,25%. Em pesquisas realizadas no Brasil e em outros países a frequência variou de 0 a 52,08% (Monistero *et al.*, 2018; Pizauro *et al.*, 2019; Mehrota *et al.*, 2000; Ren *et al.*, 2020; Vaughn *et al.*, 2020; Ribeiro Júnior *et al.*, 2024). Sendo necessário mais estudos para verificar a frequência, distribuição e papel de *S. aureus* na patogênese tanto nos animais quanto nas infecções/toxinfecções em humanos.

Para a saúde pública, esses genes codificantes de toxinas podem ser expressos e causar as intoxicações alimentares nos humanos, sendo os *S. aureus* os mais incriminados em intoxicações alimentares. E quanto mais fatores de virulência, maior pode ser o agravamento da doença. Ainda, as toxinas estafilocócicas podem

ser termoestáveis, permitindo que elas mantenham suas funções biológicas mesmo após tratamento térmico aplicado nos produtos (Stamford *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2016; Monistero *et al.*, 2018; olahorrano-Moreno *et al.*, 2022).

A resistência dos MRSA é conferida pela produção da proteína 2a de ligação à penicilina (PBP2a) codificada pelo gene *mecA*, um cassete cromossômico, transmissível entre espécies estafilocócicas como um elemento móvel (Hanssen; Sollid, 2005). As cepas de MRSA podem colonizar diferentes espécies de animais e os seres humanos, sendo importante tanto para saúde animal quanto para saúde pública (Smith, 2015; Gonzalez *et al.*, 2017; Pérez *et al.*, 2020).

Neste estudo, duas amostras foram positivas para o gene *mecA*, ambas pertencentes a um único rebanho do município de São Francisco do Brejão. Demonstrando que há genes de resistência na região, sendo imediatíssimo a necessidade de pesquisar e monitorar esses genes nos rebanhos leiteiros. Outros estudos encontraram ocorrência que variaram de 0 a 70%, demonstrando que o perfil de resistência entre os rebanhos é bem diferente, desde a não ocorrência até altas frequências dos genes de resistência (Mistry *et al.*, 2016; Klibi *et al.*, 2018; Aizawa *et al.*, 2019; Dorneles *et al.*, 2019; Kappeli *et al.*, 2019; Pizauro *et al.*, 2019; Gu *et al.*, 2019; Khasapane *et al.*, 2024; Ribeiro Júnior, 2024).

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno que ocorre naturalmente ao longo do tempo por modificações genéticas adquiridas seja por mutações, seleções ou aquisições de genes entre cepas e espécies. Entretanto, este acontecimento pode ser acelerado pelo uso incorreto de antimicrobianos e transferência de genes de resistência entre diferentes hospedeiros, incluindo humanos, animais e meio ambiente (Hennekinne *et al.*, 2010; Jutkina *et al.*, 2016; Koneman *et al.*, 2018).

Em suma, é essencial monitorar a epidemiologia, prevalência e ocorrência de fatores de virulência e resistência dos *Staphylococcus* para criar programas e estratégias que protejam a saúde humana e animal de acordo com a política de saúde única e previna perdas econômicas para produtores de leite.

5.4 CONCLUSÃO

Foram identificados genes que codificam a expressão de toxinas esfoliativas e do choque tóxico, além de um rebanho positivo para *S. aureus* resistente à meticilina. Essa detecção demonstra a necessidade de monitoramento dos rebanhos uma vez

que o prejuízo à sanidade da glândula mamária e persistência do agente pode prejudicar a produção e o potencial tecnológico do leite. Além disso, pode existir o risco intrínseco da disseminação do agente com distintos potenciais de virulência entre o rebanho, o leite e, no final da cadeia produtiva, com o consumidor. Dessa forma, a vigilância e manejo de animais deve ser monitorado para fortalecimento da cadeia produtiva, redução de perdas e promoção de saúde pública.

REFERÊNCIAS

- AIZAWA, J. *et al.* Estudo retrospectivo multicêntrico revela ausência de mastite bovina associada a MRSA no Brasil (1994 a 2016). **Journal of Infection in Developing Countries**. v. 13, 2019.
- ANDRADE JÚNIOR, F. P.; LIMA, B. T. D.; ALVES, T. W. B.; MENEZES, M. E. S. Fatores que propiciam o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* em alimentos e riscos atrelados a contaminação: uma breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. v. 18, 2019.
- ANDRADE, N. C.; LARANJO, M.; COSTA, M. M.; QUEIROGA, M. C. Virulence factors in *Staphylococcus* associated with small ruminant mastitis: biofilm production and antimicrobial resistance genes. **Antibiotics**. v. 10, n. 6, 2021.
- BOBBO, T. *et al.* Associations between pathogen-specific cases of subclinical mastitis and milk yield, quality, protein composition, and cheese-making traits in dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 100, 2017.
- CALAHORRANO-MORENO, M. B. *et al.* Contaminants in the cows milk we consume? Pasteurization and others technologies in the elimination of contaminants. **F1000Rcs**. v. 11, 2022.
- DORNELES, E. M. S. *et al.* Genetic diversity and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* isolates from bovine mastitis in Minas Gerais, Brazil. **Microbiology Open**. v. 5, 2019.
- FAZOLI, K. G. Z. *et al.* Resistance profile of bovine mastitis isolates, presence of the *mecA* gene and identification of ESBL producing strains from small rural dairy properties. **Animals**. v. 13, 2023.
- FERREIRA, M. A. *et al.* Virulence profile and genetic variability os *Staphylococcus aureus* isolated from artesanal cheese. **Journal of Dairy Science**. v. 99, 2016.
- GONZALEZ, A. G. M. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in minas frescal cheese: evaluation of classic enterotoxin genes, antimicrobial resistance and clonal diversity. **FEMS Microbiology Letters**. v. 364, 2017.
- HANSEN, A. M.; SOLLID, J. U. E. *SCCmec* in staphylococci: genes on the move. **FEMS Immunol Med Microbiol**. v. 46, 2005.
- HENNEKINNE, J. A. *et al.* How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized? **Toxins**. v. 8, 2010.
- JUTKINA, J.; RUTGERSSON, C.; FLACK, C. F.; LARSSON, D. G. J. An assay for determining minimal concentrations of antibiotics that drive horizontal transfer of resistance. **Science and the Total Environment**. v. 548, 2016.

KAPPELI, N. *et al.* *Staphylococcus aureus* related to bovine mastitis in Switzerland: clonal diversity, virulence genes profiles, and antimicrobial resistance of isolates collected throughout 2017. **Journal of Dairy Science**. v. 102, 2019.

KHASAPANE, N. G. *et al.* Comprehensive whole genome analysis of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows with subclinical mastitis. **Frontiers Microbiology**. v. 15, 2024.

KLIBI, A.; MAAROUFI, A.; TORRES, C.; JOUINI, A. Detection and characterization of methicillin-resistant and susceptible coagulase-negative staphylococci in milk from cows with clinical mastitis in Tunisia. **International Journal Antimicrobiol Agents**. v. 52, 2018.

KONEMAN, E. W. *et al.* (2018). **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas**. 7ª ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. 1854 p, ISBN 978-85-277-3318-2.

LEE, C. Y. *et al.* Sequence determination and comparison of the exfoliative toxin A and toxin B genes from *Staphylococcus aureus*. **Journal Bacteriology**. v. 169, 1987.

LI, X. *et al.* Molecular characteristics and virulence gene profiles of *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infection. **Brazilian Journal Infectious Diseases**. v. 6, 2018.

MEHROTRA, M. G.; WANG, G.; JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic Shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal Clinical Microbiology**. v. 85, 2000.

MISTRY, H. *et al.* Prevalence and characterization of oxacillin susceptible meca-positive clinical isolates of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis in India. **Plos One**. v. 11, 2016.

MONISTERO, V. *et al.* *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in eight countries: genotypes, detection of genes encoding different toxins and other virulence genes. **Toxins**. v. 10, 2018.

PAL, M.; KETCHAKMADZE, D.; DURGLISHVILI, N.; KETCHAKMADASE, K. *Staphylococcus aureus*: a major pathogen of food poisoning: a rare research report. **Nutrition and Food Processing**. v. 5, 2022.

PÉREZ, V. K. C. *et al.* Relationship between virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. **Journal Global Antimicrobial Resistance**. v. 22, 2020.

PIZAURO, L. J. L. *et al.* Complete genome sequences of 11 *Staphylococcus* sp. strains isolated from buffalo milk and milkers' hands. **Microbiology Resource Announcements**. v. 8, 2019.

QU, Y. *et al.* Molecular epidemiology and distribution of antimicrobial resistance genes of *Staphylococcus* species isolated from Chinese dairy cows with clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**. v. 102, 2019.

RAMOS, G. L. P. *et al.* Quantitative risk assessment for type A staphylococcal enterotoxin poisoning due to consumption of minas frescal cheese in Brazil. **International Journal Dairy Technology**. v. 76, 2023.

REN, Q. *et al.* Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from subclinical bovine mastitis in southern Xinjiang, China. **Journal of Dairy Science**. v. 103, 2020.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C. *et al.* Efficiency of boiling and four Other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. **Semina: Ciências Agrícolas**. v. 37, 2016.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C. *et al.* Toxigenic characterization, spoilage potential, and antimicrobial susceptibility of coagulase-positive *Staphylococcus* species isolated from minas frescal cheese. **Journal of Dairy Science**. v. 107, 2024.

RUZIN, A.; LINDSAY, J.; NOVICK, R. P. Molecular genetics of SaPI1--a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*. **Molecular Microbiology**. V. 41, 2001.

SEO, K. S. *et al.* Long-term staphylococcal enterotoxin C1 exposure induces soluble factor-mediated immunosuppression by bovine CD4+ and CD8+ T cells. **Infection and Immunity**. v. 75, 2007.

SMITH, T. C. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: the United States experience. **Plos Pathogens**. v. 11, 2015.

STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G. M.; MOTA, R. A.; NETO, A. C. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus* spp. isolated of milk in natura. **Food Science Technology**. v. 26, 2006.

VAN LOO, I. *et al.* Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. **Emerging Infectious Diseases**. v. 13, 2007.

VANDERHAEGHEN, W. *et al.* Invited review: effect, persistence, and virulence of coagulase-negative *Staphylococcus* species associated with ruminant udder health. **Journal of Dairy Science**. v. 97, 2014.

VAUGHN, J. M.; ABDI, R. D.; GILLESPIE, B. E.; DEGO, O. K. Genetic diversity and virulence characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis. **Microbial Pathogenesis**. v. 144, 2020.

VLIEGHER, S. *et al.* Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention and control. *J Dairy Sci*. v. 95, 2012.

WANG, M. *et al.* Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* cultured from raw milk taken from dairy cows with mastitis in Beijing, China. **Frontiers Microbiology**. v. 9, 2018.

XIANGBIN, C. *et al.* The prevalence of pathogens causing bovine mastitis and their associated risk factors in 15 large dairy farms in China: An observational study. **Veterinary Microbiology**. v. 247, 2020.

**CAPÍTULO VI. PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS AGENTES
ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS CAUSADORAS DE MASTITE
BOVINA ISOLADAS NA REGIÃO OESTE DO MARANHÃO**

6.1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma doença complexa e de difícil controle a campo e, sendo a principal doença da bovinocultura de leite, é extensivo o uso de antimicrobianos e associação com microrganismos resistentes e multirresistentes. Sabe-se que o uso de antimicrobianos gera custos e problemas como descarte do leite, resíduos de antimicrobianos no leite e carcaça, desenvolvimento de resistência. E estes riscos são tanto para o rebanho e produtor, como também para a indústria leiteira e consumidores (Santos; Fonseca, 2019; Kour *et al.*, 2023).

Os diversos tipos de microrganismos causadores da mastite bovina têm características intrínsecas que lhes favorecem diferentes respostas frente aos distintos antimicrobianos utilizados nos protocolos de tratamentos. Desta forma, o sucesso da terapia é altamente influenciado pelo patógeno envolvido e características relacionadas à vaca, como idade, histórico de mastite, contagem de células somáticas (CCS), estado nutricional e imunológico, por exemplo. E o tratamento adequado é extremamente necessário nos rebanhos leiteiros pois é a principal medida para reduzir a duração e promover a cura dos casos de mastite, quando a vaca não consegue resolver sozinha a infecção e, assim, diminuir a prevalência da doença no rebanho (Rueg, 2017; Langoni *et al.*, 2017; Lavor *et al.*, 2019).

O uso indiscriminado e extensivo de antimicrobiano e resistência antimicrobiana estão associados a formação de biofilmes e são responsáveis por pobre resposta antimicrobiana (Kour *et al.*, 2023). Desta forma, o diagnóstico etiológico dos casos de mastite é importante para indicar o melhor tratamento. Uma vez que, nem sempre há necessidade de aplicar antimicrobiano, ou às vezes é válido, para melhor resultado, a terapia estendida ou até mesmo associação com tratamento sistêmico, em casos mais graves de mastite clínica. Diversos protocolos podem ser empregados a depender da situação e do tipo de microrganismo causador.

A resistência aos antimicrobianos ocorre naturalmente ao longo do tempo, normalmente devido mutações cromossômicas, transferência horizontal via plasmídeos, integrons, transposons. Entretanto, a seleção de cepas resistentes pode ser acelerada pelo uso incorreto de antimicrobianos (Pérez *et al.*, 2020). Diversos são os mecanismos de resistência antimicrobiana, como inativação enzimática, bomba de efluxo, modificação do local alvo, mutação de proteínas efetoras, limitação da absorção do antimicrobiano (Munita; Arias, 2016; Reygaert, 2018).

Em um contexto contemporâneo, com uma sociedade cada vez mais consciente dos riscos e, de fato, aos grandes problemas que a resistência antimicrobiana causa, especialmente na saúde humana. Progressivamente, aumenta a pressão para menor uso de antimicrobianos na criação de animais, para reduzir os riscos de desenvolvimento de resistência antimicrobiana e, conseqüentemente, tantas internações e até mesmo óbitos causados por bactérias multirresistentes.

Desta forma, o conhecimento da sensibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos é essencial na tomada de decisão quanto às terapias empregadas e avaliação do uso de antimicrobiano na pecuária leiteira e, além disso, para o monitoramento dos riscos para a população humana. Assim, objetivou-se com o estudo avaliar o perfil de sensibilidade de bactérias isoladas de leite de vacas com mastite frente aos antimicrobianos comumente usados no tratamento de mastite bovina.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Amostras Bacterianas

Um total de 270 isolados bacterianos recuperados de leite de vacas diagnosticadas com mastite, sendo 94 isolados pertencentes a sete rebanhos localizados no município de Imperatriz - MA e 176 isolados de 10 rebanhos localizados em São Francisco do Brejão - MA, coletadas no período de maio a dezembro de 2023, foram utilizadas nesta pesquisa. As amostras estavam armazenadas sob congelamento em meio de manutenção, caldo BHI (Brain Heart Infusion) com glicerol a 15%, no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Veterinária - CCA/UEMASUL.

Dos 270 isolados, 90 eram *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), 70 *Staphylococcus aureus*, 67 *Staphylococcus* coagulase positiva não-aureus (SCP), 36 *Bacillus* spp., quatro *Enterococcus* spp. e três *Streptococcus* spp. Para realização do antibiograma, as amostras foram descongeladas, inoculadas em ágar sangue de equino a 5% e incubadas à 35°C por 24 horas.

6.2.2 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana

A sensibilidade antimicrobiana foi realizada pelo método de disco-difusão em ágar Mueller-Hinton de acordo com o manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2022) ou o Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

(Br-Cast, 2023). Como critérios para a definição dos antimicrobianos foram utilizados: fazer parte do princípio ativo dos medicamentos comercializados na região para tratamento intramamário da mastite, ter padrão de referência nos manuais supracitados e ter disponibilidade comercial de discos de antimicrobianos. Desta forma foram incluídos no teste: cefoxitina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), penicilina G (10 unidades), sulfametoxazol-trimetoprim (1.25/23.75 µg) e tetraciclina (30 µg), pertencentes respectivamente às classes: cefalosporinas, quinolonas, macrolídeos, aminoglicosídeos, penicilinas, sulfonamidas e tetraciclinas. Amostra de referência *S. aureus* ATCC 25923 foi usada como amostra controle. Isolados multirresistentes foram definidos quando resistentes a no mínimo três diferentes classes de antimicrobianos testados.

As colônias foram suspensas em solução salina e padronizadas na escala 0,5 McFarland, equivalente à 10^8 células/mL, adicionados os discos de antibióticos e incubadas à 35°C por 18 horas (CLSI, 2022). Os discos de antibióticos foram usados de acordo com o padrão de referência existentes nos referidos manuais. Assim, para amostras de *Staphylococcus* spp. foram testadas com os sete antibióticos citados. Para os isolados de *Enterococcus* spp. os antimicrobianos ciprofloxacina, eritromicina, penicilina G e tetraciclina. *Streptococcus* spp. foram testados para cefoxitina, eritromicina, penicilina G, sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina e *Bacillus* spp. testados com ciprofloxacina e eritromicina. Apenas para a referência de cefoxitina para os *Staphylococcus* spp, sulfametoxazol-trimetoprim dos *Streptococcus* spp. e ciprofloxacina e eritromicina dos *Bacillus* spp. foram utilizados o manual Br-Cast, para os demais foi usado o CSLI.

6.2.3 Análise Estatística

Os resultados foram tabulados em planilha do Microsoft Excel 2019® e analisados pelo programa Jamovi® versão 4.1.14. Foi feita análise descritiva dos dados e aplicado o teste do qui-quadrado para verificar associação significativa ($p < 0.05$) entre resultados dos testes de sensibilidade antimicrobiana e os municípios pesquisados, verificando que não houve diferença significativa entre eles.

6.2.5 Aspectos Éticos

Não houve sujeito humano ou animal, desta forma não foi necessária aprovação em comitês de ética em pesquisa.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 estão apresentados o perfil de sensibilidade dos agentes etiológicos aos antimicrobianos, sendo possível observar elevada sensibilidade dos isolados. Entretanto, os estafilococos apresentaram maior percentagem de resistência à penicilina e tetraciclina; e os *Enterococcus* spp. foram 100% (n= 4/4) resistentes à tetraciclina.

Tabela 1 – Perfil de sensibilidade de agentes etiológicos isolados de vacas com mastite pertencentes aos municípios de Imperatriz e São Francisco do Brejão, estado do Maranhão, frente aos sete antimicrobianos testados

ANTIMICROBIANOS		<i>Bacillus</i> spp. (36) n (%)	<i>Enterococcus</i> spp. (4) n (%)	<i>S. aureus</i> (70) n (%)	SCN (90) n (%)	SCP (67) n (%)	<i>Streptococcus</i> spp. (3) n (%)
CEFOXITINA		-	-				
	R			1 (1,42)	2 (2,22)	1 (1,5)	3 (100)
	S			69 (98,58)	88 (97,78)	66 (98,5)	0 (0,0)
CIPROFLOXACINA							-
	I	35 (97,22)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
	S	1 (2,78)	4 (100)	70 (100)	90 (100)	67 (100)	
ERITROMICINA			-				
	I	0 (0,0)		0 (0,0)	5 (5,56)	0 (0,0)	2 (66,67)
	R	2 (5,56)		1 (1,42)	4 (4,44)	1 (1,5)	0 (0,0)
	S	34 (94,44)		69 (98,58)	81 (90,0)	66 (98,5)	1 (33,33)
GENTAMICINA		-	-				-
	S			70 (100)	90 (100)	67 (100)	
PENICILINA G		-					
	R		0 (0,0)	32 (45,71)	46 (51,11)	28 (41,79)	3 (100)
	S		4 (100)	38 (54,29)	44 (48,89)	39 (58,21)	0 (0,0)
SULFA/TRIMETOPRIM		-	-				
	I			0 (0,0)	1 (1,11)	0 (0,0)	0 (0,0)
	R			0 (0,0)	2 (2,22)	0 (0,0)	0 (0,0)
	S			70 (100)	87 (96,67)	67 (100)	3 (100)
TETRACICLINA		-					
	I		0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,13)	0 (0,0)
	R		4 (100)	8 (11,43)	4 (4,44)	19 (28,35)	1 (33,33)
	S		0 (0,0)	62 (88,57)	86 (95,56)	47 (70,15)	2 (66,67)

Legenda: SCN = *Staphylococcus* coagulase negativa; SCP = *Staphylococcus* coagulase positiva não-aureus; SULFA/TRIMETOPRIM = Sulfametoxazol + Trimetoprim; R = Resistente; I = Intermediário; S = Sensível

Fonte: Arquivo da autora (2024).

Observa-se que a maior ocorrência de resistência foi encontrada no gênero *Staphylococcus*, especialmente para penicilina (46,69%; n= 106/227) e tetraciclina (13,65%; n= 31/227). A penicilina é um antimicrobiano extensivamente usado na medicina veterinária e outras pesquisas também encontraram resistência a penicilina, variando de 14 a 86% e tetraciclina de 3,5 a 96,7% (Soares *et al.*, 2017; Blibi *et al.*, 2018; Dorneles *et al.*, 2018; Kappeli *et al.*, 2019; Pizauro *et al.*, 2019; Quiang Ren *et al.*, 2020; Benites *et al.*, 2021; Lopes *et al.*, 2021; Shahid *et al.*, 2023; Kasapane *et al.*, 2024).

Sabe-se que o perfil de resistência aos antimicrobianos são, normalmente, específicos da região devido aos microrganismos circulantes e antimicrobianos usados. Assim, suspeita-se que a significativa ocorrência de sensibilidade das amostras pode ser devido ao baixo emprego de tratamentos antimicrobianos usados nos casos de mastite bovina da região.

Apesar dos resultados apresentarem boa expectativa na resposta ao tratamento com antimicrobianos mostrando alta sensibilidade, vale ressaltar, que este é um teste *in vitro* e que essa resposta pode não ser verificada à campo. Essa última situação pode ser atribuída a diversos fatores, sejam eles relacionados ao animal, como a capacidade de resposta imune, idade, estágio de lactação, histórico de casos de mastite, CCS, número de quartos afetados. Sejam aqueles relacionados com características intrínsecas dos agentes etiológicos relacionados aos seus mecanismos de patogenicidade e sensibilidade antimicrobiana. Ou ainda, relacionado ao protocolo de tratamento empregado, como espectro de atividade da droga, via de administração, concentração no local da infecção e duração do tratamento (Kromker; Leimbach, 2017; Rainard *et al.*, 2018; Shah *et al.*, 2019; Sharum *et al.*, 2021).

Nesse sentido, vale destacar a expressiva capacidade que os estafilococos apresentam de evadirem da resposta imune e ainda, da menor atividade dos antimicrobianos sobre eles. Seja por formação de biofilmes, de abscessos, do seu maior poder de invasão nos tecidos da glândula mamária, capacidade de sobrevivência intracelular entre outros fatores (Babra *et al.*, 2013; Mesquita *et al.*, 2019; Shah *et al.*, 2019). Atenção também deve ser dada aos estreptococos que, apesar do pequeno número de amostras, houve alta porcentagem de resistência à

tetraciclina, cefoxitina e penicilina. O que pode levar a menor cura bacteriológica nos tratamentos empregados, mesmo estes sendo considerados bem responsivos aos protocolos de tratamento. E, conseqüentemente, maior sucesso na colonização e disseminação dos microrganismos entre os hospedeiros.

Neste trabalho foi encontrado 1,11% (n= 3/270) de isolados multirresistentes, encontrada em *S. aureus*, SCN e *Streptococcus* spp. em que todas foram resistentes a cefoxitina, penicilina e tetraciclina, além da eritromicina para os estafilococos. Para cada grupo de bactérias foram encontradas amostras resistentes a pelo menos um antimicrobiano testado, onde a variação em relação ao agente etiológico foi de 0,7% para *Bacillus* spp. a 17,4% para SCN, totalizando 49,26% (n= 133/270). Enquanto, em relação à sensibilidade apresentada, essa variou de 0% para *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp. a 15,6% para SCN, com um total de 49,63% (n= 134/270) de amostras sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Desta forma, verifica-se que, parte considerável das amostras apresentam perfil fenotípico de resistência a pelo menos um antimicrobiano testado (Tabela 2).

Tabela 2 – Resistência antimicrobiana de agentes etiológicos isolados de vacas com mastite pertencentes aos municípios de Imperatriz e São Francisco do Brejão, estado do Maranhão

Agente etiológico	Sensibilidade	Amostra (n)	% do Total	% Acumulada
<i>Bacillus</i> spp.	Multirresistente	0	0	0
	Resistente	2	0,7	0,7
	Sensível	34	12,6	13,3
<i>Enterococcus</i> spp.	Multirresistente	0	0	13,3
	Resistente	4	1,5	14,8
	Sensível	0	0	14,8
<i>S. aureus</i>	Multirresistente	1	0,4	15,2
	Resistente	37	13,7	28,9
	Sensível	32	11,9	40,7
SCN	Multirresistente	1	0,4	41,1
	Resistente	47	17,4	58,5
	Sensível	42	15,6	74,1
SCP	Multirresistente	0	0	74,1

	Resistente	41	15,2	89,3
	Sensível	26	9,6	98,9
<i>Streptococcus</i> spp.	Multirresistente	1	0,4	99,3
	Resistente	2	0,7	100
	Sensível	0	0	100

Legenda: Multirresistente: resistente a três ou mais antimicrobianos testado para o gênero; Resistente: resistente a um ou dois antimicrobianos testado para o gênero; Sensível: sensível a todos os antimicrobianos testados para o gênero.

Fonte: Arquivo da autora (2024).

A resistência antimicrobiana é importante não apenas considerando a tomada de decisão para o tratamento animal, bem como perspectivas econômicas, mas também para a saúde pública. Visto que, já foram identificados genes associados a resistência antimicrobiana, que, a priori, acreditava estar restrita aos animais, e que nos últimos anos foram encontrados em cepas de origem humana (Pérez *et al.*, 2020).

Nesse sentido, destaca a importância do conhecimento do perfil de resistência em bactérias encontradas como causadoras de mastite, pela ameaça à saúde pública, seja por meio do consumo de leite e derivados, seja pelo risco ocupacional, por colaboradores estarem mais expostos ao contato próximo com os animais e tendo maior probabilidade de serem colonizados por cepas resistentes de animais (Smith, 2015; Pal *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2022; Ramos *et al.*, 2023). Assim, o monitoramento contribui com a política de saúde única, criando programas e estratégias para proteger a saúde animal e prevenir perdas econômicas dos produtores, bem como, beneficiar a saúde humana.

Isto posto, o tratamento de mastite deve ser pensado a partir do conhecimento dos microrganismos causadores da mastite nos rebanhos e do seu perfil de sensibilidade antimicrobiana, para minimizar os riscos de desenvolvimento de resistência. Para mais, programas de biossegurança que contribuam com a saúde da glândula mamária com medidas de prevenção, higiene da vaca, ambiente e instalações, suplementação de micronutrientes para melhorar o sistema imunológico, inovação entre outras, são essenciais para reduzir a incidência da doença e, por conseguinte, o uso de antimicrobianos.

Outros tratamentos, que não antimicrobianos, são promissores no futuro, como bacteriófagos, endolisinas, probióticos, concentrado plaquetário, compostos naturais, homeopatia, fitoterapia, imunomoduladores, nanopartículas, células tronco,

pulsoterapia (Leitner *et al.*, 2018; Tiwari *et al.*, 2018; Castelani *et al.*, 2019; Pellegrino *et al.*, 2019; Peralta *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2021; Kour *et al.*, 2023).

6.4 CONCLUSÃO

Os isolados bacterianos mostraram elevada sensibilidade antimicrobiana, entretanto, o estudo mostra que há fenótipo de resistência para a grande maioria dos gêneros pesquisados. Apesar da multirresistência encontrada ter sido baixa, deve-se considerar o potencial de transmissibilidade de genes entre as bactérias, o que pode mudar o cenário ao longo do tempo, fazendo-se necessário o monitoramento da resistência antimicrobiana na região.

Identificar os microrganismos causadores da mastite e avaliar seu perfil de sensibilidade antimicrobiana é extremamente útil para o planejamento de protocolos de tratamentos e medidas de controle e prevenção a serem empregadas nos rebanhos. E assim, reduzir a prevalência da mastite, melhorar o bem-estar animal, a produtividade e os lucros no setor. Ademais, fornecer um produto de maior qualidade e menor risco à saúde do consumidor.

REFERÊNCIAS

- BABRA, C. *et al.* The persistence of biofilm-associated antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical bovine mastitis cases in Australia. **Folia Microbiology**. v. 58, 2013.
- BENITES, N. R. *et al.* Genotypic evaluation of antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine clinical mastitis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 73, 2021.
- BRAZILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING – **BrCAST-EUCAST**, versão 15-03-2023. Disponível em: <http://www.brcast.org>". Acesso em: abril de 2024.
- CASTELANI, L. *et al.* Short communication: Activity of nisin, lipid bilayer fragments and cationic nisin-lipid nanoparticles against multidrug-resistant *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**. v. 102, 2019.
- CLSI. **Performance Standards of Antimicrobial Susceptibility Testing**. 32nd ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2022.
- DORNELES, E. M. S. *et al.* Genetic diversity and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococcus* isolates from bovine mastitis in Minas Gerais, **Brazil**. **Microbiology Open**. v. 8, 2019.
- GUO, M. *et al.* Bacteriophage cocktails protect dairy cows against mastitis caused by drug resistant *Escherichia coli* infection. **Frontiers Cell. Infectious Microbiology**. v. 11, 2021.
- KAPPELI, N. *et al.* *Staphylococcus aureus* related to bovine mastitis in Switzerland: clonal diversity, virulence genes profiles, and antimicrobial resistance of isolates collected throughout 2017. **Journal of Dairy Science**. v. 102, 2019.
- KHASAPANE, N. G. *et al.* Comprehensive whole genome analysis of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows with subclinical mastitis. **Frontiers Microbiology**. v. 15, 2024.
- KLIBI, A.; MAAROUFI, A.; TORRES, C.; JOUINI, A. Detection and characterization of methicillin-resistant and susceptible coagulase-negative staphylococci in milk from cows with clinical mastitis in Tunisia. **International Journal Antimicrobial Agents**. v. 52, 2018.
- KOUR, S. *et al.* Advances in diagnostic approaches and therapeutic management in bovine mastitis. **Veterinary Science**. v. 10, 2023.
- KROMKER, V.; LEIMBACH, S. Mastitis treatment - Reduction in antibiotic usage in dairy cows. **Reproduction in Domestic Animal**. V. 52, p. 21-29, 2017.

LANGONI, H. *et al.* Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 17, 2017.

LAVON, Y., M. *et al.* Two approaches to improve fertility of subclinical mastitic dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 99, 2019.

LEITNER, G.; ZILBERMAN, D.; PAPIROV, E.; SHEFY, S. Assessment of acoustic pulse therapy (APT), a non-antibiotic treatment for dairy cows with clinical and subclinical mastitis. **Plos One**. v. 13, 2018.

LOPES, T. S. *et al.* Species identification and antimicrobial susceptibility profile of bacteria associated with cow mastitis in Southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 42, 2022.

MESQUITA, A. A. *et al.* *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*: prevalence, resistance to antimicrobials, and their relationship with the milk quality of dairy cattle herds in Minas Gerais state, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 39, 2019.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Microbiol Spectr**. v. 4, 2016.

PAL, M.; KETCHAKMADZE, D.; DURGLISHVILI, N.; KETCHAKMADASE, K. *Staphylococcus aureus*: a major pathogen of food poisoning: a rare research report. **Nutrition and Food Processing**. v. 5, 2022.

PELLEGRINO M. S., *et al.* *In Vitro* characterization of lactic acid bacteria isolated from bovine milk as potential probiotic strains to prevent bovine mastitis. **Probiotics Antimicrobiology Proteins**. v. 11, 2019.

PERALTA, O. A. *et al.* Safety and efficacy of a mesenchymal stem cell intramammary therapy in dairy cows with experimentally induced *Staphylococcus aureus* clinical mastitis. **Reports Scientific**. v. 10, 2020.

PÉREZ, V. K. C. *et al.* Relationship between virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. **Journal Global Antimicrobial Resistance**. v. 22, 2020.

PIZAURO, L. J. L. *et al.* Complete genome sequences of 11 *Staphylococcus* sp. strains isolated from buffalo milk and milkers' hands. **Microbiology Resource Announcements**. v. 8, 2019.

RAINARD, P. *et al.* Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. **Transboundary and Emerging Diseases**. v. 65, 2018.

RAMOS, G. L. P. *et al.* Quantitative risk assessment for type A staphylococcal enterotoxin poisoning due to consumption of minas frescal cheese in Brazil. **International Journal Dairy Technology**. v. 76, 2023.

REYGAERT, W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS Microbiology**. v. 4, 2018.

RUEGG, P. L. A 100-year review: mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science**. v. 100, 2017.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Controle de mastite e qualidade do leite – Desafios e soluções**. 1. ed. Pirassununga-SP, 2019, 301 p. ISBN 978-85-915913-1-2

SHAH, M. S. *et al.* Methicillin resistance genes and *in vitro* biofilm formation among *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in India. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. v. 64, 2019.

SHAHID, M. *et al.* Occurrence of virulence genes among methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis. **ACS Omega**. v. 8, 2023.

SHARUM *et al.* Advances in therapeutic and managemental approach of bovine mastitis: a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**. v. 41, 2021.

SILVA, J. G. *et al.* *mecA* positive *Staphylococcus* spp. in bovine mastitis, milkers, milking environment, and the circulation of different MRSA clones at dairy cows farms in the Northeast region of Brazil. **Microbiology**. v. 52, 2022.

SMITH, T. C. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: the United States experience. **Plos Pathogens**. v. 11, 2015.

SOARES, B. S. *et al.* Characterization of virulence and antibiotic profile and agr typing of *Staphylococcus aureus* from milk of subclinical mastitis bovine in State of Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.69, n.4, p.843-850, 2017.

CAPÍTULO VII. RELATANDO EXPERIÊNCIAS: DO DIAGNÓSTICO À CONSCIENTIZAÇÃO

7.1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura de leite no estado do Maranhão tem grande importância para o setor econômico, uma vez que, tem alta concentração de mão de obra e geração de empregos, renda e tributos, que neste caso, só perde para a construção civil (FUNDEPEC, 2018). Entretanto, conforme dados do IBGE (PPM, 2022), para a região Nordeste, o estado do Maranhão apresenta baixa produtividade, ficando em último lugar neste quesito (relação produção leite/vacas ordenhadas), estando em 3º lugar no número de vacas ordenhadas (15,94% - 618440/3879613) e em 6º na produção de leite da região, contribuindo com 7,9% (405898/5723993 mil litros) do total da produção leiteira do Nordeste. Estes dados demonstram o grande potencial produtivo e capacidade de expansão do estado na cadeia do leite.

O limitado índice produtivo pode ser decorrente do baixo nível tecnológico, melhoramento genético, manejo sanitário e alimentar, assistência técnica, pesquisa, logística de transporte, falta de gestão entre outros (SENAR; 2016; Dantas *et al.*, 2018; Cangussu; Rocha; Viana, 2020). Sendo a assistência técnica apontada como importante problemática no desenvolvimento da agropecuária, pois esta tem melhor poder de planejamento e estruturação de todo o rebanho para melhores índices produtivos e reprodutivos conforme sua realidade (FUNDEPEC, 2018; Silva *et al.*, 2020; Brito *et al.*, 2020; Abreu; Oliveira; Roboredo, 2021)

Assim, segundo Silva *et al.* (2023) é necessário maiores investimentos em pesquisa e, especialmente, em órgãos de assistência técnica e extensão rural, para melhorar as estratégias de prevenção e controle das enfermidades, bem como condições de higiene, sanidade e manejo dos rebanhos. Havendo a necessidade de reestruturação dos serviços de extensão rural oferecidos pelo estado, a fim de promover o desenvolvimento da agropecuária e ainda, o beneficiamento da saúde única, que engloba o homem, o animal e o ambiente.

Considerando a mastite bovina, como a principal enfermidade da bovinocultura de leite, importante atenção deve ser dada à esta infecção dentro dos rebanhos. Uma vez que, a inflamação da glândula mamária pode diminuir a produção, bem-estar, sanidade, reprodução, composição e qualidade do leite e ainda acarretar riscos à saúde humana. Gerando prejuízos à toda cadeia leiteira, desde o produtor, perpassando pela indústria e atingindo até mesmo os consumidores.

A ocorrência da mastite nos rebanhos leiteiros está relacionada, sobretudo, ao manejo de ordenha. Desse modo, é importante que o ordenhador tenha consciência dos procedimentos adequados de ordenha, principalmente a respeito das formas apropriadas de higienização e desinfecção do ambiente, do animal, do profissional e dos utensílios utilizados na ordenha (Langoni *et al.* 2017).

Para reduzir infecções intramamárias faz-se necessária orientações sobre a temática e atividades de suporte para produtores, tais como atividade extensionista, palestras e treinamento direcionados a eles (Rueg, 2017). De forma a conscientizar e apresentar sobre as técnicas de diagnóstico, identificação dos agentes etiológicos envolvidos, protocolos de tratamento adequado, limpeza e desinfecção dos tetos e ambiente de ordenha, rotina adequada do manejo de ordenha.

O controle da mastite é baseado na redução do período e cura das vacas infectadas e na prevenção de novas infecções. Desta maneira, é importante que haja diagnóstico e um bom protocolo de tratamento das vacas, bem como manejo de ordenha adequado. Assim, o objetivo deste trabalho foi promover educação sanitária aos produtores da bacia leiteira da região Tocantina do estado do Maranhão, informando sobre os principais agentes etiológicos envolvidos nos casos de mastite da região, as técnicas de diagnóstico, os protocolos de tratamento, medidas de controle e prevenção e rotina de ordenha.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

O local de desenvolvimento das atividades de extensão foram os municípios de Imperatriz, São Francisco do Brejão e Porto Franco, estado do Maranhão, cidades que apresentam importante produção leiteira. Ficando, no ano de 2022, em 8º, 9º e 2º lugar, respectivamente, no ranking de produção leiteira do estado, totalizando uma produção de 38.233 mil litros de leite/ano. Além disso, os municípios da região Tocantina, que abrange as microrregiões de Imperatriz e Porto Franco, apresentam melhores características de tamanho e infraestrutura, melhor qualidade das pastagens além de adoção de tecnologias de reprodução (Bezerra *et al.*, 2017).

No período de maio a dezembro de 2023 foram visitados 17 rebanhos pertencentes aos municípios de Imperatriz e São Francisco do Brejão. Em que, era acompanhado a ordenha e realizado o diagnóstico da mastite clínica e subclínica nas vacas em lactação. A partir dos dados do diagnóstico da mastite nas vacas e

observação do ambiente e manejo de ordenha era realizado uma abordagem dialogada com o proprietário e/ou colaboradores sobre mastite, abordando questões sobre os prejuízos causados, formas de transmissão, importância do diagnóstico, protocolos de tratamento, rotina de ordenha e medidas de controle e prevenção a serem implementadas de acordo com a realidade de cada rebanho.

Ainda, houve a participação em dois Dia de Campo: um realizado pela Secretaria de Estado do Desenvolvimento Social – Programa de Aquisição de Alimento - Leite (PAA Leite) com o tema “Dia de Campo do PAA Leite: Do campo à mesa”, realizado em dezembro de 2023 em propriedade rural localizada à 12 km de Porto Franco; e o outro, realizado pelo SENAR (Serviço Nacional de Assistência Técnica), FAEMA (Federação da Agricultura e Pecuária – MA,) e SINRURAL (Sindicato Rural de Imperatriz) com o tema “Encontro de Produtores da Bovinocultura de Leite”, ocorrido em junho de 2024 em propriedade à 40 km de Imperatriz. Participação também na “1ª Feira Agropecuária de São Francisco do Brejão – FAB 2024”, em maio de 2024, com apresentação de uma palestra.

Nos dias de campo, a equipe ficava responsável por uma estação com o tema: “Mastite Bovina: Controle e Desafios da Região” em que cada grupo ficava um tempo de aproximadamente 30 minutos na estação. Durante este período, era apresentado os dados encontrados da mastite bovina na região (dados apresentados nos capítulos III e IV da tese), abordando, especialmente, sobre a prevalência da mastite, os agentes etiológicos envolvidos nos casos, a realidade de manejo e rotina na ordenha e formas de tratamento adequados, bem como, realizada a demonstração dos testes de diagnóstico da mastite clínica e subclínica. Na palestra, foi realizada a mesma abordagem, com uma maior explanação e participação dos produtores, totalizando um tempo de aproximadamente duas horas de diálogo.

Foi elaborado pôster explicativo sobre a mastite bovina sendo entregue a todos os participantes dos dias de campo e da palestra para melhor fixação do conteúdo (Apêndice C). Informando sobre a mastite clínica e subclínica e seu diagnóstico, rotina de ordenha, controle e tratamento. Além disso, foram distribuídos *kits* para diagnóstico de mastite clínica e subclínica, contendo caneca de fundo telado, raquete, solução CMT (*California Mastitis Test*) e panfleto informativo da técnica de realização do CMT.

Em todas as atividades foram utilizado material expositivo como banner nos dias de campo, projetor de *slides* na palestra e distribuição de pôster. O diálogo foi feito com uma linguagem simples e sempre dando abertura para perguntas e falas de sua

realidade para que houvesse maior participação. Essa forma simples de diálogo com o produtor, foi a maneira encontrada de fazer com que eles estivessem abertos a receber as informações e começar a pensar nas mudanças práticas e baratas que poderiam ser implementadas na rotina do rebanho leiteiro.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram atendidas aproximadamente 172 pessoas em todas as ações realizadas, com média de 27 pessoas nas propriedades visitadas, 40 no dia de campo em Porto Franco, 80 pessoas no dia de campo de Imperatriz e 25 na palestra em São Francisco do Brejão e entregue cerca de 130 fôlderes e 30 *kits* para diagnóstico da mastite clínica e subclínica (Figura 1).

Figura 1 – Ações de educação sanitária sobre mastite bovina ocorridas nos municípios de Imperatriz, São Francisco do Brejão e Porto Franco, estado do Maranhão, no período de maio de 2023 a junho de 2024



Fonte: Arquivo da autora (2024).

Notou-se que os produtores conheciam sobre a mastite, especialmente a clínica. Entretanto, na maioria dos casos, não havia conhecimento da importância dos casos de mastite subclínica, seus prejuízos e riscos. O manejo higiênico da ordenha, deve ser, o ponto mais complicado, pois relatam a dificuldade de colaboradores dispostos a realizar a rotina de ordenha de forma adequada. Na realidade, não apenas os trabalhadores contratados, mas também a eles mesmos, que ainda não

conseguem observar o imenso benefício que traria ao seu rebanho em produtividade, bem-estar, qualidade leiteira, lucros e até mesmo na reprodução desses animais.

A mastite subclínica é um dos grandes problemas nos rebanhos leiteiros por ser uma doença silenciosa, contagiosa, que afeta a produção e qualidade do leite e, a depender do agente etiológico envolvido, de difícil tratamento e erradicação. E essa, esteve presente em 100% dos rebanhos visitados, variando sua ocorrência de 35 a 83,33%, totalizando 310 vacas acometidas. E, apesar da mastite ter prejuízos econômicos difíceis de serem calculados, em virtude de vários fatores diretos e indiretos estarem relacionados. Estima-se uma perda de 21 a 42% da produção leiteira por vaca acometida (Bardhan, 2013; Fávelo *et al.*, 2015; Acosta *et al.*, 2016).

Para mais, Oliveira (2015), considerando apenas a perda de leite como custo para a mastite subclínica, estimou um prejuízo em torno de R\$ 166,00 a 250,00 por caso de mastite. A depender do agente etiológico envolvido, uma vez que os diversos microrganismos capazes de causar mastite podem levar a uma menor ou importante diminuição na produção leiteira. O que, levaria a refletir sobre prejuízos econômicos em torno de R\$ 51.460,00 a 77.500,00, considerando as 310 vacas diagnosticadas com mastite subclínica neste trabalho. Ressaltando, que essa estimativa foi feita em 2015 e que para agora, estes valores devem ser ainda maiores.

Pensando na realidade deles, são percas significantes pois a grande maioria são pequenos e médios produtores, pertencentes à agricultura familiar, com baixa ou nenhuma tecnificação empregada, sendo a atividade leiteira a principal fonte de renda para a família. E, aproveitando o relato deles, o descarte de leite ou até mesmo da vaca para o grande produtor tem um impacto financeiro menor do que para aquele pequeno produtor, que tem de 15 a 20 vacas, estando ele mesmo na lida diária e tendo que tirar todo o sustento da propriedade, de sua família e até mesmo da família de seus familiares que ali trabalham.

Desta forma, é necessário que os produtores tenham um conhecimento sobre o impacto econômico dos custos com a mastite, pois mesmo sendo reconhecida como doença que causa os maiores prejuízos na produção de leite, os produtores normalmente subestimam essas perdas (Oliveira, 2015; Zigo *et al.*, 2021).

A produção de leite é uma alternativa econômica para muitos produtores rurais, por ter venda diária, sendo uma importante fonte de renda, especialmente aos agricultores familiares. Provavelmente, por isso, a bovinocultura leiteira esteja presente na pecuária de todos os municípios maranhenses, tendo expressiva

conotação social (IMESC, 2023). Entretanto, a atividade encontra grandes desafios, entre eles a necessidade de formação e qualificação dos produtores leiteiros, adequação dos serviços de assistência técnica, melhoria na qualidade do leite, maior eficiência dos sistemas de comercialização (Rauta *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2022).

Apesar da produção leiteira do estado do Maranhão estar crescendo ao longo dos anos, esse aumento tem maior relação com o crescimento do rebanho, do que com o incremento da produtividade. E, para este aumento na produtividade é imprescindível que melhorias sejam empregadas no manejo nutricional, na sanidade e bem-estar animal, na reprodução, em tecnologias, na gestão zootécnica e financeira (Bezerra *et al.*, 2017; Kruger *et al.*, 2017; Barcellos *et al.*, 2019).

Desta forma, políticas públicas e privadas de fomento à produção pecuária devem evidenciar a questão sanitária, que, na maioria das vezes, restringe-se aos programas sanitários oficiais. Acreditando que a qualidade da informação e da assistência técnica ao produtor sejam fatores primordiais para a superação de paradigmas relacionados à forma de produzir. E, além de promoverem desenvolvimento na produção e renda, ainda alcançam as exigências do programa de controle para melhorias da qualidade do leite ofertado, conforme recomendações da Instrução Normativa n. 77, de 26 outubro de 2018 do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), melhorando o rendimento industrial do produto e minimizando os riscos à população consumidora.

A estrutura estatal e privada do estado devem estar melhor preparadas para dar suporte e promover o crescimento dos pequenos pecuaristas, uma vez que são responsáveis por 62% da produção e ocupam 78,34% dos estabelecimentos leiteiros do estado. Observa-se que existem muitos programas assistenciais no estado, como: Programa Nacional de Crédito Fundiário, Assistência Técnica e Extensão Rural, Programa Mais Produção, Programa de Aquisição de Alimento (PAA Leite), Agrotecnologia no Maranhão (AGRITEC), entre outros. No entanto, talvez eles não consigam atender a grande demanda da agropecuária do estado (Silva *et al.*, 2023).

Silva *et al.* (2023) apontam que o Maranhão necessita de políticas com maior planejamento para atuar de forma mais efetiva e alcançar melhores resultados também a longo prazo. Desta forma, é importante que haja maiores investimentos em pesquisas e assistência técnica de forma a conseguir impactar positivamente nas estratégias de controle e prevenção das enfermidades, assim como nas condições higiênicas, sanitárias e de manejo do rebanho.

Trabalhos mostram baixo nível de adoção de boas práticas de manejo higiênico e sanitário na ordenha (Bento Júnior *et al.*, 2006; Lacerda; Mota; Sena, 2010; Costa *et al.*, 2012). Demonstrando a necessidade de formação e qualificação dos pequenos produtores, adequação dos serviços de assistência técnica, melhora da qualidade do leite, aumento da eficiência do sistema de comercialização e fatores de produção. Fatores estes, essenciais para garantir o crescimento da produção e produtividade e explorar melhor o potencial para desenvolvimento da bovinocultura de leite no estado (Ribeiro *et al.*, 2022).

Para tal, é imprescindível conhecer a realidade dos produtores, do *status* de saúde da glândula mamária das vacas e de se promover assistência e educação sanitária continuada. Buscando estratégias educativas e a participação ativa dos sujeitos envolvidos para alcançar as melhorias esperadas naquela comunidade, sendo atividade primordial no ramo da saúde pública. Desta forma, a metodologia dialogada utilizada nas atividades foi configurada em uma relação baseada no conhecimento técnico-científico e a sabedoria popular, caracterizado pela livre participação dos agentes.

Nos diálogos estabelecidos durante as ações, foi possível notar que em alguns momentos eles reconheciam que a deficiência no manejo ou nos protocolos de tratamento empregados causavam prejuízos, especialmente quando verificavam o caso de mastite clínica ou perda do teto. E, alguns relatavam ter consciência que precisaria mudar a rotina. O trabalho de educação sanitária deve ser continuado pois a transformação leva tempo para conscientização e mudança de hábitos.

Especialmente, conhecendo a realidade desses produtores que tanto precisam transformar suas atitudes e melhorar a produtividade e qualidade do leite, bem como sua renda. Suplica-se que parcerias público-privadas sejam firmadas a fim de contribuir para o desenvolvimento da bacia leiteira do estado do Maranhão.

7.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Consolidar a assistência técnica, a tecnificação e as políticas públicas no setor leiteiro de forma a melhorar o desempenho produtivo e econômico da atividade é essencial para que consigam ser mais competitivos no mercado e estimulados a continuar na atividade leiteira. Ainda, e não menos importante, melhorar a qualidade do produto, com vacas saudáveis, menor ocorrência de casos de mastite, obtenção

higiênica do leite o que fortalece a saúde única e o desenvolvimento de toda a cadeia leiteira.

Ainda, as agroindústrias poderiam acompanhar, com ações mais efetivas, as diretrizes do Plano de Qualificação de Fornecedores de Leite (PQFL), instruído pela IN 77 do MAPA, que tem como objetivo assegurar a qualidade e segurança do leite desde a produção até a agroindústria. Também, começar a planejar a bonificação por qualidade do produto, sendo esta um estímulo para os produtores se adequarem ao mercado, cada vez mais competitivo.

Relevante também, que mais pesquisas e projetos de extensão sejam desenvolvidos na região, que é tão carente de assistência e informação. Acreditando na força transformadora da educação sanitária no processo de desenvolvimento social, cultural e econômico da sociedade.

REFERÊNCIAS

- ABREU, C.; OLIVEIRA, A. L. A.; ROBOREDO, D. A. Agricultura familiar no estado de Mato Grosso: um olhar a partir do Censo Agropecuário 2017. **Revista Ciência Agroambiental**. v.19, 2021.
- ACOSTA, A. C. *et al.* Mastite em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 36, 2016.
- BARCELLOS, R. R.; JAMAS, L. T.; MENOZZI, B. D.; LNGONI, H. Agricultura familiar e sanidade animal. **Veterinária e Zootecnia**. v. 26, 2019.
- BARDHAN, D. Estimates of economic losses due to clinical mastitis in organized dairy farm. **Indian Journal of Dairy Science**. v. 66, 2013.
- BENTO JUNIOR, F. A. *et al.* Caracterização da bovinocultura de leite no assentamento Itacira I, Município de Imperatriz - Maranhão. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 2006, Pernambuco. **Anais...** Pernambuco: ZOOTEC, 2006.
- BEZERRA, A. S. *et al.* Comportamento da produção e dos preços de leite bovino no estado do Maranhão. **Nucleus Animalium**. v. 9, 2017.
- BRITO, M.; BERALDO, K. A.; SOUSA, D. N. S. Estrutura produtiva da agricultura familiar no Maranhão: comparação entre os censos agropecuários de 2006 e 2017. **Reserch Society and Development**. v. 9, 2020.
- CANGUSSU, M. A.; ROCHA, T. C.; VIANA, D. C. Livestock reconversion: a possible trajectory for the sustainability of cattle production in Maranhão, Brasil. **Revista Eletrônica Científica Ensino Interdisciplinar**. v. 6, 2020.
- COSTA, G. C. *et al.* Perfil das granjas leiteiras do município de Caxias – MA. **Pubvet**. v. 6, 2012.
- DANTAS, V. V. *et al.* Nível tecnológico da pecuária leiteira no estado do Maranhão, Brasil. **Nucleus Animalium**. v. 10, 2018.
- FÁVERO, S. *et al.* Factors associated with mastites epidemiologic indexes, animal hygiene, and bulk milk bacterial concentrations in dairy herds housed on compost bedding. **Livestock Science**. v. 181, p. 220-230, 2015.
- FUNDEPEC. **Bovinocultura de leite**. FUNDEPEC, 2018. Disponível em: <https://fundepcma.org.br/bovinocultura-de-leite/>. Acesso em: 24 de junho de 2024.
- IBGE. **Pesquisa Pecuária Municipal**. MARANHÃO: IBGE, 2022. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ma/pesquisa/18/16459>. Acesso em: 24 junho 2024.
- IMESC. **IMESC Divulga diagnóstico da atividade leiteira maranhense**. IMESC, 2023. Disponível em: <https://www.ma.gov.br/noticias/imesc-divulga-diagnostico-da-atividade-leiteira-maranhense#:~:text=No%20Maranh%C3%A3o%2C%20a%20atividade%20est%C3>

%A1,produ%C3%A7%C3%A3o%20e%20aumento%20da%20produtividade. Acesso em: 24 de junho de 2024.

IBGE. **Pesquisa da Pecuária Municipal**, 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9209-pesquisa-trimestral-do-leite.html?=&t=downloads>. Acesso em: 24 de junho de 2022.

KRUGER, S. D. *et al.* Análise comparativa da viabilidade econômica e financeira das atividades avícola e leiteira. **Revista Ambiente Contábil**. v. 9, 2017.

LACERDA, L. M.; MOTA, R. A.; SENA, M. J. Contagem de células somáticas, composição e contagem bacteriana total do leite de propriedades leiteiras nos municípios de Miranda Do Norte, Itapecurú – Mirim e Santa Rita, Maranhão. **Arquivo do Instituto Biologia**. v. 77, 2010.

LANGONI, H. *et al.* Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 17, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. Instrução Normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/plano-de-qualificacao-de-fornecedores-de-leite/arquivos-do-pqfl/IN772018QualificodefornecedoresdeleiteatualizadapelaIN5919.pdf>. Acesso em 24 de junho de 2024.

OLIVEIRA, C. S. F. (2015). **Análise epidemiológica e bioeconômica da mastite bovina em rebanhos brasileiros**. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2015. p. 82.

RAUTA, J.; PAETZOLD, L. J.; WINCK, C. A. Rastreabilidade na cadeia produtiva do leite como vantagem competitiva. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**. v. 10, 2017.

RIBEIRO, E. C. B. *et al.* Sistema agroindustrial do leite no Maranhão: uma análise prototípica. **Revista Economia e Sociologia Rural**. v. 60, 2022.

RUEGG, P. L. A 100-year review: mastites detection, managemet, and prevention. **Journal of Dairy Science**. v. 100, n. 12, p. 10381-10397, 2017.

SENAR. **Perspectivas do leite no Maranhão**. SENAR MARANHÃO, 2016. <https://senar-ma.org.br/perspectivas-do-leite-no-maranhao/>. Acesso em: 24 de junho de 2024.

SILVA, C. M. *et al.* Caracterização da produção pecuária da agricultura familiar maranhense. In: GALATTI, Rosemary Lais; ARANTES, Vânia Maria; CLEEF, Eric Haydt Castello Branco Van (Org.). **Manejo, nutrição e produção animal: tópicos atuais em pesquisa**. 1 ed. Guarujá – SP: Científica Digital. p. 11 – 25, 2023.

SILVA, C. M.; MAJO, C. The Making of a Pastureland Biome: American Scientists, Miracle Grasses and the Transformation of the Brazilian Cerrado. **Environment and History**. v. 29, 2020.

ZIGO, F. *et al.* Maintaining optimal mammary gland health and prevention of mastitis. **Frontiers Veterinary Science**. v. 8, 2021.

CAPÍTULO VIII. CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos dados coletados pode-se caracterizar a produção leiteira com baixa a média infraestrutura e tecnologia e deficiente manejo higiênico, nutricional e sanitário nos municípios pesquisados. E que, apesar de muitos receberem assistência técnica de órgãos governamentais, esta não foi suficiente para incrementar o *status* de saúde e produtividade do rebanho. Demonstrando que, necessitam de uma assistência mais direcionada aos seus problemas, que antes, nem eram conhecidos, uma vez que a grande maioria não realizou o diagnóstico da doença mais importante na atividade leiteira.

Os avanços nos níveis de produtividade são dependentes da saúde do úbere, bem-estar da vaca, manejo nutricional, reprodutivo, higiênico da ordenha e do ambiente e tecnologias empregadas. Assim, a atividade deve ser pensada como um todo, como apresentado, o investimento em ordenhadeira mecânica, sem os investimentos em rotina higiênica da ordenha e do ambiente, medidas de controle e prevenção em geral, manejo nutricional, não foram suficientes para aumentar a produtividade e sanidade das vacas.

A cadeia leiteira do Maranhão necessita de planejamento e investimentos, uma vez que a região tem grande potencial produtivo. Espera-se que as políticas públicas alcancem os produtores, desde os pequenos até os grandes, que a assistência técnica seja melhor trabalhada, que haja desenvolvimento de pesquisas e ações extensionistas a fim de, incluir e conscientizar os trabalhadores do seu papel no desenvolvimento da atividade leiteira e na geração da sua renda.

O Maranhão tem um baixo Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) e a bovinocultura de leite representa uma importante fonte de renda e de geração de emprego e tributos no estado. Desta forma, deve-se considerar que recursos sejam destinados à cadeia leiteira e esta, conseqüentemente, irá melhorar a produção e renda das famílias, especialmente dos agricultores familiares, que correspondem a cerca de 78% dos estabelecimentos produtores de leite do estado e que envolvem maior número de familiares dependentes dessa renda.

Além disso, a educação sanitária sobre mastite de forma continuada é crucial para o desenvolvimento da bovinocultura de leite, pois os produtores precisam perceber e se sensibilizar com sua realidade, a ponto de mudar suas atitudes e diminuir a ocorrência da doença no rebanho e aumentar a quantidade e qualidade do

leite produzido, beneficiando toda a cadeia, desde o produtor, a indústria e não menos importante, os consumidores.

Outrossim, as indústrias de laticínios devem implementar o Plano de Qualificação de Fornecedores de Leite (PQLF), instituído pela Instrução Normativa n. 77 de 2018 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que visa implementar boas práticas agropecuárias, gestão da propriedade. Beneficiando, não apenas o produtor, mas também a si mesmo, por receber produto de maior qualidade e assim, melhorar a produtividade e rendimento de seus processos e produtos e serem mais competitivos nacionalmente.

A mastite bovina ocorre numa prevalência alta nos municípios amostrados, em virtude, principalmente, do baixo manejo sanitário, higiênico e nutricional empregado. Aliado a isso, o microrganismo mais incriminado nos casos de mastite são os estafilococos que tem características etiológicas que dificultam sua eliminação, sendo um problema adicional no controle da doença. Por isso, um bom planejamento dos protocolos de tratamento, manejo nutricional que melhore o escore corporal e a resposta imunológica da vaca, rotina de ordenha higiênica, de diagnóstico e de gestão e acompanhamento contínuo dos resultados são essenciais para diminuir esses índices.

O perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados foi relativamente eficiente, entretanto, acredita ser devido a uma menor rotina no uso de antimicrobianos. E como a prevalência da mastite, especialmente a subclínica, é alta, o emprego de protocolo de tratamento adequado das vacas, seria um custo adicional significativo, e que pode ser que o produtor não esteja disponível para empregar, o que aumenta o risco de transmissão entre as vacas e não contribui para a redução dos casos.

Foi identificado também que cepas circulantes causadoras de mastite tem genes de virulência e de resistência que podem agravar as infecções nos animais e nos humanos e mostram a importância de se monitorar esse perfil, contribuindo, especialmente com a saúde única.

Este trabalho é pioneiro na região e tem grande importância na construção do desenvolvimento da cadeia leiteira do estado. Podendo-se, a partir dele, conhecer e estimar a realidade da bovinocultura de leite na região e assim, programar ações direcionadas à realidade dos produtores da região. Imprescindível também, estreitar parcerias entre órgãos de assistência técnica e de pesquisa e extensão, a fim de, juntos contribuir com o aumento da produtividade e segurança alimentar.

APÊNDICES

Apêndice A – Questionário



Universidade Estadual da Região Tocantina – UEMASUL
Projeto de Pesquisa
Diagnóstico de Mastite na Bacia Leiteira Maranhense

CÓDIGO LABORATÓRIO: _____

→ Dados do produtor

- Proprietário: _____ Fazenda: _____
 Município: _____ Área da propriedade: _____
- 1- Agricultura familiar: () Sim () Não
 - 2- Quantos trabalhadores: _____ Quantos são membros da família: _____
 - 3- Tem outra fonte de renda: () Sim () Não
 - 4- Renda média
 () Até 1,5 salário mínimo () De 2 a 3 salário mínimo
 () 4 a 5 salário mínimo () 6 ou mais salário mínimo
 - 5- Nível de escolaridade
 () Sem escolaridade
 () Ensino Fundamental Menor
 () Ensino Fundamental Maior
 () Ensino Médio
 () Ensino Superior
 - 6- Participa de entidade classista?
 () Cooperativa () Associação () Sindicato () Nenhuma
 - 7- Produção leiteira é atividade: () Primária () Secundária
 - 8- Faz gestão financeira da propriedade: () Sim () Não () Parcialmente
 - 9- Faz gestão sanitária do rebanho: () Sim () Não () Parcialmente

→ Dados da propriedade / Infraestrutura

- 10- Qual o tipo de ordenha: () Manual () Mecânica
- 11- Local da ordenha: () Curral () Galpão () Outro: _____
- 12- Tipo de piso: () Cimentado () Chão batido () Outros: _____
- 13- Instalação do local de ordenha: () Alvenaria () Madeira () Cerâmica
 () Reboco () Outro: _____
- 14- Qual a frequência de limpeza do ambiente onde é realizado a ordenha?
 () Não realiza () Raramente () Diariamente () Semanalmente
 () Quinzenalmente () Mensalmente
- 15- Realiza a limpeza dos utensílios de ordenha: () Sim () Não
- 16- Se sim, qual a frequência da limpeza:
 () Após cada ordenha () 1 vez ao dia () 2 a 3 vezes por semana
 () Semanalmente
- 17- Qual a forma de armazenamento do leite: () Latão () Tanque de refrigeração
- 18- Qual o destino do leite: () Produção própria de subprodutos () Venda direta leite cru
 () Laticínios () Associação
- 19- Forma de armazenamento do leite até seu destino: () Refrigeração () Temperatura ambiente
- 20- A propriedade tem acompanhamento de Médico Veterinário: () Sim () Não
- 21- Se sim, qual a frequência do acompanhamento pelo Médico Veterinário?
 () Raramente () Quinzenal () Mensal () Semestral () Anual

→ **Dados das vacas**

- 22- Número total vacas: _____ Quantidade vacas em lactação: _____
 23- Média produção diária leite: _____
 24- Frequência de ordenha: () 1X/dia () 2X/dia () 3X ou mais
 25- Período de lactação: () 7 a 8 meses () 9 a 10 meses () acima de 11 meses

→ **Dados gerais mastite**

- 26- Sabe o que é Mastite: () Sim () Não () Pouco
 27- Já teve prejuízos na produção leiteira, devido a mastite: () Sim () Não
 28- A propriedade tem histórico de mastite: () Sim () Não () Não sei informar
 29- Realiza diagnóstico de mastite: () Sim () Não
 30- Se sim, qual teste: () CMT () Caneca de fundo preto () Outro: _____
 31- Frequência do teste caneca: () Diariamente () Semanalmente () Quinzenalmente
 () Mensalmente () Raramente
 32- Frequência do teste CMT: () Quinzenalmente () Mensalmente () Semestralmente
 () Raramente
 33- Se não, por qual motivo não realiza diagnóstico?
 () Custos () Não tenho conhecimento acerca da doença
 () Não sei realizar o teste () Outros: _____

→ **Dados manejo sanitário na sala de ordenha**

- 34- A ordenha é realizada com o bezerro ao pé? () Sim () Não
 35- Aplica fármaco antes da ordenha? () Sim, Qual: _____ () Não
 36- Realiza lavagem dos Tetos: () Sim () Não () Apenas quando muito sujo
 Ubers: () Sim () Não () Apenas quando muito sujo
 37- Os tetos e/ou úberes são secados com qual material?
 () Papel toalha () Pano individual () Pano coletivo () Não é realizado
 38- Realiza pré-dipping: () Sim () Não Produto: _____
 39- Realiza linha de ordenha: () Sim () Não
 40- Qual ordem na linha de ordenha?
 () As primíparas sem mastite () As multiparas sem mastite () Vacas curadas da mastite
 () Vacas com mastite subclínica () Vacas com mastite clínica () Não existe ordem
 41- Realiza pós-dipping: () Sim () Não Produto: _____
 42- É oferecido alimento após a ordenha? () Sim () Não
 43- Se sim, qual alimento: () Volumoso () Concentrado () Pasto () Ração

→ **Questionário para vacas com Mastite - Clínica e/ou Subclínica**

- 1- Qual o nome do animal _____ Raça _____
 2- Qual o número de crias? _____ Qual a idade do animal? _____
 3- Qual o estágio de lactação? () Início/terço inicial () Meio/terço médio () Final/terço final
 4- Histórico de mastite em lactações anteriores: () Sim () Não
 5- Se sim, qual tipo: () Clínica () Subclínica Quantas vezes: () 1 a 2 () 3 ou mais
 6- Já teve outros casos na lactação corrente: () Sim () Não
 7- Qual o tipo de mastite diagnosticada: () Clínica () Subclínica
 8- Quanto(s) teto(s) estão acometido(s): () 1 () 2 () 3 () 4
 9- Os úberes das vacas apresentam algum tipo de alteração?
 10- () Calor () Vermelhidão () Dor a palpação () Sinais de inflamação () Não
 11- Qual o grau de severidade da doença: () Leve () Moderada () Severa
 12- Se subclínica, resultado CMT: A (AE): _____ B (PE): _____ C (AD): _____ D (PD): _____

Apêndice B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

O(A) Senhor(a) está sendo convidado(a) a participar como voluntário do estudo intitulado "Diagnóstico da mastite na bacia leiteira Maranhense", que será realizada nos municípios de Açailândia, Imperatriz e São Francisco do Brejão, cujo pesquisador responsável é a Sra Monalisa de Sousa Moura Souto, médica veterinária e professora assistente do curso de Medicina Veterinária da UEMASUL.

O estudo se destina a promover qualidade e melhorias na produção de leite de produtores da região Tocantina do Maranhão de forma a conhecer as condições de manejo higiênico, sanitário, alimentar e ambiental dos rebanhos, determinar a ocorrência da mastite, identificar os agentes etiológicos da doença, correlacionar manejo e produção leiteira, indicar medidas de tratamento, controle e prevenção da mastite por meio de palestras e promover oficinas/minicursos aos produtores/tratadores de animais para aperfeiçoamento especialmente no diagnóstico da mastite. A importância deste estudo está especialmente na promoção de conhecimento técnico aos produtores para que consigam ter maior participação econômica na produção leiteira do estado tanto em quantidade como em qualidade, menor riscos à população e conhecimento da mastite na bacia leiteira da região.

Deseja-se com esta pesquisa conhecer a prevalência da mastite na região, identificar agentes etiológicos da mastite e assim planejar mais eficientemente medidas de controle, prevenção e tratamento adequado. Para tal, é imprescindível que o participante contribua, de forma voluntária, permitindo o diagnóstico da mastite nas vacas selecionadas e coleta de leite dos tetos acometidos e participe respondendo ao questionário, desde de que se sinta à vontade.

Os riscos ao participante da pesquisa serão de nível intelectual, psicológico e moral mínimo, por haver possibilidade de quebra de sigilo e/ou anonimato dos dados, constrangimento, desconforto, medo, cansaço, vergonha ao responder o questionário. Para mitigar esses riscos, será garantido o sigilo e anonimato das informações prestadas, onde serão utilizados codificação dos dados, que serão armazenados em notebook único e com senha de acesso, os documentos físicos serão guardados em pasta dentro de armários trancados de uso restrito, o participante ficará à vontade caso não tenha interesse em responder a qualquer pergunta. Em relação as análises de leite, as amostras também serão codificadas e os resultados mantidos em sigilo para evitar qualquer prejuízo financeiro ou comercial de seu produto. Todas as informações coletadas, seja referente ao questionário ou ao processamento das amostras, serão confidenciais e utilizadas apenas para fins científicos como publicação de artigos, resumos em congressos, relatórios e escrita de tese. O participante poderá desistir a qualquer momento de continuar participando do estudo, retirando seu consentimento sem nenhum prejuízo ou penalidade.

O participante terá como benefício o diagnóstico de mastite do seu rebanho leiteiro, bem como palestras e oficinas voltadas para medidas de diagnóstico, tratamento, controle e prevenção da mastite

afim de melhorar a produção e bem estar de seus animais, conseguindo através do diagnóstico e identificação de agente causador da mastite realizado pela pesquisa e ainda pelas palestras e oficinas realizadas após o diagnóstico inicial do rebanho.

O Sr(a) terá posse de uma via deste termo de consentimento e em qualquer etapa do estudo terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O entrevistado não terá nenhum tipo de despesa ao autorizar sua participação nesta pesquisa, bem como nada será pago pela participação.

Finalmente, tendo o(a) participante compreendido perfeitamente tudo o lhe foi informado sobre a sua participação no mencionado estudo e, estando consciente dos seus direitos, das suas responsabilidades, dos riscos e dos seus benefícios que a sua participação implica, o(a) mesmo(a) concorda em dela participar e, para tanto DÁ O SEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO O(A) MESMO TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Pesquisadora Responsável: Profa. Monalisa de Sousa Moura Souto, telefone: (99) 98459 1518, e-mail: monalisasouto@uemasul.edu.br.

Instituição: Universidade Estadual da região Tocantina do Maranhão – UEMASUL,
Endereço: Av. Agrária, 100, Colina Park, Centro de Ciências Agrárias, Imperatriz-MA.

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas, dirija-se ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), pertencente ao Centro de Estudos Superiores de Caxias. Rua Quininha Pires, n° 746, Centro. Anexo Saúde. Caxias-MA. Telefone: (99) 3521-3938.

Local e data: _____

Assinatura ou impressão datiloscópia do(a) Participante da Pesquisa

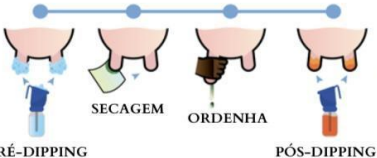
Monalisa de Sousa Moura Souto
Pesquisadora Responsável
CPF: 012.867.671-05
CRMV-MA 02141

Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos
Pesquisador Participante
CPF: 050.198.773-87

Apêndice C – Folder

ROTINA DE ORDENHA

- Entrada das vacas de forma tranquila e sem agressões;
- Higiene e lavagem das mãos do ordenhador e/ou ordenhadeira;
- Lavar os tetos apenas quando sujos com matéria orgânica;
- Realizar teste da caneca fundo escuro/telada diariamente;
- Desinfecção dos tetos antes da ordenha (pré-dipping) – deixar agir por 30 segundos;
- Secagem dos tetos individualmente com papel toalha;
- Ordenha adequada: linha de ordenha, uso adequado da ordenhadeira;
- Desinfecção dos tetos após a ordenha (pós-dipping);
- Fornecer alimento para vaca.



CONTROLE DA MASTITE

- Conhecer a produtividade da vaca;
- Diagnóstico da mastite clínica e subclínica;
- Manejo nutricional da vaca – imunidade;
- Manejo higiênico da ordenha, equipamentos e ambiente;
- Identificar microrganismos causadores da mastite no rebanho;
- Manejo de tratamento;
- Treinamento periódico dos trabalhadores.

TRATAMENTO

- Tratamento durante a lactação: tratar os casos clínicos da mastite;
- Tratamento da vaca seca: casos de mastite subclínica na lactação;
- Terapia com selante: barreira física, indicada para todas as vacas após término da lactação.



MASTITE EM VACAS LEITEIRAS

A mastite bovina é uma das principais doenças que acometem vacas leiteiras sendo uma infecção complexa e multifatorial. Causando grandes prejuízos econômicos em toda atividade leiteira, como: queda da produção ou descarte do leite, gastos com tratamentos, redução da qualidade dos produtos lácteos, descarte precoce da vaca, problemas reprodutivos.

AGRADECIMENTOS



MASTITE CLÍNICA

Caracterizada por alterações visíveis no leite, como presença de grumos ou coágulos, pus, sangue ou aquosidade. Podendo ainda estar associados a sinais de inflamação do úbere, se apresentando inchado, vermelho, endurecido, dolorido e/ou febril. E ainda, em casos sistêmicos da doença, a vaca pode até mesmo morrer.

DIAGNÓSTICO DE MASTITE CLÍNICA

Teste da caneca de fundo preto ou telada, onde se coleta os primeiros jatos de leite para detectar as alterações visíveis do leite como presença de grumos, pus, sangue ou aquosidade.

PRESENÇA DE GRUMOS E SANGUE

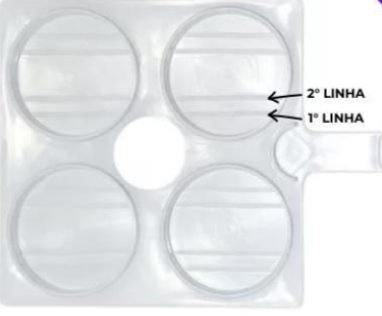


MASTITE SUBCLÍNICA

De caráter silencioso, não havendo alterações visíveis no leite e nem no úbere. Porém, há alterações na composição do leite e redução na produtividade da vaca. E ainda, alguns casos podem evoluir para sua forma clínica.

DIAGNÓSTICO DE MASTITE SUBCLÍNICA

O teste mais utilizado à campo é o CMT, realizado mensalmente antes da ordenha. Deve-se coletar em cada quadrante da raquete aproximadamente 2mL de leite de cada teto (1ª linha) e adicionar 2mL do CMT (2ª linha), agitar vagarosamente a raquete em movimentos circulares para misturar o leite e o reagente e realizar a leitura em seguida. Resultado: aspecto mais líquido da mistura: resultado negativo; e aspecto gelatinoso: resultado positivo.



← 2ª LINHA
← 1ª LINHA

RESULTADO POSITIVO **RESULTADO NEGATIVO**



ANEXOS

Anexo A – Declaração de Publicação de Capítulo de Livro



DECLARAÇÃO DE PUBLICAÇÃO

A Atena Editora, especializada na publicação de livros, revistas internacionais e coletâneas de artigos científicos em todas as áreas do conhecimento, com sede na cidade de Ponta Grossa-PR, declara que após avaliação cega pelos pares, membros do nosso Conselho Editorial, o artigo intitulado "DIAGNÓSTICO DA MASTITE BOVINA EM VACAS LEITEIRAS DO MUNICÍPIO DE IMPERATRIZ, MARANHÃO", de autoria de "Stefane Santos Bezerra, Monalisa de Sousa Moura Souto, Hamilton Pereira Santos", foi aprovado e publicado no livro eletrônico "Agricultural sciences unveiled: exploring the dynamics of farming and sustainability 2", sob ISBN e DOI <https://doi.org/10.22533/at.ed.44824080712>.

Agradeço a escolha pela Atena Editora como meio de transmitir ao público científico e acadêmico o trabalho e parabenizo os autores pela publicação.

Reitero protestos de mais elevada estima e consideração.

Ponta Grossa, 09 de julho de 2024

Prof.ª Antonella Carvalho de Oliveira
Doutora em ensino de ciência e tecnologia
Editora Chefe
ATENA EDITORA
PREFIXO EDITORIAL ISBN 97865
PREFIXO EDITORIAL DOI 10.22533

Rua Antônio Rodrigues Teixeira Júnior, 122
Ponta Grossa – PR
CEP: 84.015-490
contato@atenaeditora.com.br
www.atenaeditora.com.br

285d66e5-8250-4f15-9940-cf2ddf67eeb9

Verifique a declaração em: <https://atenaeditora.com.br/verificar-declaracao/>

Anexo B – Aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



Universidade Estadual
da Região Tocantina
do Maranhão

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Identificação de agentes etiológicos causadores da mastite bovina em propriedades leiteiras da região Tocantina do Maranhão", protocolada sob o CEUA nº 2112220422 (00 000000), sob a responsabilidade de **Monalisa de Sousa Moura Souto** e equipe; Aline dos Santos Guarim - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilum 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 Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão (CEUA/UEMASUL) na reunião de 06/05/2023.

We certify that the proposal "Identification of etiological agents causing bovine mastitis in dairy farms in the Tocantina region of Maranhão", utilizing 300 Bovines (300 females), protocol number CEUA 2112220422 (00 000000), under the responsibility of **Monalisa de Sousa Moura Souto** and team; Aline dos Santos Guarim - 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 State University of the Tocantina Region of Maranhão (CEUA/UEMASUL) in the meeting of 05/06/2023.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **05/2022** a **08/2023**

Área: **Medicina Veterinária**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

Idade: **2 a 10 anos**

N: **300**

Linhagem: **Mestiço/Holandes**

Peso: **400 a 550 kg**

Local do experimento: O diagnóstico e coleta de leite será realizado nas próprias fazendas selecionadas para estudo.

Imperatriz, 08 de maio de 2023

Prof. Dr. Marcelo Francisco da Silva
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão

Profa. Dra. Milena Lopes de Oliveira
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão