

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFICÁCIA DE VACINA COMERCIAL E PRODUTO TESTE NO
CONTROLE DE MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA**

Daniela Junqueira de Queiroz

Médica Veterinária

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFICÁCIA DE VACINA COMERCIAL E PRODUTO TESTE NO
CONTROLE DE MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA**

Daniela Junqueira de Queiroz

Orientador: Prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutor em Medicina
Veterinária, área de Clínica Médica
Veterinária**

2017

Queiroz, Daniela Junqueira
Q3e Eficácia de vacina comercial e produto teste no controle de mastite subclínica bovina / Daniela Junqueira de Queiroz. – – Jaboticabal, 2017
xi, 23 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientador: José Corrêa de Lacerda Neto

Banca examinadora: Daniela Gomes da Silva, Thaís Gomes Rocha, Ketherson Rodrigues Silva, Luciano Menezes Ferreira

Bibliografia

1. Contagem de células somáticas. 2. Exame microbiológico. 3. IgG. 4. Mastite subclínica I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-071:636.2

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EFICÁCIA DE VACINA COMERCIAL E PRODUTO TESTE NO CONTROLE DE MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA

AUTORA: DANIELA JUNQUEIRA DE QUEIROZ
ORIENTADOR: JOSÉ CORRÊA DE LACERDA NETO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. JOSÉ CORRÊA DE LACERDA NETO
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. KETHERSON RODRIGUES SILVA
Departamento de Medicina Veterinária / Centro Universitário Barão de Mauá - Ribeirão Preto/SP



Profa. Dra. THAIS GOMES ROCHA
Departamento de Clínica Veterinária / FMVZ/UNESP - Botucatu



Prof. Dr. LUCIANO MENEZES FERREIRA
Câmpus Veterinário / Centro Universitário Barão de Mauá / Ribeirão Preto/SP



Pós-doutoranda DANIELA GOMES DA SILVA
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 04 de dezembro de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Daniela Junqueira de Queiroz – Nascida em São Paulo, SP, no dia 08 de fevereiro de 1985, filha de Marco Antônio de Queiroz e Paula Junqueira de Queiroz. Em janeiro de 2010 graduou-se Médica Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP – Jaboticabal). Em fevereiro de 2012 concluiu o Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária e Saúde Pública, na área de Clínica Médica de Grandes Animais, junto ao Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, pertencente à mesma instituição, e em fevereiro de 2014 obteve o título de Mestre em Medicina Veterinária também na mesma instituição. Foi bolsista da FUNDAP durante o Programa de Aprimoramento e da CAPES durante o mestrado. Atua, desde 2013, como docente do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário “Barão de Mauá” ministrando atualmente as disciplinas de Técnica Cirúrgica e Anestesiologia, Semiologia e Laboratório Clínico, Clínica Cirúrgica de Grandes Animais e Clínica Médica e Terapêutica de Grandes Animais. Possui experiência na área de Clínica Médica de Equinos e Ruminantes. Atualmente é aluna regular do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de Clínica Médica Veterinária, da FCAV/UNESP – Jaboticabal.

“Feliz aquele que transfere o que sabe
e aprende o que ensina”.

Cora Coralina

DEDICATÓRIA

Dedico à minha família, em especial à minha mãe Paula e ao meu pai Marco Antônio por todo amor, carinho e apoio incondicionais.

Aos meus cachorros Tobias (*in memorian*) e Baltazar (*in memorian*), por toda a alegria que me proporcionaram, e Jeremias e Monalisa, por me fazer ter vontade de voltar para casa todos os dias.

Aos queridos amigos que conquistei nesses doze anos em Jaboticabal. Não citarei o nome de cada um de vocês mas tenho certeza que ao lerem esse texto saberão que me refiro a vocês.

A todos os professores do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária e a todos os funcionários do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, essenciais na minha caminhada rumo ao sonho de ser doutora.

À toda equipe do Centro Universitário Barão de Mauá, em especial aos professores com os quais trabalho diariamente e que se tornaram mais do que colegas de trabalho mas verdadeiros amigos.

Aos animais sem os quais eu não teria realizado meu grande sonho de me tornar Médica Veterinária.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto, meu orientador, ao qual agradeço não só pelos ensinamentos, mas especialmente pela amizade e proveito para expressar meu carinho, admiração e respeito sinceros. Saiba que o senhor é para mim uma fonte inesgotável de inspiração!

À Mayra Gonçalves Fonseca e Deborah Penteado Martins Dias pela contribuição científica indispensável à execução deste trabalho.

Aos alunos Andreza Freitas Galatti, Fabio José Menezes dos Santos, Gabriela Bonela Dantas Leite, Isabela Pavoni, Juan Felipe Mata Jurca, Tainá Caroline Beletti Valente Silva e Thiago Correa Neves de Souza por toda a ajuda durante o experimento. Esse experimento teria sido impossível sem vocês!

Ao Laboratório Vitafort Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda., especialmente na figura dos Médicos Veterinários Inivaldo Corrêa, Maria da Graça Portantiolo Corrêa e Fernanda Pavinatto de Toro pela oportunidade de realizar esse trabalho e toda a ajuda durante a execução.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), minha segunda casa, por todas as oportunidades que vem me proporcionando ao longo dos últimos doze anos.

Ao Centro Universitário Barão de Mauá por todo o apoio no desenvolvimento desse trabalho e por me permitir fazer todos os dias uma das coisas que mais gosto: ensinar!

Conclusão.....	23
Referências.....	23



CENTRO UNIVERSITÁRIO "BARÃO DE MAUÁ"
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA E EXPERIMENTAÇÃO
ANIMAL – CEPan



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo registrado no CEPan sob o nº275/16, intitulado. "AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA VACINA MASTIPLUS BR® ADMINISTRADA EM BOVINOS DE LEITE" sob a responsabilidade do Profª. Drª. Daniela Junqueira de Queiroz, para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6899 de 15 de julho de 2009 e com as normas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA-MCTI) e foi **APROVADO** pelo Conselho do Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal-CEPan.

Ribeirão Preto, 09 de Setembro de 2016

Profª Drª Eneida P. dos S. de Aguiar
Presidente do CEPan-B.M.
Conselheira da Coordenadoria de Bem Estar
Animal- PMRP
Ex Conselheira do CONCEA- MCTI/Brasília

EFICÁCIA DE VACINA COMERCIAL E PRODUTO TESTE NO CONTROLE DE MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA

RESUMO - O manejo intensivo de bovinos predispõe a inúmeras doenças, dentre elas as que acometem o úbere, as afecções podais e os problemas de fertilidade, causando prejuízos econômicos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a prevalência de mastite subclínica e eficácia de vacina comercial e produto teste, ambos compostos por bacterina mista inativada, em bovinos de leite. Coletou-se amostras de leite, dos quatro quartos mamários, de 210 vacas em lactação para realização de contagem de células somáticas e exame microbiológico. Das 210 amostras de leite coletadas observou-se crescimento de microrganismos em 33,81% e os principais agentes etiológicos isolados foram dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Em relação à CCS esses mesmos microrganismos foram responsáveis por aumento da CCS do leite em comparação às amostras negativas no exame microbiológico. Vacina comercial e produto teste foram testados em 36 animais e não foram responsáveis por diminuir CCS. Também não se observou diferença em relação aos títulos de IgG sérica nos animais tratados quando comparado aos animais do grupo controle. Tanto a vacina comercial quanto o produto teste apresentaram uma maior porcentagem de cura (63,64% e 60%) em relação aos animais não tratados (18,18%), sendo assim a vacinação é uma alternativa no controle das mastites subclínicas.

Palavras-chave: contagem de células somáticas, exame microbiológico, IgG, mastite subclínica

EFFICACY OF COMMERCIAL VACCINE AND TEST PRODUCT IN THE CONTROL OF BOVINE SUBCLINICAL MASTITIS

ABSTRACT - The intensive management of cattle predisposes to various diseases, including mammary and foot disorders, and fertility problems, leading to economic losses. The present study aimed to evaluate the prevalence of subclinical mastitis and efficacy of commercial vaccine and test product, both composed of inactivated mixed bacterin, in dairy cows. Samples of lactating dairy cows were collected from four lactating quarters for somatic cell count and microbiological examination. From 210 milk samples, 33.81% showed growth of microorganisms, and the most prevalent were *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp., which led to a higher somatic cell count in milk. The commercial vaccine and the test product were tested in 36 cows and were not responsible for decreasing SCC and no difference was observed in IgG titers in treated animals. Both treatments had a higher percentage of cure (63.64% and 60%) than the untreated animals (18.18%), thus vaccination was an alternative for the control of subclinical mastitis.

Keywords: somatic cell count, microbiological examination, IgG, subclinical mastitis

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. Introdução

O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo, ficando atrás da Índia, e encontra-se em segundo lugar no número de animais abatidos, segundo o Depec (2017). Apesar da maior parte dos animais serem criados exclusivamente a pasto, o manejo vem se tornando cada vez mais intensivo, a fim de melhorar índices zootécnicos e sustentar tamanha produção. Diante disso, a saúde dos animais é indispensável para uma bovinocultura de leite competitiva e ética, porém a busca por índices zootécnicos, como ganho de peso, produção de leite e fertilidade cada vez melhores, predispõe a diversas enfermidades. Dentre as associadas aos sistemas de produção intensiva, a mastite, juntamente com as afecções podais e os problemas de fertilidade, são as principais doenças responsáveis por perdas tanto na indústria de leite quanto de carne.

Nesse contexto o tratamento e especialmente a prevenção dos quadros de mastite são essenciais para uma pecuária leiteira competitiva e rentável e, para tanto, a vacinação é uma alternativa interessante a ser utilizada como coadjuvante no tratamento e, juntamente com medidas adequadas de manejo na prevenção da doença. As vacinas podem ser autógenas, produzidas com microrganismos da própria fazenda, ou comerciais, e podem ser produzidas a partir de um ou mais agentes etiológicos.

2. Revisão de Literatura

2.1 Produção de leite no Brasil e no Estado de São Paulo

A produção de leite no Brasil em 2016 foi de aproximadamente 34 bilhões de litros, colocando o país no quinto lugar do ranking mundial de países produtores, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017). Apesar de ser um dos maiores produtores do mundo o Brasil ainda importa lácteos para suprir as necessidades do mercado interno.

Em relação à produção de leite por região, em 2014 a região Sul (34,7%) foi, pela primeira vez, a maior produtora de leite, desbancando a região Sudeste que foi, por décadas, a maior produtora. Em seguida vêm as regiões Sudeste (34,6%), Centro-Oeste (14,1%), Nordeste (11,1%) e Norte (5,5%). O Estado de Minas Gerais é o maior produtor do país, sendo responsável pela produção de 9,37 bilhões de

litros de leite (26,6% da produção nacional), seguido por Paraná e Rio Grande do Sul. O Estado de São Paulo é responsável por apenas 10,2% da produção nacional e se encontra em trajetória decrescente em relação ao tamanho do rebanho leiteiro e à produção de leite (IEA, 2015).

Apesar do número de produtores de leite estar diminuindo no Brasil e no Estado de São Paulo, não se observa diminuição da produção uma vez que a quantidade de litros entregues por produtor vem aumentando, mostrando o aumento da produtividade (IEA, 2015).

2.2 Mastite

A mastite caracteriza-se pela inflamação de um ou mais quartos mamários e pode ser classificada, de acordo com sua manifestação, em mastite clínica ou subclínica, ou, de acordo com o agente etiológico envolvido, em mastite contagiosa ou ambiental (RADOSTITS et al., 2017). É a inflamação mais frequente em animais de produção leiteira e a principal causa de prejuízos financeiros na pecuária de leite (PAUL; GANGULY, 2014; PEREIRA et al., 2014). A mastite subclínica, apesar de não apresentar sinais clínicos visíveis, é responsável por perdas econômicas mais importantes do que a mastite clínica, e essas estão relacionadas à diminuição da produção de leite e derivados, uma vez que alta CCS causa diminuição de sólidos totais do leite (HUIJPS; LAM; HOGEVEEN, 2008).

A mastite subclínica constitui sério problema na indústria leiteira mundial tanto em termos econômicos como em relação à saúde pública. Economicamente, causa perdas diretas devido à diminuição da produção tanto por quarto mamário quanto por animal, e perdas indiretas associadas à queda na eficiência reprodutiva, além de diminuir a qualidade e valor do leite entregue no laticínio (GEBREYOHANNES; REGASSA; KELAY, 2010; HUDSON et al., 2012).

2.3 Etiologia da mastite

Diversos agentes etiológicos são incriminados como causadores de mastite bovina, como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e leveduras (SZTACHANSCHA et al., 2016). Dentre as bactérias as dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Corynebacterium* são as mais prevalentes (ACOSTA et al., 2016; SOUZA et al., 2016; SZTACHANSCHA et al., 2016).

Staphylococcus se dividem em *Staphylococcus* coagulase positiva, sendo *S.*

aureus o principal representante desse grupo, e *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) que tem como principais integrantes envolvidos na etiologia da mastite as espécies *S. hyicus*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus* e *S. xylosus* (FRY et al., 2014). Os SCN sempre foram considerados menos patogênicos quando comparados com *S. aureus*, no entanto, sua importância na mastite bovina tem sido cada vez mais reconhecida (PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009).

Segundo Ramírez et al. (2014) dentro do gênero *Streptococcus*, *S. agalactiae* é um agente contagioso isolado com grande frequência em amostras de leite bovino. *S. dysgalactiae* e *S. uberis* são os agentes ambientais isolados com maior frequência no Brasil (SOUTO et al., 2010).

Os microrganismos do gênero *Corynebacterium* são patógenos contagiosos da glândula mamária responsáveis por aumentos importantes na contagem de células somáticas no leite (NACIONAL MASTITIS COUNCIL, 2004). *C. bovis* é o principal agente do gênero isolado em animais tanto com mastite clínica quanto subclínica (HEGAZI; ABDU; ALLAH, 2014).

As bactérias denominadas coliformes, as quais incluem *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. e *Enterobacter* sp., são bactérias Gram-negativas que fazem parte da família Enterobacteriaceae e são as principais responsáveis por mastites ambientais (HOGAN; SMITH, 2003; GENTILINI et al, 2013). Essas mastites causadas por coliformes possuem grande impacto econômico por apresentarem curso hiperagudo ou agudo, alta taxa de descarte de leite, alta mortalidade de animais por choque endotóxico, além de o tratamento com antibióticos ser ineficaz na maioria dos casos (WENZ et al., 2006).

Ainda são considerados agentes causadores de mastite bovina as bactérias *Trueperella pyogenes*, *Enterococcus* sp., *Mycoplasma* sp., *Micrococcus* sp., algas como a *Prototheca zopfii*, leveduras e fungos como *Cryptococcus neoformans* e *Candida* spp. (BUENO; MESQUITA; DIAS-FILHO, 2006; MELLO et al., 2012; ACOSTA et al., 2016).

2.4 Sinais clínicos de mastite

Considerando a forma de apresentação das mastites, nas de manifestação clínica são observados sinais evidentes de inflamação como edema, aumento de temperatura, enrijecimento e dor da glândula mamária, além de alterações

macroscópicas do leite como presença de grumos, pus e sangue. A forma subclínica da doença não causa alterações visíveis da glândula mamária ou do leite, mas causa alterações na composição da secreção láctea com aumento do número de células somáticas, dos teores de sódio, cloro e proteínas séricas, e diminuição da quantidade de caseína, sólidos totais e lactose (RADOSTITS et al., 2002; COSTA et al., 2006).

2.5 Diagnóstico de mastite

As mastites clínicas são diagnosticadas pelo exame físico da glândula mamária e pelo teste da caneca de fundo preto, também chamado de teste Tamis. A palpação do úbere pode evidenciar aumento de volume, aumento de temperatura, sensibilidade ou enrijecimento, e no teste de Tamis é possível identificar alterações macroscópicas da secreção láctea, como alterações na coloração e presença de grumos (RADOSTITS et al., 2006).

As mastites subclínicas, por sua vez, são diagnosticadas por meio de testes que avaliam o conteúdo leucocitário do leite, como o *California Mastitis Test* (CMT) e a contagem de células somáticas no leite (CCS) (RADOSTITS et al., 2006).

O CMT é um método de auxílio diagnóstico indireto que avalia a quantidade de células somáticas no leite mediante ação de detergente aniônico que rompe a membrana celular, e tem a vantagem de poder ser realizado na fazenda durante a ordenha (DIRKSEN; GRÜNDER; STÖBER, 1993).

A CCS, além de ser utilizada no diagnóstico das mastites subclínicas, é um excelente indicador da qualidade do leite, e ainda está intimamente relacionado às perdas econômicas ocasionadas pela mastite, uma vez que existe uma correlação negativa entre CCS e produção de leite (LARANJA; AMARO, 1998; CUNHA et al., 2008). O aumento do número de células somáticas no leite indica instauração de um processo inflamatório (DELLA LIBERA et al., 2011; DEB et al., 2013) e, de acordo com Harmon et al. (2009), CCS acima de 250.000 células/mL é indicativa de mastite subclínica.

O exame microbiológico é utilizado para identificação precisa do agente etiológico, possibilitando determinação da fonte de infecção e adoção de medidas adequadas de controle (BELOTI et al., 1997; LANGONI et al., 2009). Ferramentas moleculares também podem ser utilizadas para identificação precisa dos patógenos

de modo a complementar o resultado da análise microbiológica (HIITIO et al., 2015).

2.6 Tratamento de mastite

Muitos antimicrobianos são utilizados no controle de mastites em vacas de leite, inclusive na terapia da vaca seca (IVEMEYER et al., 2012; STEVENS et al., 2016). A terapia antimicrobiana visa auxiliar o sistema imune na defesa da glândula mamária e evitar recidivas. Para que isso ocorra de maneira eficaz o princípio ativo deve chegar ao local da infecção e manter níveis adequados por tempo satisfatório. O fácil acesso a esses medicamentos tem sido responsável por escolhas inadequadas levando à seleção de patógenos resistentes e consequente ineficiência do tratamento (SHI et al., 2010; COSTA, 2011).

De acordo com Souza et al. (2016), os antimicrobianos gentamicina, amicacina e cefalexina, apresentam altos índice de atividade antimicrobiana frente a patógenos do gênero *Staphylococcus*, um dos principais causadores de mastites bovinas.

2.7 Profilaxia de mastite

A prevenção dos quadros de mastite se baseia principalmente na implementação de boas práticas de manejo e utilização de antimicrobianos específicos. Além disso, vacinas antimastite também podem ser utilizadas para estímulo da resposta imune e prevenção de novos casos (OLIVEIRA et al., 2016; STEVENS et al., 2016).

Segundo Concha (2004), o controle da mastite bovina depende mais de prevenção do que de tratamento e, nesse contexto, a vacinação contra agentes específicos aumenta a capacidade de resposta imune do animal sendo ferramenta importante no controle da afecção (CALZOLARI et al., 1997). Vaz, Paterno e Marca (2003) afirmam que a vacinação reduz custos e possui reflexos positivos na qualidade do leite e saúde pública, além de reduzir a utilização de antimicrobianos, uma vez que potencializa a ação desses fármacos.

3. Objetivos Gerais e Específicos

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a eficácia da vacina Mastiplus Br[®] e produto teste em bovinos de leite, tanto como tratamento em casos de mastites subclínicas, quanto para a prevenção dos quadros de mastite.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar a prevalência de mastite subclínica no rebanho estudado;
- Identificar, por meio de exame microbiológico, os microrganismos presentes no leite dos animais pertencentes ao rebanho estudado;
- Correlacionar a CCS com o agente etiológico isolado no leite dos animais com mastite estudados;
- Avaliar a CCS no leite dos animais pertencentes ao rebanho estudado antes e após a administração da vacina Mastiplus Br[®] e produto teste;
- Avaliar a resposta imune dos animais, por meio da dosagem de anticorpos IgG sérica pelo ELISA indireto, após a administração da vacina Mastiplus Br[®] e produto teste.

4. Referências

ACOSTA, A. C.; SILVA, L. B. G.; MEDEIROS, E. S.; PINHEIRO-JUNIOR, J. W.; MOTA, R. A. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 36, n. 7, p. 565-573, 2016.

BELOTI, V.; MULLER, E. E.; DE FREITAS, J. C.; METTIFOGO, E. Estudo da mastite subclínica em rebanhos leiteiros no norte do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 1, n. 18, p. 45-53, 1997.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; DIAS FILHO, F. C. *Prototheca zopfii*: importante patógeno na etiologia da mastite bovina no Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 7, n. 3, p. 273-283, 2006.

CALZOLARI, A.; GIRAUDO, J. A.; RAMPONE, H.; ODIERNO, L. FRIGERIO, C.; BETTERA, S.; RASPANTI, C.; HERNÁNDEZ, S.; WEHBE, M.; MATTEA, M.; FERRARI, M.; LARRIESTRA, A.; NAGEL, R. Field trials of a vaccine against bovine mastitis. Evaluation in two commercial herds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n. 5, p. 854-858, 1997.

CONCHA, C. Perspectivas da estimulação da resposta imune da glândula mamária bovina. In: DURR, J. W.; CARVALHO, M. P.; SANTOS, M. V. **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo: UPF. 2004. p. 105-129

COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIAC, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

COSTA, E. O.; SANTOS, F. G. B.; MÁRMORE, C.; ARCARO, J.; PERES, A. A. C.; RAI, R. Influência da intensidade da mastite subclínica por microrganismos do gênero *Staphylococcus* estimada pelo escore de CMT, CCS e na composição do leite: gordura, proteína e lactose. **Napgama**, São Paulo, v. 9, p. 8-13, 2006.

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

DEB, R.; KUMAR, A.; CHAKRABORTY, S.; VERMA, A.K.; TIWARI, R.; DHAMA, K.; SINGH U.; KUMAR, S. Trends in diagnosis and control of bovine mastitis: a review. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 23, p. 1653-1661, 2013.

DELLA LIBERA, A. M. M. P.; SOUZA, F. N.; BLAGITZ, M. G.; BATISTA, C. F. Avaliação de indicadores inflamatórios no diagnóstico da mastite bovina. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 2, p. 297-300, 2011.

DEPEC. **Departamento de Pesquisa e Estudos Econômicos**. Disponível em: <<http://economiaemdia.com.br>>. Acesso em: 06 dez, 2017.

DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H. D.; STÖBER, M. **Rosenberger: Exame Clínico dos Bovinos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 1993. 419 p.

FRY, P. R.; MIDDLETON, J. R.; DUFOUR, S.; PERRY, J.; SCHOLL, D.; DOHOO, I. Association of coagulase-negative staphylococcal species, mammary quarter milk somatic cell count, and persistence of intramammary infection in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, n. 8, p. 4876-4885, 2014.

GEBREYOHANNES, Y. T.; REGASSA G. F.; KELAY, B. Milk yield and associated economic losses in quarters with subclinical mastitis due to *Staphylococcus aureus* in Ethiopian crossbred dairy cows. **Tropical Animal Health Production**, Edimburgo, v. 42, n.5, p. 925-931, 2010.

GENTILINI, M. B.; MOLINA, L. R.; FACURY-FILHO, E. J.; MOREIRA, G. H. F. A.; MOREIRA, L. P. V.; GONÇALVES, R. L.; CARVALHO, A. U. *Escherichia coli* J5: imunização de fêmeas bovinas leiteiras contra mastites causadas por *Escherichia coli*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 10, p. 1843-1851, 2013.

HARMON, R.J.; EBERHART, R.J.; JASPER, D.E.; LANGLOIS, B.E.; WILSON, R.A. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection**. Arlington: National Mastitis Council, 2009.

HEGAZI, A.; ABDU, A. M.; ALLAH, F. A. Antimicrobial activity of própolis on the bacterial causes of mastitis. **Life Science Journal**, Karaj, v. 11, n. 5, p. 572-576, 2014.

HIITIO, H.; RIVA, R.; AUTIO, T.; POLIJANVIRTA, T.; HOLOPAINEN J.; PYORALA, S.; PELKONEN, S. Performance of a real-time PCR assay in routine bovine mastitis diagnostics compared with in-depth conventional culture. **Journal of Dairy Research**, Copenhagen, v. 82, n. 2, p. 200-208, 2015.

HOGAN, J.; SMITH, K. L. Coliform mastitis. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 507-519, 2003.

HUDSON, C. D.; BRADLEY, A. J.; BREEN, J. E.; GREEN, M. J. Associations between udder health and reproductive performance in United Kingdom and dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, n. 7, p. 3683-3697, 2012.

HUIJPS, K.; LAM, T. J.; HOGVEEN, H. Costs of Mastitis: Facts and Perception. **Journal of Dairy Research**, Copenhagen, v. 75, n. 1, p. 113-120, 2008.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção de Leite – 2016**. 2017. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia>>. Acesso em: 06 dez, 2017.

IEA. Instituto de Economia Agrícola. **Queda no rebanho e na produção de leite no Estado de São Paulo, 2005 a 2014**. 2015. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/LerTexto.php?codTexto=13692>>. Acesso em: 15 mar. 2017.

IVEMEYER, S.; SMOLDERS, G.; BRINKMANN, J.; GRATZER, E.; HANSEN, B.; HENRIKSEN, B.I.F.; HUBER, J.; LEEB, C.; MARCH, S.; MEJDELL, C.; NICHOLAS,

P.; RODERICK, S. STOEGER, E.; VAARST, M. WHISTANCE, L.K. WINCKLER, C.; WALKENHORST, M. Impact of animal health and welfare planning on medicine use, herd health and production in European organic dairy farms. **Livestock Science**. v. 145, n. 1, p. 63-72, 2012.

LANGONI, H.; LAURINO, F.; FACCIOLI, P. Y.; SILVA, A. V.; MENOZZI, B. D. Cultivo microbiológico e a sensibilidade no isolamento de patógenos nas mastites bovinas. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 16, n. 4, p. 708-715, 2009.

LARANJA, L. F.; AMARO, F. Contagem de células somáticas: conceitos e estratégias de controle. **Balde Branco**, São Paulo, v. 35, n. 408, p. 28-34, 1998.

MELLO, P. L.; AGOSTINIS, R. O.; BARZON, E. M.; COLOMBO, R. B.; SILVA, A. V.; MARTINS, L. A. 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**, Botucatu, v.19, n.4, p.513-521, 2012.

NACIONAL MASTITIS COUNCIL. **Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Deter**. Verona: Wis. 2004.

OLIVEIRA, S. J.; ALMEIDA, A. C.; WENCESLAU, R. R.; MORTHÉ, M. H. F.; OLIVEIRA, C. R.; SILVA, F. E. G.; LIMA, J. W. G.; MAIA, P. H. B. B. Efetividade sobre a implementação de boas práticas de ordenha sobre contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total do leite (CBT) em rebanhos mestiços localizados em região semiárida do estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista de Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, São Paulo, v. 14, n. 3, p. 14-27, 2016.

PAUL, I.; GANGULY, S. Bovine mastitis, an economically important bacterial infection of udder in cattle: A review. **Indian Journal of Science Research Technology**, Taktakpur, v.2, n. 2, p.1-2, 2014.

PEREIRA, P. F. V., STOTZER, E. S.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; MULLER, E. E.; LISBOA, J. A. Risk factors, etiology and clinical aspects of mastitis in meat ewes of Paraná, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 34, n. 1, p. 1-10, 2014.

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

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats**. 10 th. Rio de Janeiro: Elsevier Saunders. 2006. 1737 p.

RAMÍREZ, N. F.; KEEF, G.; DOHOO, I.; SÁNCHEZ, J.; ARROYAVE, O.; CERÓN, J.; JARAMILO, M.; PALACIO, L. Herd-and cow-level risk factors associated with subclinical mastitis in dairy farms from the high plains of the northern Antioquia, Colombia. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.97, n. 7, p. 4141-4150, 2014.

SHI, D.; HAO, Y.; ZHANG, A.; WULAN, B.; FAN, X. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in China. **Transboundary and Emerging diseases**. v. 57, n. 4, p. 221-224, 2010.

SOUTO, L. I. M.; MINAGAWA, C. Y.; TELLES, E. O.; GARBUGLIO, M. A.; AMAKU, M.; MELVILLE, P. A.; DIAS, R. A.; SAKATA, S. T.; BENITES, N. R. Correlation between mastitis occurrence and count of microorganisms in bulk raw milk of bovine dairy herds in four selective culture media. **Journal of Dairy Research**, Copenhagen, v. 77, n. 1, p. 63-70, 2010.

SOUZA, K. S. S.; OLIVEIRA, Y. C. M.; DUARTE, A. F. V.; OLIVEIRA, T. C.; VELOSO, A. L. C.; OLIVEIRA, P. M. C.; FERNANDES, N. S. F. Resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de vacas leiteiras com mastite subclínica. **Caderno de Ciências Agrárias**, Belo Horizonte, v. 8, n. 2, p. 83-89, 2016.

STEVENS, M.; PIEPERS, S.; SUPRE, K.; DEWULF, J.; DE VliegHER, S. Quantification of the antimicrobial consumption in adult cattle on dairy herds in Flanders, Belgium, and the association with udder health, milk quality and production performances. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 99, n. 3, p. 2118-2130, 2016.

SZTACHANSCHA, M.; BARANSCHI, W.; JANOWSKI, T.; POGORZELSKA, J.; ZDUNCZYK, S. Prevalence and etiological agents of subclinical mastitis at the end of lactation in nine dairy herds in North-East Poland. **Polish Journal of Veterinary Science**, Olsztyn, v. 19, n. 1, p. 119-124, 2016.

VAZ, A.K.; PATERNO, M.R.; MARCA, A. Avaliação da vacina estafilocócica como auxílio à antibioticoterapia de mastite subclínica durante o período de lactação. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 21, n. 124, p. 68-70, 2003.

WENZ, J. R.; BARRINGTON, G. M.; GARY, F. B.; ELLIS, R. P.; MAGNUSON, R. J. *Escherichia coli* isolates serotypes, genotypes, and virulence genes and clinical coliform mastitis severity. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 9, p. 3048-3412, 2006.

CAPÍTULO 2 – Ocorrência de mastite subclínica bovina e sua relação com a contagem de células somáticas e o agente etiológico ¹

Daniela J. de Queiroz*², Tainá C. B. V. Silva³, Mayara G. Fonseca⁴, Inivaldo Corrêa⁵, Maria da Graça P. Corrêa⁶, Fernanda P. Toro⁷, Deborah P. M. Dias⁸, José C. de Lacerda-Neto⁹

ABSTRACT.- Queiroz D.J., Silva T.C.B.V, Fonseca M.G., Corrêa I., Corrêa M.G.P., Toro F.P., Dias D.P.M. & Lacerda-Neto J.C. 2017. [Occurrence of bovine subclinical mastitis and the relation between somatic cell count (SCC) and the etiological agent.] Ocorrência de mastite subclínica bovina e sua relação com a contagem de células somáticas e o agente etiológico. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP 14884-900, Brazil. Centro Universitário Barão de Mauá, Avenida Patriarca, n. 4700, Ribeirão Preto, SP, Brazil. E-mail: danielajqueiroz@hotmail.com

Although characterized by absence of visible clinical signs, subclinical mastitis is responsible for more economic losses than clinical mastitis concerning the decrease in milk production. This study evaluated the occurrence of subclinical mastitis and verified the relation between somatic cell count (SCC) and the etiological agent involved in cows from a dairy farm of the São Paulo state. Milk samples were obtained from four mammary quarters, and SCC and microbiological examination were carried out. From 210 milk samples, 33.81% showed growth of microorganisms, and the most prevalent were *Staphylococcus* and *Streptococcus*, which led to a higher somatic cell count in milk. It is concluded that there is a need to improve the management of milking and environmental conditions in order to reduce the occurrence of subclinical mammary infections.

INDEX TERMS: mammary infection, bovine, somatic cell count, microbiological examination, etiology.

RESUMO.- A mastite subclínica, apesar de não apresentar sinais clínicos visíveis, é responsável por perdas econômicas mais importantes do que a mastite clínica, relacionadas principalmente à diminuição da produção de leite. Este estudo verificou a ocorrência de mastite subclínica e relacionou a contagem de células somáticas (CCS) com o agente etiológico envolvido em vacas leiteiras de uma propriedade do interior do Estado de São Paulo. Coletou-se amostras de leite, dos quatro quartos mamários, de 210 vacas em lactação para realização de CCS e exame microbiológico. Das 210 amostras de leite coletadas observou-se crescimento de microrganismos em 33,81% e os principais agentes etiológicos isolados foram dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Em relação à CCS esses mesmos microrganismos foram responsáveis por aumento da contagem de células somáticas do leite em comparação às amostras negativas no exame microbiológico. Diante dos dados obtidos conclui-se a necessidade de melhora do manejo de ordenha e condições ambientais a fim de diminuir a ocorrência de infecções mamárias subclínicas.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: infecção mamária, bovino, contagem de células somáticas, exame microbiológico, etiologia.

¹ Artigo redigido de acordo com as normas da revista Pesquisa Veterinária Brasileira

²Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (FCAV, UNESP), Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Jaboticabal, SP, Brasil. Centro Universitário Barão de Mauá, Avenida Patriarca, n. 4700, Ribeirão Preto, SP, Brasil. *Autor para correspondência: danielajqueiroz@hotmail.com

³Centro Universitário Barão de Mauá, Avenida Patriarca, n. 4700, Ribeirão Preto, SP, Brasil. tainabeletti@hotmail.com

⁴Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (FCAV, UNESP), Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Jaboticabal, SP, Brasil. mayaragoncalvesf@hotmail.com

⁵Laboratório Vitafort Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda., Rua Édson Souto, 738, Ribeirão Preto, SP, Brasil. inivaldo@vitafort.com.br

⁶Laboratório Vitafort Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda., Rua Édson Souto, 738, Ribeirão Preto, SP, Brasil. gracacorrea@vitafort.com.br

⁷Laboratório Vitafort Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda., Rua Édson Souto, 738, Ribeirão Preto, SP, Brasil. fernandatoro@vitafort.com.br

⁸Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (FCAV, UNESP), Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Jaboticabal, SP, Brasil. Centro Universitário Barão de Mauá, Avenida Patriarca, n. 4700, Ribeirão Preto, SP, Brasil. deborah_dias@hotmail.com

⁹Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (FCAV, UNESP), Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Jaboticabal, SP, Brasil. jlacerda@fcav.unesp.br

INTRODUÇÃO

O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo, perdendo apenas para a Índia, e encontra-se em segundo lugar no número de animais abatidos, segundo o Depec (2017). Em relação à produção de leite em 2016, o Brasil produziu aproximadamente 34 bilhões de litros alcançando o quinto lugar do *ranking* mundial de países produtores de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE 2016). Apesar de ser um dos maiores produtores do mundo, o Brasil ainda importa lácteos para suprir as necessidades do mercado interno (Milkpoint 2015). Em relação à produção de leite por região, o Sudeste é o segundo maior produtor (34,6%) perdendo apenas para a região Sul (34,7%) (Milkpoint 2015). Apesar da maior parte dos animais no Brasil ainda serem criados exclusivamente a pasto, o manejo vem se tornando cada vez mais intensivo a fim de melhorar índices zootécnicos e sustentar tamanha produção. Diante disso, a saúde dos bovinos é indispensável para uma pecuária competitiva. Porém a busca por índices zootécnicos como ganho de peso, produção de leite e fertilidade, cada vez melhores, predispõe a diversas enfermidades. Dentre as doenças associadas aos sistemas de produção intensiva, as que acometem o úbere juntamente com as afecções podais e os problemas de fertilidade são as principais responsáveis por perdas tanto na indústria de leite quanto de carne (Ribeiro et al. 2003, König & Liebich 2011).

A mastite se caracteriza pela inflamação de um ou mais quartos mamários e pode ser classificada de acordo com sua apresentação em mastite clínica ou subclínica, ou de acordo com o agente etiológico envolvido em mastite contagiosa ou ambiental (Radostits et al. 2006). É a inflamação mais frequente em animais de produção leiteira e a principal causa de prejuízos financeiros na pecuária de leite (Paul & Ganguly 2014, Pereira et al. 2014). A mastite subclínica, apesar de não apresentar sinais clínicos visíveis, é responsável por perdas econômicas mais importantes do que a mastite clínica, e essas estão relacionadas à diminuição da produção de leite (Huijps et al. 2008). Diversos agentes etiológicos são causadores de mastite bovina, como bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras (Sztachanska et al. 2016). Dentre as bactérias, as dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Corynebacterium* são as mais prevalentes e causadoras de mastites contagiosas (Acosta et al. 2016, Souza et al. 2016, Sztachanska et al. 2016). As bactérias chamadas coliformes, como *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. e *Enterobacter* sp., são as principais responsáveis pelas mastites ambientais e possuem grande impacto econômico por causar muitos casos de mastite aguda, alta taxa de descarte de leite, alta mortalidade de animais por choque endotoxêmico, além de o tratamento com antibióticos ser ineficaz na maioria dos casos (Wenz et al. 2006).

O diagnóstico das mastites subclínicas é feito por meio de testes que avaliam o conteúdo leucocitário do leite, como o California Mastitis Test (CMT) e a contagem de células somáticas (CCS) no leite. A CCS, além de ser utilizada no diagnóstico das mastites subclínicas, é um excelente indicador da qualidade do leite, e ainda está intimamente relacionada às perdas econômicas ocasionadas pela mastite, uma vez que existe uma correlação negativa entre CCS e produção de leite (Laranja & Amaro 1998, Cunha et al. 2008). O aumento do número de células somáticas no leite indica início de um processo inflamatório (Della Libera et al. 2011, Deb et al. 2013) e de acordo com Harmon et al. (1990), CCS acima de 250.000 células/mL é indicativo de mastite subclínica. O exame microbiológico é utilizado para identificação precisa do agente etiológico, possibilitando determinar a fonte de infecção e adotar medidas adequadas de controle (Beloti et al. 1997, Langoni et al. 2009). Ferramentas moleculares também podem ser utilizadas para identificação precisa dos patógenos de modo a complementar o resultado da análise microbiológica (Hiitio et al. 2015).

Este estudo objetivou verificar a prevalência de mastite subclínica em um rebanho de vacas leiteiras do interior do Estado de São Paulo e relacionar a CCS com o agente etiológico envolvido.

MATERIAL E MÉTODOS

Participaram do estudo 210 vacas Holandesas entre o segundo e sexto mês de lactação, criadas em sistema intensivo, com faixa etária entre 3 e 7 anos, e produção diária média de 29 litros de leite, pertencentes a uma propriedade localizada no interior do Estado de São Paulo (Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal – CEPAN – do Centro Universitário Barão de Mauá – Protocolo nº 275/16). O estudo foi realizado em outubro de 2016 e todas as coletas ocorreram no mesmo dia. Os animais eram ordenhados mecanicamente três vezes ao dia e as coletas para o estudo foram realizadas na ordenha da manhã. Previamente à ordenha, os tetos eram higienizados com água, quando necessário e, na sequência, era realizada a antisepsia com solução de clorexidine 0,3% (pré-dipping) e secagem com papel toalha individual. Em seguida, eram eliminados os primeiros jatos de leite para realização do teste de Tamis e identificação de possíveis alterações indicativas de enfermidade clínica, tais como presença de grumos e alteração na coloração da secreção láctea. Na sequência coletava-se amostra de secreção láctea

de cada quarto mamário por meio de ordenha manual, em frascos estéreis próprios para realização de exame microbiológico, e depois era realizada ordenha mecânica por meio de teteiras e sistema a vácuo com copo coletor, obtendo frações de leite de todo o processo de ordenha e assim selecionando uma amostra homogênea. Tanto a CCS quanto o exame microbiológico eram realizados em um pool de amostras composto por secreção láctea dos quatro quartos mamários de cada vaca. Após a ordenha completa de todos os quartos, realizava-se pós-dipping com solução de iodo 1%.

As amostras de leite coletadas no copo coletor eram armazenadas em frascos contendo bromopol e encaminhadas à Clínica do Leite – Esalq/ USP (Piracicaba/ SP) para realização da CCS em aparelho de citometria de fluxo e as amostras coletadas para análises microbiológicas eram enviadas ao Laboratório Vitafort Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda (Ribeirão Preto/ SP) onde realizou-se cultura microbiológica nos meios ágar sangue, ágar MacConkey e ágar Sabouraud com dextrose. As placas foram incubadas à 35°C e as leituras realizadas após 24 e 48 horas.

Para a análise estatística, os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($P < 0,05$), ao teste de homocedasticidade de Levene ($P < 0,05$) e em seguida à análise descritiva. Para avaliar a relação entre o valor da CCS e o tipo ou número de agentes isolados no exame microbiológico, as medianas da CCS foram comparadas por meio do Teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$) no programa STATISTICA® 7.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 210 amostras de leite coletadas observou-se crescimento de microrganismos em 71 (33,9%) e as outras 139 foram negativas no exame microbiológico (66,2%), conforme demonstrado no Quadro 1. Os presentes resultados corroboram Acosta et al. (2016) que relataram prevalência de mastite subclínica entre 10 e 48,6% e também Sztachanska et al. (2016) que detectaram a afecção em 36,7% dos animais avaliados. Já Mello et al. (2012) detectaram ocorrência de mastite subclínica bem mais elevada, em torno de 70%. Para Ribeiro et al. (2003) a prevalência de mastite subclínica em uma propriedade não deve ultrapassar 15% levando-se a concluir que foi alta nesse estudo. Ademais, em 39 amostras (54,9%) isolou-se apenas um agente etiológico, em 25 amostras (35,2%) dois agentes e em sete amostras (9,86%) três microrganismos simultaneamente (Quadro 1).

Quadro 1. Contagem de células somáticas ($\times 10^3$ células/mL) segundo o número de microrganismos isolados no exame microbiológico

Associação de microrganismos	n (%)	CCS					Erro padrão
		Mínimo	Mediana	1º Quartil	3º Quartil	Máximo	
1 microrganismo	39 (18,6)	26	465 ^A	250	622	2614	83
2 microrganismos	25 (11,9)	25	833 ^A	423	1163	9824	474
3 microrganismos	7 (3,33)	333	1030 ^A	417	2961	4320	566
Sem crescimento	139 (66,2)	3	67 ^B	28	125	792	8

^(A,B) Medianas seguidas de letras distintas na coluna diferem pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Quanto aos microrganismos encontrados, o gênero *Staphylococcus* foi o mais prevalente (50%), tendo sido identificado em 42 amostras, seguido por *Streptococcus* sp. isolado em 29 amostras (34,5%), *Enterobacter* sp. isolado em 12 (14,3%), leveduras isoladas também em 12 (14,3%), *Escherichia coli* isolada em 8 (9,5%), *Salmonella* sp. isolada em 7 (8,3%), *Proteus* sp. isolado em 6 (7,1%), *Citrobacter* sp. e *Pseudomonas* sp. isoladas em 4 (4,8%) cada uma, outras bactérias Gram negativas isoladas em 2 (2,4%) e *Serratia* sp. e *Shigella* sp. isoladas em apenas uma amostra cada (1,2%). Os resultados obtidos estão em consonância com dados da literatura que trazem *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. como os principais causadores de mastites bovinas (Mello et al. 2012, Acosta et al. 2016). Ainda, no presente estudo, dentro do gênero *Staphylococcus*, o patógeno isolado com maior frequência foi *S. aureus*. De acordo com Budri et al. (2015) e Fabres-Klein et al. (2015) esse microrganismo é mais resistente a antimicrobianos por formar um biofilme nos tecidos da glândula mamária e essa pode ser a explicação pela sua alta frequência de isolamento em casos de mastite. Em relação ao gênero *Staphylococcus* as espécies *S. chromogenes*, *S. aureus* e *S. epidermidis* foram identificadas, e em relação ao gênero *Streptococcus* as espécies *S. uberis* e *S. agalactiae* foram identificadas.

A maior prevalência dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* caracteriza principalmente ocorrência de mastite contagiosa. No entanto, houve também crescimento de microrganismos causadores de mastites ambientais como *E. coli* e *Enterobacter* sp., indicando necessidade de revisar o manejo de ordenha e higiene ambiental além do emprego de soluções desinfetantes tanto antes quanto depois da ordenha. De acordo com Martins et al. (2017) a eficácia da desinfecção dos tetos depende não apenas da formulação dos produtos utilizados, mas também do agente etiológico e condições ambientais.

Em relação à CCS, nas amostras de leite em que não houve crescimento bacteriano a mediana foi de 67.000 células/mL. Já nas amostras nas quais se isolou apenas um microrganismo a CCS foi de 465.000 células/mL, nas quais se isolou dois agentes foi de 833.000 células/mL e nas quais se isolou três foi de 1.030.000 células/mL, conforme demonstrado no Quadro 1. Esses resultados corroboram os de Harmon et al. (2009) que relataram que CCS acima de 250.000 células/mL caracterizam mastite subclínica. De et al. (2011) e Sharma et al. (2011) relataram que fatores como agente etiológico, estágio e número de lactações, produção, período do ano e raça influenciam na CCS. Ao analisar os dados, não se observou diferença de mediana entre as amostras em que se isolou um, dois ou três microrganismos simultaneamente havendo diferença apenas entre a mediana de CCS nas amostras negativas no exame microbiológico quando comparada às amostras positivas, nas quais a CCS foi maior.

De acordo com Auldist e Hubble (1998) a mastite é responsável por causar diminuição da produção de leite não apenas na lactação atual como também nas seguintes, sendo assim responsável por importantes perdas econômicas. Philpot e Nickerson (1992) afirmaram que contagens celulares de 200.000, 500.000, 800.000 e 1.000.000 de células/mL de leite indicam diminuição de produção de 6%, 9%, 11% e 12% respectivamente, reforçando assim a necessidade de se controlar a celularidade do leite evitando prejuízos.

Ao relacionar a mediana de CCS e o resultado do exame microbiológico não houve diferença entre as amostras na qual se isolou *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* coagulase positiva, *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia coli* e levedura e as amostras nas quais não houve crescimento bacteriano. No entanto, a mediana de CCS foi maior quando comparada às amostras negativas, naquelas onde se isolou *Streptococcus* sp. e *Staphylococcus* coagulase negativa (Quadro 2). Esses resultados são similares aos encontrados por Mello et al. (2012) que verificaram CCS mais elevada em relação às amostras negativas apenas naquelas em que se isolou *Streptococcus agalactiae*. No presente estudo acredita-se que a ausência de diferença entre a mediana de CCS das amostras positivas para *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* coagulase positiva, *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp. e *Escherichia coli* em relação às amostras negativas deve-se ao n baixo (três ou menos amostras) e consequente erro padrão da média elevado. Apesar de esses microrganismos terem sido isolados em um pequeno número de amostras são importantes patógenos causadores de mastite bovina.

Quadro 2. Contagem de células somáticas (10³ células/mL) segundo o tipo e o número de microrganismos isolados no exame microbiológico.

Microrganismo	n (%)	CCS					Erro padrão
		Mínimo	Mediana	1º Quartil	3º Quartil	Máximo	
<i>Proteus</i> sp.	1 (0,48)	1991	1991 ^{AB}	1991	1991	1991	-
<i>Pseudomonas</i> sp.	1 (0,48)	622	622 ^{AB}	622	622	622	-
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	2 (0,95)	531	796 ^{AB}	531	1061	1061	265
<i>Citrobacter</i> sp.	3 (1,43)	487	812 ^{AB}	487	2614	2614	662
<i>Enterobacter</i> sp.	3 (1,43)	352	699 ^{AB}	352	1220	1220	252
<i>Escherichia coli</i>	3 (1,43)	298	465 ^{AB}	298	1491	1491	373
Levedura	5 (2,38)	26	76 ^{AB}	66	181	396	67
<i>Streptococcus</i> spp.	6 (2,86)	250	462 ^A	293	545	584	56
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	15 (7,14)	68	411 ^A	222	561	743	52
2 microrganismos ¹	25 (11,9)	25	833 ^A	423	1163	9824	474
3 microrganismos ¹	7 (3,33)	333	1030 ^A	417	2961	4320	566
Sem crescimento	139 (66,2)	3	67 ^B	28	125	792	8

^(A,B) Medianas seguidas de letras distintas na coluna diferem pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

¹Diferentes associações dos seguintes microrganismos: *Citrobacter* sp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp., *Levedura*, *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., *Serratia* sp., *Staphylococcus* coagulase negativa, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Shigella* sp., *Streptococcus* sp.

De acordo com Viana et al. (2002) e Souza et al. (2009) infecções mamárias por *Streptococcus agalactiae* são responsáveis por maior celularidade do leite, confirmando a influência dos diferentes agentes etiológicos na contagem de células somáticas. No presente estudo, tanto *Streptococcus* sp. quanto *Staphylococcus* coagulase negativa ocasionaram maior CCS do leite.

CONCLUSÃO

Observou-se alta ocorrência de mastite subclínica causada tanto por microrganismos contagiosos quanto ambientais e os gêneros mais prevalentes foram *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. Analisando-se a mediana de CCS conclui-se que os diferentes agentes etiológicos tem influência na celularidade do leite. Diante dos dados obtidos conclui-se necessidade de melhora do manejo de ordenha e condições ambientais a fim de diminuir a ocorrência de infecções mamárias subclínicas, e também sugere-se instituir a vacinação como método de controle de mastite

REFERÊNCIAS

- Acosta A.C., Silva L.B.G., Medeiros E.S., Pinheiro-Júnior J.W. & Mota, R.A. 2016. Mastites em ruminantes no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 36(7): 565-573.
- Auld M.J. & Hubble I.B. 1998. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. *Austr. J. Dairy Technol.* 53:28-36.
- Budri P.E., Silva N.C.C., Bonsaglia E.C.R., Fernandes Junior A., Araújo Junior J.P., Doyama J.T., Golçalves J.L., Santos M.V., Fitzgerald-Hughes D. & Rall V.L.M. 2015. Effect of essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* and their major components on biofilm production in *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of cows with mastitis. *J. Dairy Res.* 98(9): 5899-5904.
- Cunha R.P.L., Gentilini M.B., Ferreira, P.M., Facury-Filho E.J., Carvalho A.U. & Molina L.R. 2008. *Arq. Bras. Med Vet Zoo.* 60(1): 19-24.
- De K., Murkherjee J., Prasad S. & Dang A. 2011. Effects of diferente physiological stages and managemental practices on milk somatic cell counts of Murrah Buffaloes. *Buff. Bull.* 30: 72-99.
- Deb R., Kumar A., Chakraborty S., Verma A.K., Tiwari R., Dhama K., Singh U. & Kumar S. 2013. Trends in diagnosis and control of bovine mastitis: a review. *Pak. J. Biol. Sci.* 16: 1653-1661.
- Della Libera A.M.M.P., Souza F.N., Blagitz M.G. & Batista C.F. 2011. Avaliação de indicadores inflamatórios

- no diagnóstico da mastite bovina. Arq. Inst. Biol. 78 (2): 297-300.
- DEPEC. **Departamento de Pesquisa e Estudos Econômicos.** Disponível em: <<http://economiaemdia.com.br>>. Acesso em: 06 dez, 2017.
- Fabres-Klein M.H., Santos M.J.C., Klein R.C., Souza G.N. & Ribon A.O.B. 2015. An association between milk and slime increases biofilm production by bovine *Staphylococcus aureus*. BMC Vet Res. 11(3): 1-8.
- Harmon R.J., Eberhart R.J., Jasper D.E., Langlois B.E. & Wilson R.A. 1990. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. Arlington: National Mastitis Council.
- Hiitio H., Riva R., Autio T., Polijänvirta T., Holopainen J., Pyörälä S. & Pelkonen S. 2015. Performance of a real-time PCR assay in routine bovine mastitis diagnostics compared with in-depth conventional culture. J. Dairy Res. 82: 200-208.
- Huijps K., Lam T.J. & Hogeveen H. 2008. Costs of Mastitis: Facts and Perception. J. Dairy Res. 75: 113-120.
- IBGE, 2016. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção de Leite – 2016. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia>. Acesso em 06 dez. 2017.
- König H. E., Liebich H. G. 2016. Anatomia dos animais domésticos. Texto e atlas colorido. 6th ed. Porto Alegre: Artmed, p. 824.
- Langoni H., Laurino F., Faccioli P.Y., Silva A.V. & Menozzi B.D. 2009. Cultivo microbiológico e a sensibilidade no isolamento de patógenos nas mastites bovinas. Vet. Zootec. 16(4): 708-715.
- Laranja L.F. & Amaro F. 1998. Contagem de células somáticas: conceitos e estratégias de controle. Balde de Leite. 408: 28-34.
- Martins C.M.M.R., Pinheiro E.S.C., Gentilini M., Lopez Benavides M. & Santos M.V. 2017. Efficacy of a high free iodine barrier teat disinfectant for the prevention of naturally occurring new intramammary infections and clinical mastitis in dairy cows. Journal of Dairy Science. 100(5): 3930-3939.
- Mello P.L., Agostini R.O., Barzon E.M., Colombo R.B., Silva A.V. & Martins L.A. 2012. Prevalência da mastite subclínica e associação dos agentes etiológicos com a contagem de células somáticas de vacas leiteiras da região Sudoeste do Paraná. Vet. e Zootec. 19(4): 513-521.
- Milkpoint 2015. IBGE: produção de leite cresceu 2,7% em 2014; Sul tornou-se a maior região produtora. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/ibge-producao-de-leite-cresceu-27-em-2014-sul-tornouse-a-maior-regiao-produtora-97326n.aspx>. Acesso em 15 mar. 2017.
- Paul I. & Ganguly S. 2014. Bovine mastitis, an economically important bacterial infection of udder in cattle: A review. Indian J. Sci. Res. Technol. 2(2): 1-2.
- Pereira P.F.V., Stotzer E.S., Pretto-Giordano L.G., Muller E.E. & Lisboa J.A. 2014. Risk factors, etiology and clinical aspects of mastitis in meat ewes of Paraná, Brazil. Pesq. Vet. Bras. 34: 1-10.
- Philpot W.N. & Nickerson S.C. 1992. Mastitis: counter attack. Naperville: Babson Bros.
- Radostits O.M., Gay C.C., Blood, D.C. & Hinchcliff, K.W. 2006. Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 10 th. Rio de Janeiro: Elsevier Saunders. 2006. 1737 p.
- Ribeiro M.E.R., Petrini L.A., Aita M.F., Balbinotti, M., Stumpf J.R.W., Gomes J.F., Schramm R.C., Martins P.R. & Barbosa R.S. 2003. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio grande do Sul. Revista Brasileira de Agrociência. 9(3): 287-290.
- Sharma N., Singh N. & Bhadwal M. 2011. Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 24: 429-438.
- Souza G.N., Brito J.R.F., Moreira E.C., Brito M.A.V.P. & Silva M.V.G.B. 2009. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. Arq Bras Med Vet Zootec. 61: 1015-1020.
- Souza K.S.S., Oliveira Y.C.M., Duarte A.F.V., Oliveira T.C., Veloso A.L.C., Oliveira P.M.C. & Fernandes N.S.F. 2016. Resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de vacas leiteiras com mastite subclínica. Caderno de Ciências Agrárias. 8(2): 83-89.
- Sztachanska M., Baranski W., Janowski T., Pogorzelska J. & Zdunczyk S. 2016. Prevalence and etiological agents of subclinical mastitis at the end of lactation in nine dairy herds in North-East Poland. Pol. J. Vet. Sci. 19(1): 119-124.
- Viana L.C., Muller E.E., Freitas J.C., Giordano L.G.P., Salvador R. & Dias J.A. 2002. Etiologia das infecções intramamárias e contagem de células somáticas em vacas primíparas. Semina Cienc. Agrar. 23: 3-8.
- Wenz J.R., Barrington G.M., Garry F.B., Ellis R.P. & Magnuson R.J. 2006. Isolates serotypes, genotypes and virulence genes and clinical coliform mastitis severity. J. Dairy Sci. 89: 3408-3414.

CAPÍTULO 3 – Eficácia de vacina comercial e vacina teste, ambas compostas por bacterina mista inativada, no controle de mastite subclínica em vacas leiteiras¹

Daniela J. de Queiroz*², Tainá C. B. V. Silva³, Mayara G. Fonseca⁴, Inivaldo Corrêa⁵, Maria da Graça P. Corrêa⁶, Fernanda P. Toro⁷, Deborah P. M. Dias⁸, José C. de Lacerda-Neto⁹

ABSTRACT.- Queiroz D.J., Silva T.C.B.V, Fonseca M.G., Corrêa I., Corrêa M.G.P., Toro F.P., Dias D.P.M. & Lacerda-Neto J.C. 2017. [Efficacy of comercial vaccine and test vaccine, both composed of inactivated mixed bacterin, in the control of subclinical mastitis in dairy cows.] Eficácia de vacina comercial e vacina teste, ambas compostas por bacterina mista inativada, no controle de mastite subclínica em vacas leiteiras. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP 14884-900, Brazil. Centro Universitário Barão de Mauá, Avenida Patriarca, n. 4700, Ribeirão Preto, SP, Brazil. E-mail: danielajqueiroz@hotmail.com

Vaccines are an important strategy for mastitis control because it increases the animal immune response capacity. This study aimed to verify the efficacy of a comercial vaccine¹⁰ and a test vaccine, both containing mixed inactivated bacterin, in the control of subclinical mastitis in Holstein cows. At the beginning of the experimental period, 100% of animals had subclinical mastitis. Five days after, in the the end of vaccination protocol, 63.64% of animal treated with comercial vaccine and 60% of those treated with test vaccine, while only 18.18% of the animals in the control group were cured, and fourteen days after 27.27% treated with comercial vaccine were cured, 50% treated with test vaccine and 36.36% control animals. There was no difference in somatic cell counts between groups at different times as there was no difference in IgG titers between vaccinated and unvaccinated animals. The avoidable fraction of the comercial vaccine was 55.6% and the test vaccine 51.1%. Nevertheless, it was concluded that the treated animals, both with the comercial vaccine and with the test vaccine, presented a higher percentage of cure in relation untreated animals, thus, vaccination was an alternative in the control of subclinical mastitis.

INDEX TERMS: vaccination, somatic cell count, microbiological examination, IgG, immune response.

RESUMO.- A utilização de vacinas é uma importante estratégia de controle das mastites uma vez que aumenta a capacidade de resposta imune do animal. Esse estudo teve como objetivo verificar a eficácia de uma vacina comercial¹⁰ e de uma vacina teste, ambas contendo bacterina mista inativada, no controle das mastites subclínicas em um rebanho de vacas holandesas. No início do período experimental 100% dos animais encontravam-se com mastite subclínica, cinco dias após o final do protocolo vacinal observou-se cura em 63,64% dos animais tratados com vacina comercial e em 60% dos tratados com vacina teste, enquanto apenas 18,18% dos animais do grupo controle encontravam-se curados, e quatorze dias após 27,27% tratados com vacina comercial permaneciam curados, 50% dos tratados com vacina teste e

¹ Artigo redigido de acordo com as normas da revista Pesquisa Veterinária Brasileira

²Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (FCAV, UNESP), Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Jaboticabal, SP, Brasil. Centro Universitário Barão de Mauá, Avenida Patriarca, n. 4700, Ribeirão Preto, SP, Brasil. *Autor para correspondência: danielajqueiroz@hotmail.com

³Centro Universitário Barão de Mauá, Avenida Patriarca, n. 4700, Ribeirão Preto, SP, Brasil. tainabeletti@hotmail.com

⁴Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (FCAV, UNESP), Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Jaboticabal, SP, Brasil. mayaragoncalvesf@hotmail.com

⁵Laboratório Vitafort Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda., Rua Édson Souto, 738, Ribeirão Preto, SP, Brasil. inivaldo@vitafort.com.br

⁶Laboratório Vitafort Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda., Rua Édson Souto, 738, Ribeirão Preto, SP, Brasil. gracacorrea@vitafort.com.br

⁷Laboratório Vitafort Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda., Rua Édson Souto, 738, Ribeirão Preto, SP, Brasil. fernandatoro@vitafort.com.br

⁸Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (FCAV, UNESP), Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Jaboticabal, SP, Brasil. Centro Universitário Barão de Mauá, Avenida Patriarca, n. 4700, Ribeirão Preto, SP, Brasil. deborah_dias@hotmail.com

⁹Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (FCAV, UNESP), Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Jaboticabal, SP, Brasil. jlacerda@fcav.unesp.br

¹⁰ Vacina Mastiplus Br®, produzida pelo Laboratório Vitafort Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda., Rua Édson Souto, 738, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

36,36% dos animais controle. Não se observou diferença da contagem de células somáticas entre os grupos nos diferentes momentos assim como não houve diferença dos títulos de IgG entre os animais vacinados e não vacinados. A fração evitável da vacina comercial foi de 55,6% e da vacina teste de 51,1%. Apesar disso conclui-se que os animais tratados, tanto com a vacina comercial quanto com vacina teste, apresentaram uma maior porcentagem de cura em relação aos animais não tratados, sendo assim a vacinação uma boa alternativa no controle das mastites subclínicas.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: vacinação, contagem de células somáticas, exame microbiológico, IgG, resposta imune.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto maior produtor de leite do mundo tendo produzido em 2015 aproximadamente 34 bilhões de litros, apesar disso ainda importa produtos lácteos para sustentar a demanda nacional (IBGE 2015; Milkpoint 2015). Dentre os gargalos da produção de leite a mastite, juntamente com as afecções podais e doenças do trato reprodutivo, possui papel importante sendo responsável por grandes prejuízos econômicos ao produtor (Ribeiro et al. 2003).

A mastite se caracteriza por inflamação da glândula mamária e se manifesta sob a forma clínica ou subclínica (Radostits et al. 2002). A forma subclínica é a mais prevalente, causa alterações microscópicas do leite, como aumento da contagem de células somáticas (CCS) e mudanças na composição da secreção láctea, e é responsável por 70% das perdas econômicas envolvendo a mastite (Radostits et al. 2002; Prestes et al. 2002; Huijps et al. 2008).

A profilaxia das mastites está mais relacionado à prevenção do que ao tratamento e a utilização de vacinas, sejam elas comerciais ou autógenas, é uma importante estratégia de controle uma vez que aumenta a capacidade de resposta imune do animal (Concha 2004; Santos e Fonseca 2005).

Neste contexto esse estudo teve como objetivo verificar a eficácia da utilização de uma vacina comercial e de uma vacina teste, ambos contendo bacterina inativada de cepas de *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. coli*, *C. pyogenes*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis* e *P. Multocida*, no controle das mastites subclínicas em um rebanho de vacas holandesas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas no estudo trinta e seis vacas holandesas, entre o segundo e o sexto mês de lactação, estabuladas em sistema free-stall, com idade entre três e sete anos e produção média de leite de 25 litros diários (Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal – CEPAN – do Centro Universitário Barão de Mauá – Protocolo nº 275/16). Todas as vacas encontravam-se com mastite subclínica diagnosticada por meio de CCS e avaliação microbiológica. Considerou-se como sendo mastite subclínica secreção láctea de aparência normal porém com CCS acima de 250.000 células/mL de leite e resultado positivo no exame microbiológico.

Os animais foram divididos em três grupos experimentais cada um composto por doze vacas. O primeiro grupo, chamado de G1, foi tratado com a vacina comercial, o segundo grupo (G2) com a vacina teste e o terceiro grupo (G3) foi o grupo controle, tratado com solução fisiológica. Imediatamente antes da ordenha os tetos eram higienizados com água, caso necessário e, em seguida, era realizada a antissepsia com solução de clorexidina a 0,3% (pré-dipping) e secagem com papel toalha individual. Na sequência eram eliminados os primeiros jatos de leite para realização do teste de Tamis e identificação de possíveis alterações da secreção lacteal indicativas de enfermidade clínica e uma amostra de leite era coletada de cada quarto mamário por meio de ordenha manual, em frascos esterilizados próprios para realização de exame microbiológico. Depois era realizada ordenha mecânica por meio de teteiras automáticas e sistema a vácuo com copo coletor, no qual se obtinha frações de leite de todo o processo de ordenha para realização da CCS. Essas amostras de leite eram armazenadas em frascos contendo bromopol e encaminhadas ao laboratório para realização da CCS em aparelho de citometria de fluxo. Ao final da ordenha realizava-se pós-dipping com solução de iodo a 1% e após a ordenha eram feitas as administrações de vacina, vacina teste ou solução fisiológica, de acordo com o grupo experimental. Tanto a vacina comercial quanto a vacina teste utilizados são compostos por bacterina mista inativada, no entanto a vacina comercial leva em sua composição hidrolisado de glândula mamária de bovinos enquanto na vacina teste esse hidrolisado é substituído por órgãos de suíno, não tendo assim a vacina teste material bovino em sua composição.

Em relação às administrações da vacina comercial, vacina teste e solução fisiológica foram feitas 3 séries cada uma composta por 3 administrações de 5 ml, por via subcutânea, na tábua do pescoço, com intervalo de 48 horas entre elas. O intervalo entre as séries foi de uma semana, conforme normas do fabricante.

Conforme se observa na figura 1 a CCS e o exame microbiológico foram realizados imediatamente antes da administração da vacina comercial, vacina teste ou solução fisiológica (D0), cinco dias após o final do protocolo vacinal (D31) e quatorze dias após (D45). Nos dias D0 e D31 também foi realizada coleta de sangue mediante venipunção da veia coccígea para dosagem de imunoglobulina G (IgG) pelo método de ELISA. A leitura das placas foi feita a 405 nm em espectrofotômetro e os dados analisados no programa computadorizado Gen5.

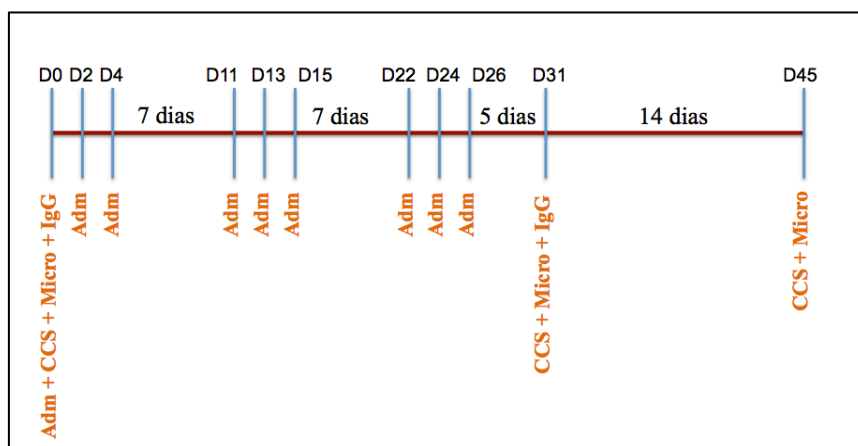


Figura 1. Linha do tempo ilustrando os momentos experimentais. D: dia; Adm: administração; CCS: coleta de material para realização de contagem de células somáticas; Micro: coleta de material para realização de exame microbiológico; IgG: coleta de material para dosagem de IgG sérica

Para a análise dos dados realizou-se estatística descritiva estabelecendo-se a porcentagem de cura em cada grupo experimental. Os animais foram considerados curados quando não houve identificação de microrganismos no exame microbiológico e doentes quando houve isolamento de um ou mais agentes etiológicos. Os dados de CCS foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($P < 0,05$). A comparação da CCS entre os dias de avaliação dentro do mesmo tratamento foi realizada pelo teste de Friedman ($P < 0,05$), já a comparação entre tratamentos dentro do mesmo dia de avaliação foi realizada por meio do teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$) utilizando o programa STATISTICA 7.0®. Os resultados de IgG foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ao nível de probabilidade de 5% e teste de Tukey ($P < 0,05$) utilizando-se o programa Graphpad Prism®.

Calculou-se também a eficácia da vacina por meio da fórmula proposta por Tizard (1998) na qual se obtém como resultado uma estimativa da fração evitável (FE). Para tanto substituiu-se a porcentagem de mortes pela porcentagem de animais com mastite subclínica de acordo com fórmula abaixo:

$$FE (\%) = \frac{\% ADGC - \%ADGT}{\% ADGC}$$

onde:

% ADGC = % de animais doentes no grupo controle

% ADGT = % de animais doentes no grupo tratado

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O exame microbiológico realizado no D0 permitiu a identificação dos microrganismos responsáveis pelos casos de mastite subclínica das vacas utilizadas no presente estudo. Os

microrganismos isolados foram *Staphylococcus* coagulase positiva, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Streptococcus* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp. e *Shigella* sp., sendo que os microrganismos dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* foram os mais prevalentes estando presentes em, respectivamente, 50% e 47,2% das amostras de leite. Esse achado corrobora Mello et al. (2012) e Acosta et al. (2016) que relatam que *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. são os principais causadores de mastites bovinas. No D31 os microrganismos isolados foram *Staphylococcus* coagulase positiva, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Streptococcus* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., *Klebsiella* sp. e leveduras. Já no D45 isolou-se *Staphylococcus* coagulase positiva, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Streptococcus* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia coli*, *Serratia* sp. e leveduras.

Na figura 2 pode-se observar que no início do período experimental (D0) todos os animais (100%) encontravam-se com mastite subclínica. Já no D31 observou-se cura em 63,6% dos animais tratados com vacina comercial (G1) e em 60% dos animais tratados com vacina teste (G2), enquanto no grupo controle (G3) apenas 18,2% dos animais encontravam-se curados. No D45, 27,3% dos animais do G1 permaneciam curados, 50% do G2 e 36,4% do G3. Ademais nenhum dos animais, tanto do grupo controle quanto dos grupos tratados, desenvolveu mastite clínica.

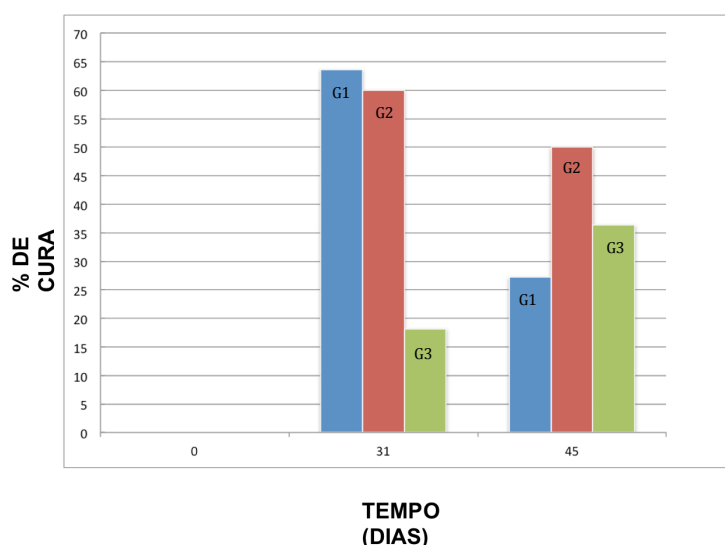


Figura 2. Porcentagem de vacas curadas, de acordo com resultado do exame microbiológico, cinco dias (D31) e quatorze dias após (D45) o final do protocolo vacinal com vacina comercial (G1), vacina teste (G2) ou administração de solução fisiológica (G3), Cravinho – SP, 2016.

Uma vez que não foram utilizados antimicrobianos no tratamento desses animais e que a porcentagem de cura nos grupos tratados (G1 e G2) foi maior quando comparada ao grupo controle (G3) pode-se atribuir esses resultados ao aumento da resposta imune promovida pela vacina e pela vacina teste. De acordo com Santos e Fonseca (2005) as vacinas contra mastite são uma estratégia de controle interessante uma vez que aumentam a cura espontânea ao aumentar a capacidade de resposta imune do organismo frente ao agente etiológico. Portes et al. (2006), ao estudarem animais vacinados com vacina comercial contra mastite estafilocócica, também observaram uma melhora da resposta imune a qual associaram ao acréscimo dos índices de adesão bacteriana e fagocitose pelos neutrófilos do leite, importantes mecanismos de defesa da glândula mamária.

Ainda na figura 2 é possível perceber que dezessete dias após o final do protocolo vacinal (D45) a porcentagem de animais curados, tanto no G1 quanto no G2, diminuiu em relação à porcentagem de curados no D31. Ao considerar esse achado juntamente com o fato de que no D31 e D45 foram isolados microrganismos que não estavam presentes nas amostras de leite no D0, pode-se suspeitar que provavelmente houve reinfecção da glândula mamária, indicando a necessidade de melhoria do manejo geral e manejo de ordenha a fim de controlar patógenos ambientais e contagiosos envolvidos nos quadros de mastite subclínica. De fato segundo Acosta et al. (2016) os principais fatores de risco associados à mastite bovina são aqueles relacionados ao manejo, como sistema de criação empregado, deficiência na limpeza de instalações e equipamentos de ordenha e não separação de fêmeas doentes.

Em relação à mediana de CCS (Quadro 1) não se observou diferença ($P > 0,05$) dentro de um mesmo tratamento nos diferentes momentos nem entre os diferentes grupos em um mesmo momento. Nos três grupos experimentais, nos momentos D31 e D45, a mediana de CCS foi igual ao D0 apesar de haverem animais sadios (resultado negativo no exame microbiológico) enquanto no D0 todos os animais encontravam-se com mastite subclínica (resultado positivo no exame microbiológico). Molina et al. (2013) também não observou diferença de CCS entre vacas vacinadas com vacina comercial contra *Escherichia coli* e vacas não vacinadas, no entanto Wilson et al. (2007) relata diminuição da CCS de vacas aproximadamente 30 horas após a vacinação com vacina comercial contra *E. coli* e afirma que essa redução é um importante indicador da menor reação inflamatória da glândula mamária dos animais vacinados. Maia et al. (2013) também observou diminuição da CCS no dia da secagem em vacas vacinadas com vacina comercial contra *E. coli*.

Ao se avaliar animais individualmente observou-se existência de vacas com exame microbiológico negativo porém apresentando altas contagens de células somáticas na secreção láctea nos momentos D31 e D45. Isso pode ser explicado pela permeabilidade ainda aumentada dos vasos sanguíneos que irrigam a glândula mamária, permitindo passagem de células somáticas para o leite. No presente estudo foram utilizadas vacas entre três e sete anos de idade e acredita-se que especialmente em vacas mais velhas, devido à menor quantidade de elastina nos vasos sanguíneos, é necessário que transcorra um tempo maior até o reestabelecimento da permeabilidade normal dos vasos sanguíneos após um processo inflamatório. A ideia de que a idade das vacas possa ter influenciado no presente achado corrobora Cunha et al. (2008) que relataram que um maior número de lactações está relacionado à maior contagem de células somáticas no leite.

Quadro 1. Mediana \pm erro padrão da média da contagem de células somáticas nos dias 0 (D0), 31 (D31) e 45 (D45) após a realização dos tratamentos, Cravinhos - SP, 2017.

Tratamento	D0	D31	D45	P^1
Vacina comercial (G1)	579 \pm 207	402 \pm 33	472 \pm 212	P = 0,076
Vacina teste (G2)	644 \pm 151	457 \pm 134	481 \pm 156	P = 0,297
Solução Fisiológica (G3)	755 \pm 136	633 \pm 485	549 \pm 108	P = 0,264
P^2	P = 0,709	P = 0,139	P = 0,988	

¹Comparação entre dias de avaliação dentro do mesmo tratamento pelo teste de Friedman. ²Comparação entre tratamentos dentro do mesmo dia de avaliação pelo teste de Kruskal-Wallis.

Em relação à avaliação dos títulos de IgG não se observou diferença entre os grupos nos diferentes momentos. No D0 os animais vacinados com vacina comercial (G1) apresentavam média de 3,26 (DO), os vacinados com vacina teste (G2) 2,67 (DO) e os que receberam solução fisiológica (G3) 3,74 (DO). Já no D31 os animais do G1 apresentaram média de 3,97 (DO), os do G2 3,95 (DO) e os do G3 4,19 (DO). A variação intraensaio foi em torno de 4%, a variação inter-ensaios em torno de 9,5% e a variação biológica em torno de 26%. Acredita-se que no presente estudo não foi possível observar diferença entre as concentrações de IgG nos grupos tratados e controle devido ao alto coeficiente de variação intragrupos, uma vez que no D0 alguns animais, tanto do grupos tratados quanto do grupo controle, já apresentavam altas concentrações de IgG provavelmente devido a infecções prévias. Outra possibilidade que justificaria o presente resultado é a que a vacina tenha induzido a produção de IgM ou ainda IgA no leite.

A FE da vacina, calculada três dias após o final do protocolo vacinal (D31), foi de 55,6% para o grupo tratado com vacina comercial e 51,1% para o grupo tratado com vacina teste. De acordo Tizard (1998) para que uma vacina seja considerada boa e efetiva deve ter uma FE de pelo menos 80%, no entanto vacinas com menor eficácia tornam-se aceitáveis se não houver nenhuma alternativa melhor.

Alberton et al. (2001) observou FE de aproximadamente 60% ao estudar uma vacina contra mastite estafilocócica não comercial, resultado também abaixo do considerado ideal.

CONCLUSÃO

A vacina comercial e a vacina teste não foram responsáveis por diminuir a CCS nos animais tratados e não se observou diferença em relação aos títulos de IgG nos animais tratados quando comparado aos animais do grupo controle. Apesar disso conclui-se que os animais tratados, tanto com a vacina comercial quanto com vacina teste, apresentaram uma maior porcentagem de cura em relação aos animais não tratados, sendo assim a vacinação uma alternativa no controle das mastites subclínicas.

REFERÊNCIAS

- Alberton L.R., Werner P.R., Cunha L., Warth J.F., Faraco A.P.P.A. & Ribas N.P. 2001. Vacinação com bacterina de *Staphylococcus aureus* no controle da mastite em vacas em lactação. Arq. Ciê. Vet. Zool. 4(1): 31-40.
- Acosta A.C., Silva L.B.G., Medeiros E.S., Pinheiro-Júnior J.W. & Mota, R.A. 2016. Mastites em ruminantes no Brasil. Pesq. Vet. Bras. 36(7): 565-573.
- Concha C. 2004. Perspectivas da estimulação da resposta imune da glândula mamária bovina. In: Durr J.W., Carvalho M. P. & Santos M. V. O compromisso com a qualidade do leite no Brasil. Passo Fundo: UPF. p. 105-129.
- Cunha R.P.L., Gentilini M.B., Ferreira, P.M., Facury-Filho E.J., Carvalho A.U. & Molina L.R. 2008. Arq. Bras. Med Vet Zoo. 60(1): 19-24.
- Huijps K., Lam T.J. & Hogeveen H. 2008. Costs of Mastitis: Facts and Perception. J. Dairy Res. 75: 113-120.
- IBGE, 2015. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção de Leite – 2015. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia>. Acesso em 15 mar. 2017.
- Maia P.V., Molina L.R., Facury Filho E.J., Gonçalves R.L., Moreira L.P.V. & Carvalho A.U. 2013. Vacinação com *Escherichia coli* J5 no pré-parto e ocorrência de mastite e produção de leite de vacas mestiças leiteiras. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 65(5): 1367-1375.
- Mello P.L., Agostinis R.O., Barzon E.M., Colombo R.B., Silva A.V. & Martins L.A. 2012. Prevalência da mastite subclínica e associação dos agentes etiológicos com a contagem de células somáticas de vacas leiteiras da região Sudoeste do Paraná. Vet. e Zootec. 19(4): 513-521.
- Milkpoint 2015. IBGE: produção de leite cresceu 2,7% em 2014; Sul tornou-se a maior região produtora. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/ibge-producao-de-leite-cresceu-27-em-2014-sul-tornouse-a-maior-regiao-produtora-97326n.aspx>. Acesso em 15 mar. 2017.
- Molina L.R., Gentilini M.B., Carvalho A.U., Facury Filho E.J., Moreira G.H.F.A., Moreira L.P.V. & Gonçalves R.L. 2013. Utilização da vacina *Escherichia coli* J5 na imunização de vacas leiteiras contra mastites causadas por *E. coli*. Pesq. Vet. Bras. 33(3): 291-298.
- Portes V.M., Wolff C., Vaz A.K. & Dick W. 2006. Efeito da vacinação contra a Mastite Estafilocócica sobre a associação de *Staphylococcus* sp. a células do leite. Acta Scientiae Veterinariae. 34(2): 137-141.
- Prestes D.S., Filappi A. & Cecim M. 2002. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam – uma revisão. Revista da FZVA. 9(1): 118-132
- Radostits O.M., Gay C.C., Blood, D.C. & Hinchcliff, K.W. 2002. Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 9th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1737 p.
- Ribeiro M.E.R., Petrine L.A., Aita M.F., Balbinotti, M., Stumpf J.R.W., Gomes J.F., Schramm R.C., Martins P.R. & Barbosa R.S. 2003. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio grande do Sul. Revista Brasileira de Agrociência. 9(3): 287-290.
- Santo M.V. & Fonseca L.F.L. 2005. Importância do tratamento no controle d mastite bovina. In: Coleção Gado de Leite. Quiron:Campinas. p. 20.
- Tizard I.R. 1998. 5th ed. Imunologia veterinária. São Paulo: Roca. 545 p.
- Wilson D.J., Mallard B.A., Burton J.L., Schukken Y.H. & Grohn Y.T. 2007. Milk and serum J5-specific antibody responses, milk production change, and clinical effects following intramammary *Escherichia coli* challenge for J5 vaccine and control cows. Clin Vaccin. Immunol. 14: 693-699.