

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFICÁCIA DO CETOPROFENO EM PROGRAMAS DE  
TRATAMENTO SELETIVO DE CASOS NATURAIS  
DE MASTITE CLÍNICA EM VACAS LEITEIRAS

GIULIA SOARES LATOSINSKI

Botucatu – SP

Abril, 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFICÁCIA DO CETOPROFENO EM PROGRAMAS  
DE TRATAMENTO SELETIVO DE CASOS  
NATURAIS DE MASTITE CLÍNICA EM VACAS  
LEITEIRAS

GIULIA SOARES LATOSINSKI

Dissertação apresentada junto ao Programa  
de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
para obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Ass. Dr. José Carlos de Figueiredo Pantoja

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Latosinski, Giulia Soares.

Eficácia do cetoprofeno em programas de tratamento seletivo de casos naturais de mastite clínica em vacas leiteiras / Giulia Soares Latosinski. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Carlos de Figueiredo Pantoja  
Capes: 50502000

1. Bovino - Doenças. 2. Mastite bovina. 3. Ensaaios clínicos. 4. Anti-inflamatórios não esteroides.

Palavras-chave: Anti-inflamatório não esteroideal; Cultura na fazenda; Cultura negativa; Ensaio clínico; Mastite bovina.

Nome do Autor: Giulia Soares Latosinski

Título: EFICÁCIA DO CETOPROFENO EM PROGRAMAS DE TRATAMENTO SELETIVO DE CASOS NATURAIS DE MASTITE CLÍNICA EM VACAS LEITEIRAS

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof. Ass. Dr. José Carlos de Figueiredo Pantoja  
Presidente e Orientador  
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública  
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro  
Membro  
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública  
FMVZ – UNESP – Botucatu

Dr. Alexandre Henrily de Souza  
Membro  
Gerente técnico de ruminantes  
CEVA Saúde Animal

29 de abril de 2019

**DEDICATÓRIA**

*Dedico esta dissertação aos meus pais Mirta e Julio pelo apoio e incentivo durante a  
realização do mestrado.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Mirta e Julio, por me ensinarem o significado mais puro e sincero do amor. Por entenderem minha ausência e sempre me incentivarem a seguir em frente independente das dificuldades encontradas. Por me ajudarem a enfrentar meus medos e sempre conseguirem me mostrar o lado bom de todas as situações.

À minha irmã Paula, minha alma gêmea, por toda amizade e amor. Por todo universo que criamos, o qual ajudou a amenizar a saudade.

À minha avó Maria, por não nos deixar, pela preocupação constante com meu bem-estar e por sempre estar disposta a me ajudar.

Ao meu orientador Prof. José Pantoja, por toda dedicação, confiança, paciência, ensinamentos e oportunidades. Pelos dois anos de maior crescimento intelectual, profissional e amadurecimento pessoal que já tive em minha vida.

Aos meus colegas de pós-graduação, Fábio, Ananda e Tamiris, pelo convívio diário, pelo companheirismo e pelos momentos de descontração.

Aos amigos que Botucatu me deu ao longo dos últimos anos, sempre lembrarei de todos os momentos com muito carinho.

À instituição FMVZ-UNESP Botucatu pela oportunidade de crescimento profissional.

E aos proprietários, funcionários e veterinários, em especial a Maíra Junqueira e Morivaldo Silva, que concordaram voluntariamente em participar do projeto que originou esta dissertação de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão de bolsa nos meus primeiros meses de mestrado, e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processo 2017/20576-5, pela concessão de bolsa nos meses restantes.

## LISTA DE TABELAS

### Revisão de literatura

|                                                                                                             |   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| <b>Tabela 1.</b> Estudos que avaliaram a prevalência de patógenos causadores de mastite clínica bovina..... | 8 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|

|                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 2.</b> Estudos nos quais o objetivo primário foi a comparação de técnicas de biologia molecular com a cultura microbiológica tradicional para o isolamento de patógenos causadores de mastite..... | 10 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 3.</b> Resumo dos estudos que utilizaram anti-inflamatórios não esteroidais em mastite clínica..... | 24 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### Capítulo 2

|                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Características dos rebanhos bovinos leiteiros participantes do estudo..... | 54 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 2.</b> Características dos animais, quartos e casos de mastite clínica após alocação randomizada nos grupos experimentais..... | 55 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 3.</b> Estatísticas descritivas dos desfechos estudados, por grupo experimental..... | 56 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 4.</b> Análise multivariada para comparação dos desfechos estudados entre os grupos experimentais..... | 57 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão de literatura

**Figura 1.** Distribuição de patógenos identificados por biologia molecular em amostras de leite negativas pela cultura microbiológica.....10

**Figura 2.** Sistemas de cultivo microbiológico “Minnesota Easy Culture System”, produzidos pela Universidade de Minnesota, EUA. Fonte: <http://dairyknow.umn.edu/topics/milk-quality/minnesota-easy-culture-system-user-s-guide/>.....13

**Figura 3.** Sistema de cultivo microbiológico “Accumast” (FERA Animal Health LCC, Ithaca, NY). A) Placa sem crescimento bacteriano; B) *Staphylococcus aureus*, C) *Staphylococcus epidermidis*; D) *Staphylococcus chromogenes*; E) *Streptococcus agalactiae*; F) *Streptococcus dysgalactiae*; G) *Streptococcus uberis*; H) *Enterococcus faecalis*; I) *Escherichia coli*; J) *Klebsiella oxytoca* e K) *Pseudomonas aeruginosa*. Fonte: Ganda et al., 2016.....14

### Capítulo 2

**Figura 1.** Fluxograma do conjunto de dados utilizado para análise. Cetoprofeno: tratado com uma injeção intramuscular de cetoprofeno na dosagem de 3 mg/kg de peso vivo; controle: não recebeu tratamento. Cura clínica: regressão dos sinais clínicos em até 7 dias de observação. Recidiva de MC: ocorrência de cura clínica seguida de observação de sinais clínicos de mastite até 14 dias após a detecção do caso incluído no estudo. Recorrência de MC: ocorrência de cura clínica e posterior observação de sinais clínicos entre 15 e 90 dias após a detecção do caso incluído no estudo. Nova infecção intramamária (IMM) em D14: quartos com cultura negativa em D0 e cultura positiva em D14. Nova IMM em D21: quartos com cultura negativa em D0 e cultura positiva em D21. CCS em D14: CCS (células/mL) das amostras de leite coletadas em D14. CCS em D21: CCS (células/mL) das amostras de leite coletadas em D21.....59



**Figura 2.** Curva de sobrevivência representando o tempo de cura clínica (retorno do leite ao aspecto normal) em até 7 dias após a ocorrência de mastite clínica, nos dois grupos experimentais.....60

**Figura 3** Curva de sobrevivência representando o tempo de recidiva no mesmo quarto mamário até 14 dias após o evento de mastite clínica, nos dois grupos experimentais.....61

**Figura 4.** Curva de sobrevivência representando o tempo de recorrência no mesmo quarto mamário até 90 dias após o evento de mastite clínica, nos dois grupos experimentais.....62

**Figura 5.** CCS (média geométrica e intervalo de confiança 95%) no leite, 14 e 21 dias após o caso de mastite clínica.....63

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

**AINES** = Anti-inflamatórios não esteroidais

**CCS** = Contagem de células somáticas

**IIM** = Infecção intramamária

**IM** = Intramuscular

**IMM** = Intramamária

**LPS** = Lipopolissacarídeo

**MC** = Mastite clínica

**MSC** = Mastite subclínica

**PCR** = Reação em cadeia da polimerase

**qPCR** = PCR em tempo real

**SCF** = Sistema de cultura na fazenda

## SUMÁRIO

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| CAPÍTULO 1.....                                                           | 1  |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                       | 1  |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA.....                                             | 3  |
| CAPÍTULO 2 – Trabalho científico .....                                    | 28 |
| RESUMO.....                                                               | 30 |
| CAPÍTULO 3.....                                                           | 66 |
| DISCUSSÃO GERAL .....                                                     | 66 |
| CONCLUSÃO GERAL.....                                                      | 66 |
| REFERÊNCIAS.....                                                          | 67 |
| ANEXO I .....                                                             | 76 |
| ANEXO II – Normas de publicação da revista Journal of Dairy Science ..... | 77 |

LATOSINSKI, G. L. **Eficácia do cetoprofeno em programas de tratamento seletivo de casos naturais de mastite clínica em vacas leiteiras.** Botucatu, 2019. 77p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## RESUMO

Objetivou-se avaliar a eficácia do cetoprofeno em casos de mastite clínica (MC) com ausência de isolamento microbiológico nas amostras de leite cultivadas no sistema de cultura na fazenda (SCF). Vacas de três rebanhos foram alocadas aleatoriamente em dois grupos experimentais. Grupo cetoprofeno (N = 65 quartos) foi tratado com cetoprofeno (3 mg/kg, via intramuscular, dose única) e grupo controle (N = 64 quartos) não recebeu terapia. Amostras de leite foram coletadas no momento do diagnóstico da MC e 14 (D14) e 21 (D21) dias após o caso. Os desfechos avaliados foram risco de cura clínica, recidiva e recorrência de MC, risco de nova infecção intramamária (IIM) em D14 e D21 e contagem de células somáticas em D14 e D21. A proporção de cura clínica, recidiva e recorrência de MC nos grupos cetoprofeno e controle foi de 83,08% e 85,94%, 18,52% e 18,18% e 16,67% e 16,36%, respectivamente. O risco relativo de todos os desfechos mencionados não foi diferente entre os grupos experimentais. Em ambas as análises as chances de nova IIM não foram diferentes entre os grupos experimentais. Não houve diferença na CCS entre os grupos entre os dias de amostragem ou grupos experimentais. Os resultados sugerem que o uso de cetoprofeno em casos de MC com cultura negativa não foi associado ao risco de cura clínica, recidiva e recorrência de MC, novas IIM e CCS.

**Palavras-chave:** mastite bovina, cultura na fazenda, anti-inflamatório não esteroide, ensaio clínico, cultura negativa.

LATOSINSKI, G. L. **Efficacy of ketoprofen in programs for selective treatment of natural clinical mastitis cases.** Botucatu, 2019. 77p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **ABSTRACT**

The objective of this study was to evaluate the efficacy of ketoprofen in culture-negative clinical mastitis (CM) cases. Cows from three commercial herds were randomly allocated into two experimental groups. The ketoprofen group (N = 65 quarters) received a single intramuscular injection of 3 mg/kg of ketoprofen. The control group (N = 64 quarters). Milk samples were collected at the time of CM diagnosis and at 14 (D14) and 21 (D21) days after the case. The outcomes evaluated were clinical cure, relapse and recurrence of CM, risk of new intramammary infection (IIM) at D14 and D21, and somatic cell count at D14 and D21. The proportion of clinical cure, relapse and recurrence of CM in the ketoprofen and control groups was 83.08%, 85.94%, 18.52% and 18,18%, 16,67% and 16,36%, respectively. The relative risk of all mentioned outcomes was not different between the experimental groups. For both analyses, the odds of new IIM were not different between the experimental groups. Mean SCC was not different between sampling days or experimental groups. Results suggest that the use of ketoprofen for culture-negative CM was not associated with the risk of clinical cure, relapse and recurrence of CM, new IIM and SCC.

**Keywords:** clinical mastitis, on-farm culture, non-steroidal anti-inflammatory, clinical trial.

## **CAPÍTULO 1**

### **1. INTRODUÇÃO**

A mastite é um dos principais entraves da pecuária leiteira para a produção de leite de alta qualidade. É a doença que causa os maiores prejuízos econômicos no mundo todo (HALASA et al., 2007) e a principal razão para o uso de antimicrobianos em rebanhos leiteiros (POL; RUEGG, 2007).

Atualmente existe grande preocupação da sociedade com o bem-estar animal e com o uso em larga escala de antimicrobianos (CARDOSO et al., 2016). Dessa forma, visando a sustentabilidade da pecuária leiteira, práticas modernas que reduzam o uso indiscriminado de antibióticos se fazem cada vez mais necessárias.

É amplamente descrito na literatura que entre 25 e 50% dos casos de mastite clínica (MC) não apresentam crescimento bacteriano na cultura microbiológica do leite (MCDOUGALL et al., 2007; CORTINHAS et al., 2016) e, consequentemente, não necessitam de tratamento com antimicrobianos. Nesse contexto, programas que visem a rápida identificação etiológica dos agentes causadores de MC, permitindo o tratamento seletivo dos casos que realmente se beneficiem com o uso de antimicrobianos, estão em evidência.

O sistema de cultura na fazenda (SCF) é uma estratégia de tratamento seletivo de MC com potencial de redução no uso de antimicrobianos (LAGO et al., 2011a; 2011b; VASQUEZ et al., 2017), o que poderia resultar em benefícios tanto para os produtores quando para os animais. O sistema consiste em realizar a cultura do leite dos casos de MC na própria fazenda e, após 18 a 24 horas, tomar decisão de tratamento com base nos resultados.

Resultados de um estudo de grande porte indicaram que o SCF resultou em economia de 50% no uso de antimicrobianos nas propriedades participantes (LAGO et al., 2011a). Ademais, não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos controle (todos os casos de MC foram tratados com antimicrobianos no momento da detecção do caso) e grupo submetido ao SCF (casos de MC foram tratados de acordo com o resultado da cultura na fazenda) nos desfechos estudados a curto e longo prazo, tais como as taxas de cura clínica e bacteriológica, risco de casos recorrentes, risco de falha no tratamento, risco de descarte e morte, produção de leite e contagem de células somáticas (CCS) (LAGO et al., 2011a, 2011b).

Poucos estudos foram realizados para avaliar a eficácia dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) no tratamento de MC. Em condições experimentais foi demonstrado que podem contribuir para a melhora do quadro inflamatório (YEISER et al., 2012; FITZPATRICK et al., 2013). Ademais, foi reportado em ensaio clínico que o uso de AINES (meloxicam), associado a os antimicrobianos, pode ter benefício na cura bacteriológica da MC, na diminuição de CCS e taxa de descarte do rebanho (MCDOUGALL et al., 2009, 2016).

Uma oportunidade que ainda não foi explorada cientificamente e que poderia trazer benefícios para o SCF seria a utilização de AINES em casos que não resultam em crescimento bacteriano. O uso dos AINES em tais casos de MC poderia proporcionar benefícios econômicos aos produtores leiteiros e melhoria do bem-estar animal, por meio da redução dos sinais clínicos e tempo de descarte do leite, aumento da taxa de cura microbiológica, redução do risco de recidiva e recorrência e redução dos sinais inflamatórios.

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia do cetoprofeno no tratamento seletivo de casos naturais de MC leve ou moderada, em amostras caracterizadas pela ausência de isolamento de patógenos no SCF. As hipóteses específicas foram: 1) O tratamento intramuscular (IM) com cetoprofeno de casos de MC com cultura negativa poderia resultar em redução de 1 dia no tempo de retorno do leite ao aspecto normal, quando comparado a um grupo não tratado; 2) O tratamento IM de MC com cetoprofeno poderia resultar em menores taxas de recidiva e recorrência de MC e retorno mais rápido da CCS em nível basal.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Mastite clínica**

#### **2.1.1. Impacto econômico e em saúde pública**

A mastite é a doença mais prevalente e onerosa em rebanhos leiteiros no mundo todo, gerando grande impacto econômico para os produtores e indústria leiteira (HALASA et al., 2007). Os principais prejuízos causados pela doença são devidos à redução na produção de leite (SEEGERS et al., 2003), descarte do leite com resíduos de antimicrobianos (HALASA et al., 2007), perda de qualidade (MA et al., 2000), descarte precoce (HEIKKILA et al., 2012), custo com medicamentos, custo com serviços veterinários, riscos de outras doenças e risco de transmissão de mastite aos animais saudáveis (HALASA et al., 2007).

Estima-se que o custo de um caso de mastite clínica (MC) varie entre US\$ 244 a US\$ 444 a depender do estágio de lactação, da CCS no tanque, do preço do leite e de outros fatores (HUIJPS et al., 2008; ROLLIN et al., 2015). Rollin et al. (2015) estimaram que 71% do total dos custos relacionados à MC são devidos a gastos indiretos associados a diminuição na produção de leite (28%), descartes precoces (41%) e diminuição no desempenho reprodutivo (2%). Os custos diretos, muitas vezes mais valorizados pelos produtores, representam apenas 29% do total dos custos. Medicamentos e descarte de leite, os quais são custos imediatos gastos pelos produtores, representam somente 8% e 6% do total dos custos, respectivamente (ROLLIN et al., 2015).

O tratamento de MC é a principal razão para o uso de antimicrobianos em fazendas leiteiras (POL; RUEGG, 2007; REDDING et al, 2019). Em estudo conduzido por Pol e Ruegg (2007), cujo objetivo foi quantificar o uso de antimicrobianos em fazendas leiteiras convencionais e orgânicas no estado de Wisconsin, o tratamento de MC representou 55% do uso total de antimicrobianos destinados ao tratamento de todas as doenças.

Ademais, outra ação que contribui para o aumento do uso de antimicrobianos em rebanhos leiteiros é a terapia da vaca seca, estratégia utilizada no controle de mastite que faz parte das recomendações do programa de 10 pontos de controle de mastite do NMC (NMC, 2015). A terapia da vaca seca tem o objetivo de curar infecções intramamárias (IIM) existentes e prevenir novas IIM no início do período seco, sendo amplamente utilizada pelos produtores leiteiros. Estima-se que, nos Estados Unidos, 81,7% das vacas sejam submetidas a tal terapia (USDA-NAHMS, 2008). Pol e Ruegg (2007) relataram



que a terapia da vaca seca representou 31% do uso total de antimicrobianos em rebanhos leiteiros.

O uso de antibióticos em larga escala em rebanhos leiteiros gera preocupações devido ao risco de contaminação do leite com resíduos de fármacos e a seleção de organismos resistentes a inúmeros antimicrobianos utilizados em medicina humana (OLIVER; MURINDA, 2012). Dessa forma, há pressão da sociedade para o desenvolvimento de programas que visem o uso racional de fármacos em propriedades rurais.

Nos Estados Unidos somente duas classes de antimicrobianos ( $\beta$ -lactâmicos e lincosamidas) são permitidas pela US Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de mastite. No Brasil não há legislação bem definida sobre o uso de antimicrobianos para tratamento de mastite, sendo permitida a comercialização de muitos princípios ativos e combinações medicamentosas. Inclusive encontram-se no mercado nacional antimastíticos a base de princípios ativos listados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como de importância crítica para medicina humana (OMS, 2017), tais como cefalosporinas de terceira e quarta gerações, macrolídeos e fluorquinolonas.

Nos últimos anos, muitos estudos foram realizados para avaliar a resistência dos antimicrobianos aos patógenos causadores de mastite (ERSKINE et al., 2002; PITKALA et al., 2004; BOTREL et al., 2010). Nestes estudos longitudinais não foram observados aumentos na percentagem de resistência aos antimicrobianos estudados entre os principais organismos causadores de mastite. No entanto, é importante ressaltar que a maioria dos estudos sobre o tema foram realizados em regiões leiteiras desenvolvidas, onde as estratégias de controle de mastite são bem estabelecidas e existe maior controle no uso de antimicrobianos.

Além disso, o risco de contaminação do leite com resíduos de antimicrobianos é uma questão importante tanto no aspecto de saúde pública quanto no econômico, devido aos prejuízos gerados aos produtores leiteiros. Em saúde pública os principais agravos estão relacionados a possíveis reações alérgicas e seleção de organismos resistentes a antimicrobianos (ALLISON, 1985).

Em estudo conduzido em Wisconsin por Ruegg e Tabone (2000), com objetivo de determinar a relação entre a CCS do leite do tanque e o risco de contaminação do leite por resíduos de antibióticos, foi observado que rebanhos de alta CCS ( $> 700.000$  células/mL) tiveram maior risco (razão das chances = 7,1) de contaminação do leite por resíduos de antimicrobianos do que rebanhos de baixa CCS ( $< 250.000$  células/mL). Esses

resultados sugerem que rebanhos com alta CCS no leite do tanque possuem maior prevalência de mastite e, conseqüentemente, maior frequência de tratamento de animais com antimicrobianos, aumentando o risco de contaminação do leite (RUEGG; TABONE, 2000).

Desta forma, é necessário o uso prudente e racional de antimicrobianos visando a redução de tratamentos excessivos e inadequados. Em um cenário moderno caracterizado pelo aumento da pressão da sociedade para a diminuição do uso de antimicrobianos, o desenvolvimento de novos protocolos que resultem em maior eficácia terapêutica são necessários para a sustentabilidade a longo prazo da pecuária leiteira.

### **2.1.2. Características gerais da mastite clínica e etiologia dos casos**

A mastite é uma enfermidade complexa e multifatorial que pode ter apresentação tanto clínica quanto subclínica. Na forma subclínica não há alterações visíveis no leite ou na glândula mamária, embora exista IIM causando diminuição na produção e na qualidade do leite (HALASA et al., 2007).

A forma clínica da doença caracteriza-se por alterações na aparência do leite (cor, viscosidade, consistência) que podem ser acompanhadas ou não de sinais inflamatórios no quarto mamário (rubor, tumor, calor, edema ou dor). Classifica-se a MC em uma escala de 3 graus (grau 1 ou leve, grau 2 ou moderado e grau 3 ou grave). Casos leves são definidos quando há somente alterações no leite. Casos moderados são definidos quando há alterações no leite acompanhados de alterações no quarto mamário e casos graves são definidos quando há todos os sinais supracitados além de alterações sistêmicas (WENZ et al., 2001). A maioria dos casos de MC são casos leves (50 – 70%) ou moderados (20 – 40%) (NASH et al, 2002; RODRIGUES; RUEGG, 2005; PINZÓN; RUEGG, 2011).

O diagnóstico da MC é realizado por meio do exame visual dos primeiros jatos e deve ser realizado pelos técnicos de ordenha em todas as ordenhas de todas as vacas. Qualquer alteração observada no leite ou no quarto mamário deve ser considerada como MC. Oliveira et al. (2015) relataram que a incidência média anual de MC em rebanhos leiteiros do sudeste do Brasil foi 27 e 31% em novilhas e vacas, respectivamente. Em regiões leiteiras desenvolvidas a incidência média anual de MC foi reportada variando entre 23,7 e 33,4% (SANTMAN-BERENDS et al., 2015; LEVISON et al., 2016).

Ao longo dos anos muitos estudos foram realizados demonstrando a prevalência de patógenos causadores de MC (Tabela 1). Geralmente os principais micro-organismos isolados de casos de MC são coliformes (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter*

spp.), estreptococos ambientais (*Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*), *Enterococcus* spp. e em menor frequência *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulase-negativa, *Streptococcus agalactiae* e outros (*Prototheca* spp., levedura, *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Trueperella pyogenes*, *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Pasteurella* spp.).

Existe diferença na distribuição dos patógenos causadores de mastite entre as regiões leiteiras. No Brasil podemos observar prevalência mais elevada de patógenos contagiosos (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*) causando MC (Tabela 1). No país ainda há poucos programas públicos ou privados de incentivo a melhoria da qualidade do leite produzido. Com isso, patógenos erradicados ou controlados em regiões leiteiras desenvolvidas, tais como *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus*, apresentam prevalência elevada. Cruppe et al. (2008) relataram prevalência de 16,3% de *Streptococcus agalactiae* em 2.671 amostras provenientes de quatro estados brasileiros (Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e São Paulo).

Em regiões leiteiras desenvolvidas os coliformes e os estreptococos ambientais são os patógenos mais comumente isolados de casos de MC (Tabela 1). Nestas regiões existem há décadas programas de controle de mastite que resultaram em mudanças na distribuição de patógenos causadores de MC, tornando os patógenos ambientais mais prevalentes (RUEGG, 2012).

### **2.1.3. Tempo de retorno do leite até o aspecto normal**

Conforme previamente definido, casos de MC geram alterações no aspecto normal do leite, que podem ou não ser acompanhados de alterações na glândula mamária. A cura clínica é definida como o período de regressão dessas alterações, até a volta do leite ao aspecto normal. O tempo até a cura clínica é em média de 4 dias (LAGO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013) e depende do patógeno envolvido no caso, do tratamento realizado e de aspectos relacionados à vaca.

Oliveira et al. (2013), ao estudarem práticas utilizadas para tratamento de MC em 51 rebanhos leiteiros do estado de Wisconsin, observaram que as 278 vacas tratadas com ceftiofur pela via intramamária tiveram, em média, 4,5 dias (2 - 11 dias) e 4,4 dias (1 - 13 dias) até a cura clínica de casos leves ou moderados, respectivamente. As 51 vacas tratadas com cefapirina pela via intramamária tiveram em média 5,2 dias (2 - 9 dias) e 4,5 dias (3 - 6 dias) até a cura clínica de casos leves e moderados, respectivamente. O leite de vacas que tiveram casos de MC cujos resultados da cultura do leite foram negativos (N = 196) levou, em média, 4,3 dias para retornar ao aspecto normal.

Em estudo conduzido por Lago et al. (2011), o tempo médio até a cura clínica das vacas pertencentes ao grupo que utilizou o SCF para tomada de decisão de tratamento dos casos de MC foi de  $3,2 \pm 1,7$  dias ( $N = 163$ ). Nesse grupo, somente quartos com IIM causada por bactérias Gram-positivas, ou por infecção mista (Gram-positivas e Gram-negativas), foram tratados com antimicrobiano. O tempo médio até a cura clínica foi de  $2,7 \pm 1,5$  dias ( $N = 196$ ) e  $3,0 \pm 1,7$  dias ( $N = 51$ ) para os animais alocados no grupo controle (todos os casos de MC foram tratados com antimicrobianos) e no grupo submetido ao SCF e cuja cultura do leite foi negativa, respectivamente (LAGO et al, 2011).

**TABELA 1.** Estudos que avaliaram a prevalência de patógenos causadores de mastite clínica bovina\*

| <b>Autores</b>              | <b>Ano</b> | <b>País</b>      | <b>Casos<br/>(N rebanhos)</b> | <b><i>S.</i><br/><i>agalactiae</i><sup>1</sup></b> | <b><i>S. aureus</i><sup>1</sup></b> | <b>SCN<sup>1</sup></b> | <b><i>Streptococcus</i><br/><i>ambientais</i><sup>1</sup></b> | <b><i>Escherichia</i><br/><i>coli</i><sup>1</sup></b> | <b><i>Klebsiella</i><sup>1</sup></b> | <b>Outros<sup>1</sup></b> | <b>Sem<br/>crescimento<sup>1</sup></b> |
|-----------------------------|------------|------------------|-------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------|------------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------|
| Lago et al.                 | 2011       | EUA e<br>Canadá  | 417 (8)                       | -                                                  | 30 (7,19)                           | 38 (9,11)              | 57 (13,66)                                                    | 78 (18,70)                                            | 23 (5,5)                             | 46<br>(11,03)             | 145 (34,77)                            |
| Oliveira et<br>al.          | 2013       | EUA              | 693 (50)                      | -                                                  | 21 (3,03)                           | 45 (6,49)              | 110 (15,87)                                                   | 167 (24,09)                                           | 51 (7,35)                            | 97<br>(13,99)             | 202 (29,14)                            |
| McDougall<br>et al.         | 2007       | Nova<br>Zelândia | 1359 (28)                     | -                                                  | 258 (18,98)                         | 86 (6,32)              | 594 (43,70)                                                   | -                                                     | -                                    | 56<br>(4,12)              | 365 (26,85)                            |
| Olde<br>Riekerink<br>et al. | 2008       | Canadá           | 2850 (106)                    | 4 (0,14)                                           | 312 (10,94)                         | 158 (5,54)             | 443 (15,54)                                                   | 254 (8,91)                                            | 131 (4,59)                           | 218<br>(7,64)             | 1330 (46,66)                           |
| Cortinhas<br>et al.         | 2016       | Brasil           | 264 (11)                      | 24 (9,75)                                          | 20 (7,57)                           | 20 (7,57)              | 33 (12,50)                                                    | 11 (4,16)                                             | 12 (4,54)                            | 12<br>(9,09)              | 132 (50,00)                            |
| Oliveira et<br>al.          | 2015       | Brasil           | 2763 (8)                      | 120 (4,34)                                         | 53 (1,91)                           | 253 (9,15)             | 360 (13,02)                                                   | 547 (19,79) <sup>2</sup>                              |                                      | 227<br>(8,21)             | 1203 (43,53)                           |
| Tomazi et<br>al.            | 2018       | Brasil           | 236 (31)                      | 9 (3,81)                                           | 23 (9,74)                           | 33 (13,98)             | 41 (17,37)                                                    | 21 (8,89)                                             | 2 (0,8)                              | 36<br>(14,83)             | 71 (30,08)                             |

0 <sup>1</sup> N (%); <sup>2</sup> Estudo reportou somente prevalência de coliformes em geral; <sup>2</sup> Amotras contaminadas foram excluídas.

#### 2.1.4. Casos de mastite clínica com cultura negativa

A proporção de casos de MC sem isolamento de patógenos na cultura do leite tem variado entre 20 a 50% (Tabela 1). A maioria das culturas negativas são associadas a casos de gravidade leve (grau 1). Oliveira et al. (2013) reportaram que, de 164 casos de MC com cultura negativa, 57,9% foram leves, 33,6% foram moderados e apenas 8,5% foram severos.

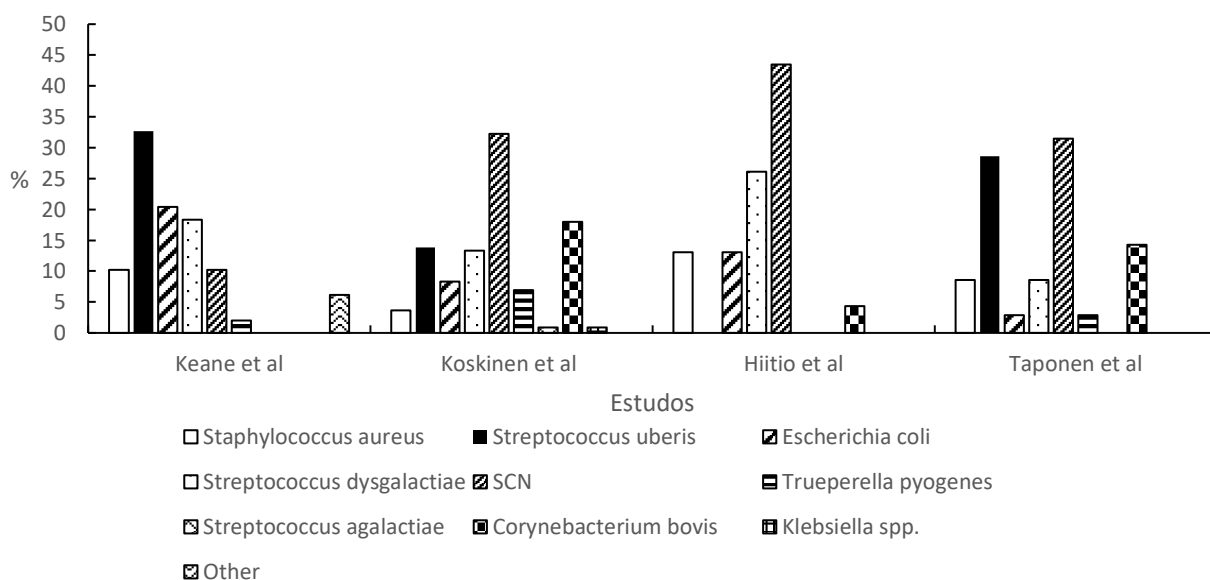
São variadas as razões para o não crescimento microbiológico no leite de quartos acometidos por MC. Nos últimos anos, alguns estudos foram realizados com o objetivo de esclarecer a alta prevalência de culturas negativas resultantes de casos de MC (Tabela 2). Em suma, estes estudos tiveram como principal objetivo comparar os resultados obtidos na cultura microbiológica tradicional a técnicas modernas de biologia molecular (Tabela 2).

Hiitio et al. (2015), ao compararem a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (qPCR) com a cultura microbiológica tradicional em amostras de leite de casos de MC e subclínica (MSC), observaram que 46,5% (20/43) das amostras de leite negativas na cultura (43/294) foram positivas na qPCR. Os patógenos mais identificados foram *Staphylococcus spp.*, seguidos de *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Corynebacterium bovis*. Em contrapartida, 54% (27/50) das amostras negativas no qPCR (50/294) foram positivas na cultura microbiológica. Resultados similares foram reportados por Taponen et al. (2009) na Finlândia, no qual foi observado que 43% (34/79) das amostras negativas na cultura foram positivas na qPCR. Koskinen et al. (2010) e Keane et al. (2013) também encontraram alta proporção de amostras de leite negativas na cultura, porém positivas na qPCR (76 e 79%, respectivamente).

Dos estudos citados na Tabela 2, os patógenos mais comumente identificados pela técnica de qPCR em amostras de leite negativas na cultura microbiana foram estafilococos coagulase-negativa, *Streptococcus uberis*, *Corynebacterium bovis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Figura 1).

**TABELA 2.** Estudos nos quais o objetivo primário foi a comparação de técnicas de biologia molecular com a cultura microbiológica tradicional para o isolamento de patógenos causadores de mastite.

| Estudo          | Ano  | País                | Casos                                               | Cultura Negativa (%) | PCR Negativa (%) | Cultura - / PCR + (%) |
|-----------------|------|---------------------|-----------------------------------------------------|----------------------|------------------|-----------------------|
| Taponen et al.  | 2009 | Finlândia           | 79 amostras de mastite clínica negativas na cultura | -                    | -                | 43,00 (34/79)         |
| Koskinen et al. | 2010 | Finlândia e Holanda | 780 amostras de mastite clínica                     | 23,07 (180/780)      | 11,00 (89/780)   | 76,00 (136/180)       |
| Keane et al.    | 2013 | Irlanda             | 141 amostras de mastite clínica                     | 30,00 (43/141)       | 8,00 (11/141)    | 79,06 (34/43)         |
| Hiitio et al.   | 2015 | Finlândia           | 294 amostras de mastite clínica e subclínica        | 14,62 (43/294)       | 17,00 (50/294)   | 46,50 (20/43)         |



**FIGURA 1.** Distribuição de patógenos identificados por técnicas de biologia molecular em amostras de leite negativas pela cultura microbiológica.

O teste diagnóstico referência utilizado para identificação de patógenos no leite é o cultivo microbiológico (NMC, 1999). Em suma, o exame consiste no cultivo de 0,01 mL de leite em meios de cultura seletivos e não seletivos (por exemplo, ágar MacConkey e

ágar sangue), seguido de identificação do micro-organismo com base na morfologia das colônias, coloração de Gram e testes bioquímicos complementares (NMC, 1999).

O cultivo microbiológico, como qualquer outro teste diagnóstico, apresenta limitações. O limiar mínimo de detecção de patógenos da técnica é de 100 UFC/mL de leite quando 10 µL de leite são inoculados nas placas de cultura. Com isso, amostras de leite que tiverem uma concentração de micro-organismos menor do que o limite mínimo de detecção não irão resultar em crescimento do patógeno e, conseqüentemente, serão consideradas negativas. Ademais, existem patógenos que não são isolados nos meios de cultura rotineiramente utilizados para o cultivo microbiológico, como *Mycoplasma spp.*, que apresenta crescimento fastidioso e necessita de meios de cultura e condições de incubação especiais para isolamento.

O leite mastítico apresenta alta concentração de substâncias antibacterianas que, atuando em conjunto com os leucócitos do leite no processo de combate a infecção, poderiam comprometer a viabilidade das bactérias presentes no leite (TAPONEN et al., 2009). O cultivo microbiológico tem somente a capacidade de detectar células viáveis no leite. Já métodos baseados em biologia molecular podem amplificar o DNA alvo de micro-organismos viáveis e não viáveis, ou seja, bactérias mortas também podem ser identificadas. Em casos de MC a importância da identificação de micro-organismos mortos pode ser questionada, uma vez que o patógeno não é mais viável para provocar injúria na glândula mamária (KOSKINEN et al. 2010).

Mastites causadas por *Escherichia coli* tem sido associadas a culturas negativas, pois infecções causadas por este agente costumam ser autolimitantes. Suojala et al (2010), ao estudarem o efeito do enrofloxacino no tratamento de casos naturais de MC causada por *Escherichia coli*, reportaram que a cura bacteriológica, avaliada 21 dias após a detecção do caso, foi de 90,5% (38/42) e 86,8% (33/38) no grupo tratado e no grupo controle (receberem somente anti-inflamatório), respectivamente.

Apesar das limitações encontradas na cultura microbiológica, ainda se trata de um teste confiável e importante para o diagnóstico de patógenos envolvidos na etiologia das mastites. Em relação à MC, a identificação do agente envolvido no caso é de importância para a tomada de decisão de manejo da propriedade leiteira. Nos últimos anos, programas voltados para a redução do uso de antimicrobianos tem sido cada vez mais incentivados. Nesses programas, a adoção de técnicas que possibilitam identificação rápida do patógeno envolvido no caso de MC é cada vez mais necessária.



## **2.2. Tratamento seletivo de mastite clínica**

### **2.2.1. Sistema de cultura na fazenda**

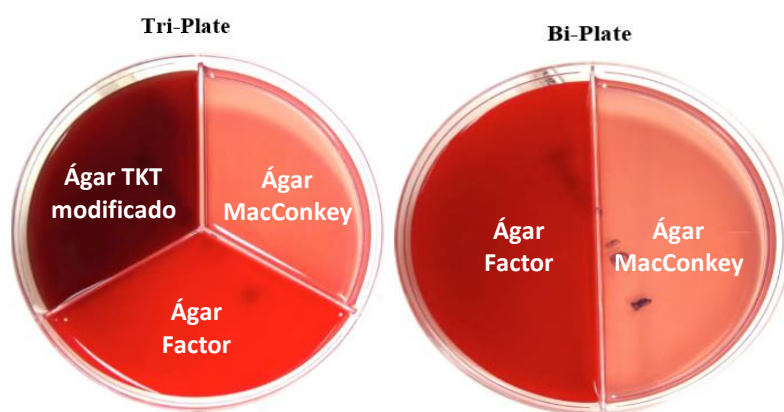
Ao longo de décadas o tratamento de casos de MC foi baseado somente na observação dos sinais clínicos presentes na glândula mamária, sem o conhecimento do agente causador. Ademais, poucas propriedades leiteiras tem como rotina realizar a cultura microbiológica dos casos de MC. Hoe e Ruegg (2006), ao caracterizarem práticas de manejo realizadas em fazendas do estado de Wisconsin, reportaram que somente 12,6% (N = 547) dos produtores realizavam cultura de todos os casos de MC em laboratórios comerciais. Nesse mesmo estudo, foi descrita associação entre o tamanho do rebanho e a realização de cultura dos casos de MC. A frequência de cultura de todos os casos de MC em fazenda grandes (> 200 vacas em lactação) e médias (101 a 200 vacas) foi 2,5 vezes maior do que aquela observada em fazendas pequenas (51 a 100 vacas) e muito pequenas ( $\leq$  50 vacas).

Devido ao fato de que 25 a 50% das culturas dos casos de MC não apresentam crescimento bacteriano (Tabela 1), a administração de antimicrobianos em todos os casos de MC, independentemente do agente envolvido no caso, resulta em uso excessivo de antimicrobianos. Fuenzalida e Ruegg (2019) conduziram ensaio clínico randomizado comparando o desfecho clínico dos casos de MC negativos na cultura da fazenda. Quartos do controle negativo (N = 59) não receberam nenhum tipo de tratamento e quartos do grupo tratado (N = 62) receberam dose diária de cloridrato de ceftiofur durante cinco dias. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em todos os desfechos estudados, tais como risco de falha de tratamento, recidiva de MC, dias até a cura clínica, dias até o descarte, produção de leite e CCS. Esses resultados evidenciam os prejuízos econômicos e exposição desnecessária dos animais a antimicrobianos decorrentes do tratamento de casos de MC que não apresentam crescimento bacteriano.

O SCF é uma estratégia de tratamento seletivo de MC com potencial de redução no uso de antimicrobianos (LAGO et al., 2011a; VASQUEZ et al., 2017), o que resultaria em benefícios tanto para os produtores quanto para os animais. O sistema consiste em semear, no laboratório da fazenda, o leite de todos os casos de MC em placas de cultura. A decisão de tratamento do animal é baseada no resultado da cultura após 18 a 24 horas de incubação à 37°C. É importante acrescentar que a utilização do SCF não descarta a necessidade da cultura adicional dos casos de MC em laboratórios comerciais, para

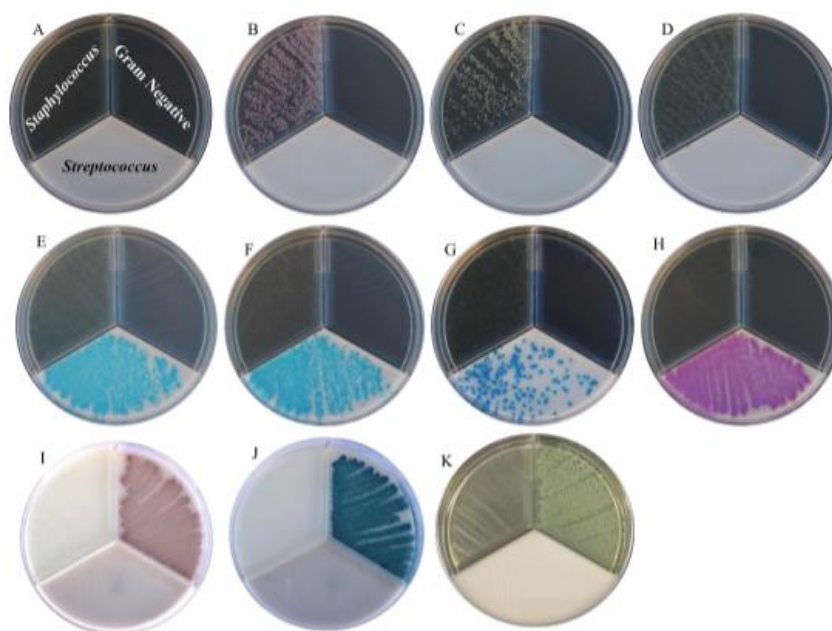
monitoramento da ocorrência de mastites causadas por patógenos de crescimento lento, ou que exijam nível de diagnóstico mais complexo.

No mercado existem diferentes tipos de placas que utilizam meios de cultura seletivos e não seletivos. Um sistema tradicional, comercializado pela Universidade de Minnesota, EUA, consiste em placas bipartidas e tripartidas contendo meios que possibilitam o isolamento seletivo de patógenos Gram-negativos (Ágar MacConkey), Gram-positivos (Ágar Factor) e estreptococos (Ágar TKT modificado) (Figura 2).



**FIGURA 2.** Sistemas de cultivo microbiológico “Minnesota Easy Culture System”, produzidos pela Universidade de Minnesota, EUA. Fonte: <http://dairyknow.umn.edu/topics/milk-quality/minnesota-easy-culture-system-user-s-guide/>

Existem também placas tripartidas (Accumast; FERA Animal Health LCC, Ithaca, NY) que contém meios de cultura seletivos cromogênicos, que permitem a identificação de patógenos causadores de mastite por diferenciação de cor (Figura 3).



**FIGURA 3.** Sistema de cultivo microbiológico “Accumast” (FERA Animal Health LCC, Ithaca, NY). A) Placa sem crescimento bacteriano; B) *Staphylococcus aureus*, C) *Staphylococcus epidermidis*; D) *Staphylococcus chromogenes*; E) *Streptococcus agalactiae*; F) *Streptococcus dysgalactiae*; G) *Streptococcus uberis*; H) *Enterococcus faecalis*; I) *Escherichia coli*; J) *Klebsiella oxytoca* e K) *Pseudomonas aeruginosa*. Fonte: Ganda et al., (2016).

Nos últimos anos algumas pesquisas foram realizadas para avaliar a viabilidade do SCF. Em dois estudos realizados por Lago et al. (2011a; 2011b), 449 quartos acometidos com MC leve ou moderada foram divididos em dois grupos. Quartos do grupo controle foram tratados com cefapirina sódica no momento da detecção dos casos e quartos do grupo submetido ao SCF foram tratados de acordo com os resultados do cultivo. Quartos com infecção causada por bactérias Gram-positivas, ou por infecção mista causada por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, foram tratados com antimicrobiano logo após o diagnóstico pelo SCF. Quartos com infecção causada somente por bactérias Gram-negativas, ou com resultado negativo, não receberam tratamento.

Os resultados desse estudo mostraram que o uso do SCF resultou em economia de 50% no uso de antimicrobianos nas propriedades participantes. Ademais, a espera de 24 horas até o resultado da cultura não resultou em diferenças significativas em desfechos relevantes, tais quais as taxas de cura clínica e bacteriológica, risco de casos recorrentes, risco de falha no tratamento, risco de descarte e morte, produção de leite e CCS. Ainda,

houve tendência de diminuição em 1 dia para o leite retornar ao tanque de leite comercializável no grupo submetido ao SCF.

Em estudo similar conduzido por Vasques et al. (2017) em rebanho leiteiro de Nova York (EUA), 489 quartos com MC leve ou moderada foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de tratamento. Quartos do grupo controle receberam, imediatamente após a detecção do caso, tratamento com cloridrato de ceftiofur e quartos do grupo submetido ao SCF foram tratados de acordo com os resultados do cultivo. Quartos com infecção causada por bactérias Gram-positivas, ou por infecção mista causada por estafilococos coagulase-negativa ou *Streptococcus spp.* e bactérias Gram-negativas, foram tratados com cefapirina sódica logo após o diagnóstico pelo SCF. Quartos com infecção causada somente por bactérias Gram-negativas, ou com resultado negativo, não receberam tratamento. Foi observado que o uso do SCF resultou em redução de 68% no uso de antimicrobianos. Além disso, corroborando com os resultados encontrados por Lago et al. (2011a; 2011b), a espera de 24 horas até o resultado da cultura não resultou em diferenças significativas entre os grupos, em relação aos dias para cura clínica, produção de leite, CCS e risco de descarte e morte. Somente foi observada diferença no tempo de permanência no lote de animais em tratamento. Vacas do grupo SCF estiveram, em média, 3 dias a menos do que vacas do grupo controle.

O perfil de utilização do SCF foi estudado por Neeser et al. (2006), os quais aplicaram questionário em 52 fazendas que compraram o SCF desenvolvido pela universidade de Minnesota. Foi observado que 27% (14/52) dos produtores deixaram de utilizar o SCF. O principal motivo (50%; 7/14) por abandonarem o sistema foi a incapacidade de esperar 24 horas após o cultivo do leite para a tomada de decisão de tratamento.

Dentre os proprietários entrevistados que ainda utilizavam o SCF (N = 38), 58% esperavam 24 horas para a decisão de tratamento e 39% iniciavam o tratamento com antimicrobianos imediatamente após a detecção do caso de MC e esperavam as 24 horas para decidir se interrompiam ou continuavam o tratamento. Foi observada redução no uso de antimicrobianos em 70% nas fazendas que esperavam o resultado da cultura para decisão de tratamento. Em contrapartida, nas fazendas que iniciavam o tratamento imediatamente após a detecção do caso, não foi observada diminuição no uso de antimicrobianos (NEESER et al., 2006).

### **2.2.2. Avaliação econômica da utilização do sistema de cultura na fazenda**

A utilização do SCF pode ser benéfica para os produtores leiteiros, devido à redução no uso de antimicrobianos e redução na quantidade de leite descartado devida à presença de resíduos de antimicrobianos no leite. No entanto, estudos recentes indicam que nem todas as propriedades se beneficiariam economicamente da utilização do SCF.

Down et al. (2017) compararam o SCF com o sistema de tratamento convencional, no qual todos os casos de MC são tratados no momento da detecção e avaliaram os principais fatores que influenciam o custo benefício dos sistemas. Um modelo de simulação de Monte Carlo foi desenvolvido para simular cinco mil casos de MC para cada protocolo de tratamento. Os principais fatores que influenciaram a diferença de custo entre os dois sistemas foram a proporção de casos de MC causado por bactérias Gram-positivas e a diminuição de cura bacteriológica relacionada ao tempo de espera de 24 horas para a tomada de decisão de tratamento (DOWN et al., 2017).

Em simulação supondo que haveria pequena diminuição (0 - 5%) no risco de cura bacteriológica decorrente do tempo de espera de 24 horas para a tomada de decisão de tratamento, foi observado que o SCF foi mais rentável do que o convencional quando a proporção de casos de MC por patógenos Gram-positivos foi menor do que 47% (DOWN et al., 2017). Ao considerar a suposição de que haveria moderada diminuição (5 - 17%) no risco de cura bacteriológica decorrente do tempo de espera de 24 horas para a tomada de decisão de tratamento, foi observado que o SCF foi mais rentável do que o convencional somente quando a proporção de casos de MC por patógenos Gram-positivos foi menor do que 21% (DOWN et al., 2017). No entanto, na simulação que considerou uma maior diminuição (17 - 22%) no risco de cura bacteriológica decorrente do tempo de espera de 24 horas para a tomada de decisão de tratamento, foi observado que o SCF foi menos rentável do que o convencional, independentemente da proporção de patógenos Gram-positivos causando os casos de MC (DOWN et al., 2017).

## **2.3. Anti-inflamatórios não esteroidais**

### **2.3.1. Imunologia da glândula mamária – reação inflamatória**

Com o aumento da tecnificação dos rebanhos leiteiros os animais vêm cada vez mais sendo selecionados geneticamente para alta produção de leite. Estas alterações refletem em mudanças na susceptibilidade dos animais à mastite. Barnouin et al. (2005) relataram que a incidência de MC em vacas de alta produção de leite (média anual > 8,130

Kg/lactação) foi 1,3 vezes maior do que a incidência de MC em vacas de média produção de leite (média anual < 6,705 Kg).

A glândula mamária apresenta diversos mecanismos de defesa contra invasão de patógenos causadores de mastite. A primeira linha de defesa é o esfíncter do canal do teto. Este canal tem capacidade de dificultar a penetração de patógenos, devido ao revestimento por um tampão de queratina, que é uma cera composta de ácidos graxos com ação bacteriostática e proteínas capazes de induzir a morte dos patógenos (SORDILLO et al., 1997).

Caso os micro-organismos consigam ultrapassar esta barreira física e adentrar o ambiente mamário terão que estar aptos a escapar da atividade das células somáticas presentes na glândula para estabelecer infecção. As células predominantes na glândula mamária saudável são, na grande maioria, macrófagos, linfócitos e, em menor quantidade, neutrófilos e células epiteliais (RIOLLET et al., 2000a; DOSOGNE et al., 2003).

Os macrófagos são as células mais encontradas no leite e no tecido mamário saudável, compondo 66 a 88% do total de células somáticas presentes no leite (RIOLLET et al., 2000a). A função dos macrófagos é a fagocitose de micro-organismos invasores, reparação tecidual e apresentação de antígenos. Os macrófagos presentes no leite têm ação menos efetiva do que os presentes no sangue, pois os componentes do leite (gordura, caseína, entre outros) também são fagocitados (SORDILLO et al., 1997).

Quando há o estabelecimento de infecção os macrófagos liberaram substâncias quimiotáticas para atrair células polimorfonucleares ao sítio da infecção (POLITIS et al., 1991). Shuster et al. (1997) desafiaram experimentalmente nove quartos com *Escherichia coli* e observaram que, após 12 horas do desafio, houve aumento de citocinas pró-inflamatórias (TFN- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 e C5a) no leite. Além disso, 16 horas após o desafio foi observado aumento significativo da CCS em comparação com os quartos não desafiados.

As células epiteliais presentes na glândula mamária também desempenham papel importante no desencadeamento da resposta inflamatória. Estas células são capazes de detectar bactérias e produtos bacterianos e reagir produzindo quimiocinas mobilizadoras de neutrófilos e citocinas pró-inflamatórias (LAHOUASSA et al., 2007).

A liberação das citocinas pró-inflamatórias induz influxo de neutrófilos oriundos da corrente sanguínea que migram para a glândula mamária modificando o perfil das células e a CCS do leite (RIOLLET et al., 2000a). No quarto mamário infectado as células mais frequentemente encontradas são os neutrófilos, presentes entre 50 e 95% do total de

células somáticas existentes no leite (RIOLLET et al., 2000a). A função dos neutrófilos é fagocitar e destruir os patógenos invasores. Além disso, são fontes de pequenos peptídeos antibacterianos que são capazes de destruir patógenos causadores de mastite (SELSTED et al., 1993).

Caso a ação inata do sistema imune da glândula mamária seja efetiva e capaz de eliminar os micro-organismos invasores, os estímulos inflamatórios cessam, e a CCS retorna a níveis basais. Riollet et al. (2000b), ao desafiarem experimentalmente com *Escherichia coli* cinco quartos mamários saudáveis, observaram IIM seguida de cura espontânea 10 dias após do desafio. A população de neutrófilos na glândula mamária representava  $38,8 \pm 5,2$  e  $97,3 \pm 0,9\%$  do total de células somáticas encontradas, antes e após 16 horas do desafio, respectivamente. Porém, três dias após o desafio as células mononucleares voltaram a constituir a população celular predominantemente encontrada, representando  $76 \pm 5,6\%$  do total de células somáticas.

Se os patógenos causadores de mastite forem capazes de sobreviver a resposta inicial, a inflamação e migração de leucócitos continuará contribuindo para a diminuição da quantidade e qualidade do leite produzido na glândula mamária. Estudos demonstraram que a diapedese prolongada observada no epitélio alveolar e a proteólise produzida pelos neutrófilos recrutados para a glândula mamária contribuem para o dano tecidual e degradação dos componentes do leite (SORDILLO et al., 1989; MEHRZAD et al., 2005). Heikkilä et al. (2018), ao investigarem o impacto da mastite na produção de leite, observaram que a MC causada por *E. coli* e *S. aureus* antes dos 120 dias de lactação provocou diminuição de produção de leite de 10,6% (3,5 Kg/dia) e 7,1% (2,3 Kg/dia) do total produzido na lactação (305 dias), respectivamente.

O desencadeamento da inflamação é uma resposta fundamental do sistema imune inato da vaca para eliminar micro-organismos invasores e restaurar a função normal do tecido mamário. Mastites crônicas ou agudas podem gerar respostas inflamatórias disfuncionais provocando danos permanentes ao tecido mamário e comprometendo o bem-estar animal. Assim, uma resposta eficaz que consiga eliminar rapidamente a injúria é fundamental para evitar os efeitos deletérios da inflamação (SORDILLO, 2018).

Desta forma, o uso de AINES em casos de MC poderia contribuir para amenizar os efeitos deletérios do processo inflamatório e melhorar o conforto e bem-estar animal.

### **2.3.2. Ação dos anti-inflamatórios não esteroidais**

Um fármaco para ser AINES precisa ter ação anti-inflamatória, antipirética e analgésica. No processo inflamatório, quando há invasão de micro-organismos e dano tecidual, a enzima fosfolipase A2 atua nos fosfolipídios que compõem a membrana celular, resultando na produção de ácido araquidônico. Algumas enzimas, como a COX1 e COX2, convertem o ácido araquidônico produzido em prostaglandinas e leucotrienos, substâncias responsáveis pelo desencadeamento da cascata inflamatória. O mecanismo de ação dos AINES consiste na inibição da biossíntese de prostaglandinas pela competição com as enzimas COX pelo sítio ativo do ácido araquidônico (VANE et al., 1998).

O cetoprofeno [ácido 2-(fenil-3-benzoil) propiônico] é um potente AINES sintetizado pela primeira vez em 1967 e atualmente comercializado no mundo todo (KANTOR, 1986). Atua na inibição da via da cicloxigenase do metabolismo do ácido araquidônico, levando à diminuição da produção de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas e tromboxanos. Além disso, inibe alguns elementos da via lipoxigenase, como leucotrienos, gerando retardo do processo de destruição tecidual (KANTOR, 1986).

Estudos conduzidos em modelos experimentais mostraram que o cetoprofeno é um fármaco 20 vezes mais potente que o ibuprofeno, 80 vezes mais potente que a fenilbutazona e 160 vezes mais potente que o ácido acetil salicílico na redução da inflamação, além de ser um potente AINES nos processos inflamatórios agudos, subagudos e crônicos (KANTOR, 1986). É um fármaco rapidamente absorvido que apresenta elevada biodisponibilidade, metabolizado no fígado, excretado na urina e, em menor grau, nas fezes (NOAH, 2018a).

Em bovinos o cetoprofeno é rapidamente absorvido após administração IM e atinge concentração plasmática máxima dentro de 30 a 60 minutos, e apresenta 80% da dose administrada eliminada dentro de 12 horas (NOAH, 2018b). Deste modo, por apresentar rápido início de ação, meia-vida plasmática curta e baixa toxicidade (KANTOR, 1986), é um medicamento apropriado para uso em casos de MC.

### **2.3. Uso de anti-inflamatórios não esteroidais em mastite**

O uso de anti-inflamatórios para o tratamento de MC em gado leiteiro é bastante frequente, apesar da sua eficácia ser pouco esclarecida na literatura (OLIVEIRA; RUEGG, 2014; KAYITSINGA et al., 2017). O uso é mais comum nos casos graves. Oliveira e Ruegg (2014), ao estudarem 51 fazendas de Wisconsin, observaram que a



terapia de suporte incluindo anti-inflamatórios foi administrada em 48,3% (43/284), 20% (43/216) e 8% (43/89) dos casos de MC grave, moderada e leve, respectivamente.

Poucos estudos foram realizados para avaliar a eficácia dos AINES no tratamento de MC (Tabela 3). Na presente revisão de literatura foram encontrados 12 estudos que utilizaram AINES para esta finalidade. Além disso, foi encontrado um estudo que avaliou o efeito preventivo dos AINES em casos de MC e outro estudo que avaliou o efeito dos AINES em vacas cronicamente infectadas, na curva de ejeção do leite durante a ordenha.

Dos estudos que avaliaram a eficácia dos AINES no tratamento de MC, a maioria (64,29%) utilizou inoculação bacteriana experimental para indução de MC e apenas 35,71% dos estudos utilizaram casos naturais. Todos os estudos com indução de MC utilizaram *Escherichia coli* e o início do tratamento foi em média 3,8 horas após o desafio (ANDERON et al., 1989; LOHUIS et al., 1991; VANGROENWEGHE et al, 2005; BANTING et al., 2008; CHAPINAL et al., 2014), logo após o início dos sinais clínicos (WAGNER et al., 2004; YEISER et al., 2012), imediatamente após o desafio (FITZPATRICK, et al., 2013), ou no momento do desafio (DAN et al., 2018). Independentemente do tipo de estudo (indução ou uso de casos naturais de MC) a cura bacteriológica após o tratamento foi avaliada em apenas três estudos (VANGROENWEGHE et al, 2005; YEISER et al., 2012; MCDUGALL et al. 2016).

Yeiser et al. (2012) desafiaram experimentalmente 24 quartos com *Escherichia coli* e administraram, em metade deles, dose única de flunexina meglumina ao início dos sinais clínicos, observando melhora na ingestão de matéria seca e produção de leite em comparação aos demais 12 quartos que foram desafiados e não tratados. Entretanto, estudos semelhantes que utilizaram inoculação bacteriana experimental para avaliar a eficácia dos AINES não encontram melhora na ingestão de matéria seca (CHAPINAL et al., 2014) e produção de leite (ANDERON et al., 1989; WAGNER et al., 2004; VANGROENWEGHE et al, 2005; CHAPINAL et al., 2014). Ressalta-se que os resultados de estudos que utilizaram inoculação experimental bacteriana podem não ser extrapoláveis a casos naturais de MC.

Fitzpatrick et al. (2013) desafiaram, experimentalmente, 24 quartos com lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* e administraram imediatamente após o desafio, em metade dos quartos, uma dose de meloxicam (grupo tratado) e mesmo volume de solução placebo (grupo controle) na outra metade dos quartos. Foi observado que animais do grupo tratado tiveram menos edema de úbere e temperatura corporal mais baixa em comparação com os animais do grupo controle, em concordância com os

resultados encontrados por Vangroenweghe et al. (2005). Contudo, Wagner et al. (2004) e Chapinal et al. (2014), que também realizaram inoculação experimental bacteriana, não observaram efeito do AINES na ocorrência de edema de úbere em comparação com o grupo controle.

Fitzpatrick et al. (2013) não encontraram diferença entre os grupos tratado e controle no tempo de ruminação e no escore de CCS. Porém, a maioria dos estudos que avaliaram a motilidade ruminal encontraram efeito benéfico dos AINES (WAGNER et al., 2004; VANGROENWEGHE et al., 2005; BANTING et al., 2008; CHAPINAL et al., 2014).

Foram encontrados na literatura poucos estudos que avaliaram o efeito do cetoprofeno no tratamento de MC (SHPIGEL et al., 1994; BANTING et al., 2008; DAN et al., 2018). Em estudo de inoculação bacteriana experimental realizado por Banting et al. (2008), 27 quartos foram desafiados com *Escherichia coli* e os animais foram divididos em três grupos: Grupo 1: animais não tratados (controle), grupo 2: animais tratados com cetoprofeno por via oral e grupo 3: animais tratados com cetoprofeno por via IM. Foi observado que os animais dos grupos tratados (grupo 2 e 3) tiveram retorno mais rápido aos níveis fisiológicos normais, da temperatura corporal, frequência respiratória e contrações ruminais, do que os animais do grupo controle. Além disso, os animais dos grupos tratados tiveram regressão mais rápida do inchaço de úbere e escore de dor, do que aqueles do grupo controle.

Dan et al. (2018) avaliaram o efeito do cetoprofeno, administrado por via IMM, na CCS e na integridade da barreira hemato-láctea de quartos desafiados experimentalmente com LPS de *Escherichia coli*. Nove vacas foram utilizadas no estudo. Destas, três foram controles negativos. As demais vacas (6) foram desafiadas experimentalmente com LPS e cetoprofeno (quarto anterior desafiado apenas com LPS e quarto contralateral desafiado com cetoprofeno adicionado de LPS). Foi observado que os quartos que receberam cetoprofeno e LPS tiveram significativamente menores concentrações de CCS, albumina sérica e imunoglobulina G quando comparados aos quartos que receberam apenas LPS. Além disso, não foram observados aumentos na concentração de componentes sanguíneos nos quartos que receberam cetoprofeno e LPS em comparação aos quartos que receberam apenas LPS. No entanto, os autores levantaram a hipótese de que a supressão dos fatores inflamatórios estudados poderia não ser benéfica para a cura da infecção.

Poucos estudos foram realizados para avaliar a eficácia dos AINES em casos de MC de ocorrência natural (SHPIGEL et al., 1994; MCDOUGALL et al., 2009; MCDOUGALL et al. 2016). Shpigel et al. (1994) conduziram ensaio clínico com 411 quartos de 385 vacas que apresentavam casos naturais de MC. Estes animais foram alocados em cinco grupos experimentais com o objetivo de avaliar a eficácia do cetoprofeno no tratamento de casos agudos de MC. Foi observado que a adição de cetoprofeno à terapia antimicrobiana resultou em maior taxa de recuperação (definida como o retorno em pelo menos 75% da produção diária de leite que o animal apresentava antes do caso de MC) de MC (94,7% no grupo 2 e 92,3% no grupo 5), em comparação com os grupos controles (81,0% no grupo 1, 83,7% no grupo 3 e 70,7% no grupo 4).

Resultados de ensaio clínico utilizando associação de hidriodeto de penetamato e meloxicam para o tratamento de casos naturais de MC, demonstraram menor CCS (7, 14 e 21 dias pós tratamento) e menor taxa de descarte do rebanho no grupo tratado, em comparação ao grupo controle, tratado somente com o antimicrobiano. Não foi observada alteração no risco de falha de cura no tratamento e na produção de leite até 200 dias após o tratamento (MCDOUGALL et al., 2009). Porém, apesar do estudo ter utilizado casos naturais de MC, não foi avaliada a cura bacteriológica, campo pouco esclarecido até o presente momento.

McDougall et al. (2016), em ensaio clínico incluindo 509 vacas em lactação de 61 rebanhos em 6 países europeus, reportaram que a adição de meloxicam por via subcutânea à terapia antimicrobiana IMM de casos leves e moderados de MC, resultou em maior proporção de cura bacteriológica (66%) do que a observada no grupo placebo (50%).

Adiante do exposto, devido ao uso de inoculações experimentais, a aplicação dos resultados da maioria dos estudos publicados em cenário de ocorrência de casos naturais de MC é limitada. Ademais, muitos destes estudos apresentaram limitações analíticas e resultados conflitantes, o que dificultou a formação de conclusões sobre o tema. Além disso, o desafio com outros patógenos causadores de mastite, diferentes de *Escherichia coli*, não foi relatada e o início dos tratamentos com AINES foi realizado poucas horas após o desafio, o que dificilmente acontece na realidade do campo.

Um ensaio clínico sugeriu que o uso de AINES em casos de MC pode ter benefício tanto na cura bacteriológica quanto na diminuição de CCS e taxa de descarte do rebanho (MCDOUGALL et al., 2009; MCDOUGALL et al., 2016). Porém, mais estudos são necessários para melhor compreensão a respeito da eficácia dos AINES no tratamento de casos naturais de MC.

Ademais, foram encontrados na literatura estudos que reportam efeitos benéficos dos AINES na saúde da glândula mamária. Swartz et al. (2018) conduziram estudo com o objetivo de avaliar o efeito do meloxicam em desfechos de saúde mamária, como a MC. Foi observado que vacas que receberam meloxicam antes do parto, após o parto e o grupo controle (placebo) tiveram incidência de MC de 0,0, 1,5 e 4,6%, respectivamente, sugerindo que a administração de meloxicam antes ou após o parto pode ter efeito preventivo.

Zecconi et al. (2018) avaliaram o efeito do cetoprofeno na curva de ejeção de leite durante a ordenha e relataram que vacas cronicamente infectadas não tratadas com AINES tiveram menor produção de leite durante a ordenha, principalmente nas fases iniciais e de platô, do que vacas cronicamente infectadas e tratadas com cetoprofeno, sugerindo que a inflamação poderia ter efeitos negativos na ação da ocitocina nos alvéolos da glândula mamária.

Dessa forma, uma hipótese ainda não explorada cientificamente, e que poderia trazer benefícios para o SCF, seria a utilização de AINES para o tratamento de casos de MC que não resultam em isolamento de patógenos. O tratamento com AINES poderia reduzir os sinais clínicos, proporcionando retorno mais rápido do leite ao aspecto normal e às condições de comercialização.

**TABELA 3.** Resumo dos estudos que utilizaram anti-inflamatórios não esteroidais em mastite clínica.

| Autores,<br>ano e<br>Local                 | Tipo de<br>estudo <sup>1</sup>   | Nº de rebanhos<br>(vaca*/quarto) | Grupos                                                                                             |                                                                                                                                                                                      | Posologia                                         | Principais<br>Desfechos       | Observação                                                                                                                                      |
|--------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                            |                                  |                                  | Controle negativo                                                                                  | Tratamento <sup>2</sup>                                                                                                                                                              |                                                   |                               |                                                                                                                                                 |
| Anderon et al., 1989; EUA: Missouri        | EE (Desafio com <i>E. coli</i> ) | 1(21)                            | <b>Grupo 1:</b> Solução salina (não foi reportada a dose)                                          | <b>Grupo 2:</b> IV dexametasona 0,44 mg/kg (2 horas após o desafio)<br><b>Grupo 3:</b> IV flunixinina meglumina 1,1 mg/kg (2 horas após o desafio)                                   | Duas doses a cada 8 horas (flunixinina meglumina) | Inflamação, produção de leite |                                                                                                                                                 |
| Lohuis et al., 1991; (local não informado) | EE (Desafio com <i>E. coli</i> ) | 1(11)                            | <b>Grupo 1:</b> Sem tratamento                                                                     | <b>Grupo 2:</b> IV carprofeno 0,7 mg/kg (2 horas após o desafio)                                                                                                                     | Dose única                                        | Inflamação                    |                                                                                                                                                 |
| Shpigel et al., 1994; Israel: Jerusalém    | EC (casos naturais de MC aguda)  | 7 (385/411)                      | <b>Grupo 1:</b> Sem tratamento<br><b>Grupo 3:</b> Sem tratamento<br><b>Grupo 5:</b> Sem tratamento | <b>Grupo 2:</b> IM cetoprofeno 2 g (após início dos sinais clínicos)<br><b>Grupo 4:</b> cetoprofeno (após início dos sinais clínicos) (dose e via de administração não informada)    | 1 vez ao dia (duração não informada)              | Cura clínica                  | Todos os animais foram tratados com 1 dose IM de 20 g de sulfadiazina de sódio e 4 g de trimetoprim + 20 g de sulfadiazina e 4 g de trimetoprim |
| Wagner et al., 2004; EUA: Iowa             | EE (Desafio com <i>E. coli</i> ) | 1(30)                            | <b>Grupo 1:</b> Sem tratamento                                                                     | <b>Grupo 2:</b> IV flunixinina meglumina 2,2 mg / kg (após início dos sinais clínicos)<br><b>Grupo 3:</b> IV acetato de isoflupredona 20 mg / vaca (após início dos sinais clínicos) | Dose única                                        | Inflamação, produção de leite |                                                                                                                                                 |

TABELA 3. Continuação

| Autores,<br>ano e<br>Local                                  | Tipo de<br>estudo <sup>1</sup>                   | Nº de rebanho<br>(vaca*/quarto) | Grupos                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                | Posologia  | Principais<br>Desfechos                                           | Observação                                                                                     |
|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                             |                                                  |                                 | Controle negativo                                                                      | Tratamento <sup>2</sup>                                                                                                                                                                                                        |            |                                                                   |                                                                                                |
| Vangroenw<br>eghe et al,<br>2005;<br>Belgica:<br>Merelbeke  | EE<br>(Desafio<br>com <i>E.</i><br><i>coli</i> ) | 1(25)                           | <b>Grupo 1:</b> IV Solução<br>salina 2.9 mL/ 100 kg                                    | <b>Grupo 2:</b> IV carprofeno 1,4<br>mg/kg (9 horas após o desafio)                                                                                                                                                            | Dose única | Inflamação,<br>produção de<br>leite, cura<br>bacteriológica       | Somente novilhas foram<br>incluídas no estudo                                                  |
| Banting et<br>al., 2008<br>(Local não<br>informado)         | EE<br>(desafio<br>com <i>E.</i><br><i>coli</i> ) | 1 (27*)                         | <b>Grupo 1:</b> IM soro<br>fisiológico 3 ml / 100<br>kg de + VO água<br>corrente 0,6 L | <b>Grupo 2:</b> VO cetoprofeno 0,5<br>L de 4 mg/kg de + IM soro<br>fisiológico 3 ml / 100 kg (2<br>horas após o desafio)<br><b>Grupo 3:</b> IM cetoprofeno 3<br>ml/100 kg + VO água corrente<br>0,6 L (2 horas após o desafio) | Dose única | Inflamação,<br>Produção de<br>leite                               |                                                                                                |
| McDougall<br>et al., 2009;<br>Nova<br>Zelândia:<br>Hamilton | EC (casos<br>naturais<br>de MC)                  | 15 (904/ 727)                   | <b>Grupo 1:</b> SC veículo<br>do meloxicam 12,5<br>mL (451 quartos)                    | <b>Grupo 2:</b> SC meloxicam 12,5<br>mL de 250 mg/mL (após início<br>dos sinais clínicos) (453<br>quartos)                                                                                                                     | Dose única | Inflamação,<br>Produção de<br>leite,<br>risco de falha<br>de cura | Todos os animais foram<br>tratados com 3 infusões<br>IMM de 5 g de hidriodeto<br>de penetamato |
| Yeiser et<br>al., 2012;<br>EUA: New<br>Hampshire            | EE<br>(desafio<br>com<br><i>E.coli</i> )         | 1(24*)                          | <b>Grupo 1:</b> Sem<br>tratamento                                                      | <b>Grupo 2:</b> IV flunexina<br>meglumina 100 mg/45,5 kg de<br>(após início dos sinais<br>clínicos)                                                                                                                            | Dose única | Produção de<br>leite,<br>Cura<br>bacteriológica                   |                                                                                                |

TABELA 3. Continuação

| Autores, ano e Local                                                           | Tipo de estudo <sup>1</sup>      | Nº de rebanho (vaca*/quarto)        | Grupos                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                    | Posologia  | Principais Desfechos           | Observação                                                                                                                                                          |
|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                |                                  |                                     | Controle negativo                                                                                   | Tratamento <sup>2</sup>                                                                                                                                                                                                            |            |                                |                                                                                                                                                                     |
| Fitzpatrick, et al., 2013; Canadá: Ontário                                     | EE (desafio com <i>E. coli</i> ) | 1 (24*)                             | <b>Grupo 1:</b> SC veículo do meloxicam 15 mL (novilha) e 17 mL (vaca) do (imediata após o desafio) | <b>Grupo 2:</b> SC meloxicam 15 mL (novilha) e 17 mL (vaca) de 20 mg/mL (imediata após o desafio)                                                                                                                                  | Dose única | Inflamação                     |                                                                                                                                                                     |
| Chapinal et al., 2014; Canadá: Ontário                                         | EE (desafio com <i>E. Coli</i> ) | 1(13*)                              | <b>Grupo 1:</b> IV solução salina 26 mL (novilha) e 30 mL (vaca) (4 horas após o desafio) (6 vacas) | <b>Grupo 2:</b> IV flunixinina meglumina 26 mL (novilha) e 30 mL (vaca) de 2,2 mg/kg (4 horas após o desafio) (7 vacas)                                                                                                            | Dose única | Inflamação, Produção de leite, |                                                                                                                                                                     |
| McDougall et al. 2016; Bélgica, França, Itália, Espanha, Holanda e Reino Unido | EC (casos naturais de MC)        | 61 (509*)                           | <b>Grupo 1:</b> SC veículo do meloxicam (256 vacas)                                                 | <b>Grupo 2:</b> SC meloxicam 2,5 mL/100 kg (após início dos sinais clínicos) (253 vacas)                                                                                                                                           | Dose única | Cura bacteriológica            | Todos os animais foram tratados com 1 a 4 infusões IMM de 200 mg de cefalexina monohidratada e 133 mg (100.000 UI) de monossulfato de canamicina                    |
| Swartz et al., 2018; EUA: Virgínia                                             | EC                               | Nº de rebanhos não informado (194*) | <b>Grupo 1:</b> VO placebo (entre 48 e 6 horas antes do parto) + VO placebo (12 horas após o parto) | <b>Grupo 2:</b> VO meloxicam 1 mg / kg (entre 48 e 6 horas antes do parto) + VO placebo (12 horas após o parto)<br><b>Grupo 3:</b> VO placebo (entre 48 e 6 horas antes do parto) + VO meloxicam 1 mg / kg (12 horas após o parto) | Dose única | Mastite clínica                | Não utilizou o AINES para tratamento de MC - O estudo mensurou a incidência de MC ao longo da lactação da vaca após a intervenção com meloxicam no momento do parto |

**TABELA 3.** Continuação

| Autores,<br>ano e<br>Local                  | Tipo de<br>estudo <sup>1</sup>   | Nº de rebanho<br>(vaca*/quarto) | Grupos                                                                                                                                   |                                                                                                                             | Posologia                           | Principais<br>Desfechos                  | Observação                                                                                          |
|---------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                             |                                  |                                 | Controle negativo                                                                                                                        | Tratamento <sup>2</sup>                                                                                                     |                                     |                                          |                                                                                                     |
| Zecconi et al., 2018; (Local não informado) | EC (animais com mastite crônica) | 3(102*)                         | <b>Grupo 1:</b> Vacas saudáveis (68 animais)                                                                                             | <b>Grupo 2:</b> Vacas crônicas não tratadas (15 animais)<br><b>Grupo 3:</b> Vacas crônicas IM cetoprofeno 15mL (19 animais) | 2 aplicações na semana por 4 semana | Curva de ejeção de leite                 | Vacas foram consideradas crônicas quando apresentaram SSC > 400.000 mL nos últimos 2 dois registros |
| Dan et al., 2018; Friburgo, Suíça           | EE (desafio com <i>E. Coli</i> ) | 9*                              | <b>Grupo 1:</b> IMM quarto anterior 10 mL solução salina a 10% de etanol + IMM quarto contralateral 10 mL de 50 mg cetoprofeno (3 vacas) | <b>Grupo 2:</b> IMM quarto anterior 10 mL LPS + IMM quarto contralateral 10 mL de LPS adicionado de cetoprofeno             | Dose única                          | CCS e integridade barreira hemato-láctea |                                                                                                     |

<sup>1</sup>Tipo de estudo: EC = Ensaio clínico; EE = Estudo experimental

<sup>2</sup>Tratamento: IV = Intravenoso; IM = Intramuscular; SC = Subcutâneo; VO = Via oral; IMM = intramamário



1    **CAPÍTULO 2 – Trabalho científico**

2

3    **Artigo a ser enviado para a revista *Journal of Dairy Science***

4    (Normas de publicação – ANEXO I)

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26 **Eficácia do cetoprofeno no tratamento de mastite clínica em vacas sem isolamento**  
27 **de patógenos na cultura do leite**

28

29 Giulia S. Latosinski\*, Maíra J. Amzalak, José C. F. Pantoja\*<sup>1</sup>

30 \*Department of Veterinary Hygiene and Public Health, College of Veterinary Medicine  
31 and Animal Science, Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

32

33 <sup>1</sup>Corresponding author: [jose.pantoja@unesp.br](mailto:jose.pantoja@unesp.br)

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

## 51 RESUMO

52

53 O uso de anti-inflamatórios não esteroidais para o tratamento de mastite clínica (**MC**)  
54 em gado leiteiro é bastante frequente, apesar da sua eficácia ser pouco esclarecida. O  
55 objetivo do presente ensaio clínico randomizado foi avaliar a eficácia do cetoprofeno no  
56 tratamento seletivo de casos de MC sem isolamento de patógenos na cultura do leite  
57 realizada nas fazendas. Animais de três rebanhos comerciais foram alocados  
58 aleatoriamente em dois grupos experimentais. O grupo cetoprofeno (N = 65 quartos)  
59 recebeu uma injeção intramuscular de cetoprofeno na dosagem de 3 mg/kg no momento  
60 do diagnóstico negativo da cultura do leite do caso de MC. O grupo controle (N = 64  
61 quartos) não recebeu nenhum tipo de terapia ou placebo. Amostras de leite foram  
62 coletadas no momento do diagnóstico da MC (D0) e 14 (D14) e 21 (D21) dias após o  
63 caso. Os desfechos avaliados foram risco de cura clínica até 7 dias pós-inclusão no  
64 estudo, recidiva e recorrência de MC (14 e 90 dias pós-inclusão, respectivamente), risco  
65 de nova infecção intramamária (**IIM**) e CCS em D14 e D21. A proporção de cura  
66 clínica foi de 83,08% e 85,94%, nos grupos cetoprofeno e controle, respectivamente. O  
67 risco relativo de cura clínica não foi diferente entre os grupos experimentais. O risco de  
68 recidiva (18,52% e 18,18%) e recorrência de MC (16,67% e 16,36%) não foi diferente  
69 entre os grupos cetoprofeno e controle, respectivamente. As chances de nova IIM em  
70 D14 (20,75% e 30,19%) e D21 (28,75% e 15,69%) não foram diferentes entre os grupos  
71 cetoprofeno e controle, respectivamente. A CCS média no leite dos quartos que tiveram  
72 MC não foi diferente entre D14 e D21 e entre os grupos experimentais. Resultados do  
73 presente estudo sugerem que o uso de cetoprofeno em casos de MC sem isolamento de  
74 patógenos na cultura na fazenda não foi associado ao risco de cura clínica, recidiva e  
75 recorrência de MC, novas IIM e CCS.

76     **Palavras-chave.** mastite bovina, cultura na fazenda, anti-inflamatório não esteroide,  
77     ensaio clínico.  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100

## INTRODUÇÃO

A mastite é a doença de maior impacto econômico (Halasa et al., 2007) e a principal razão para o uso de antimicrobianos em rebanhos leiteiros (Nobrega et al., 2017; Redding et al., 2019). É amplamente descrito na literatura que 25 a 50% das culturas microbiológicas de casos de mastite clínica (**MC**) não apresentam isolamento de patógenos (McDougall et al., 2007; Cortinhas et al., 2016). Assim, estratégias de tratamento baseadas na administração de antimicrobianos em todos os casos de MC, independentemente do agente envolvido no caso, resultam em uso excessivo e exposição desnecessária dos animais aos antimicrobianos. Nesse contexto, existe grande preocupação da sociedade com o bem-estar animal e o uso de antimicrobianos em larga escala (Cardoso et al., 2016). Programas que visem rápida identificação etiológica dos agentes causadores de MC, e que possibilitem o tratamento seletivo dos casos que realmente se beneficiam com o uso de antimicrobianos, estão cada vez mais em evidência.

O sistema de cultura na fazenda (**SCF**) é uma estratégia de tratamento seletivo de MC com potencial de reduzir 50 a 68% o uso de antimicrobianos (Lago et al., 2011a; Vasquez et al., 2017). Estudos que visaram validar o SCF mostraram que a espera de 24 horas entre a detecção do caso e o tratamento baseado no resultado da cultura do leite não resultou em diferenças significativas em desfechos como as taxas de cura clínica e bacteriológica, risco de casos recorrentes, risco de descarte e morte, produção de leite e CCS (Lago et al., 2011a; Lago et al., 2011b; Vasquez et al., 2017). Ainda, houve tendência de diminuição em 1 dia para o leite retornar ao tanque de leite comercializável no grupo submetido à SCF (Lago et al., 2011b). Deste modo, o SCF pode resultar em

125 diminuição de custos para os produtores, bem como redução da pressão seletiva para  
126 bactérias multirresistentes aos antimicrobianos.

127 Uma oportunidade que ainda não foi explorada cientificamente, e que poderia  
128 trazer benefícios para o SCF, seria a utilização de anti-inflamatórios não esteroides  
129 (**AINES**) em casos de MC sem isolamento de patógenos. Os AINES são fármacos com  
130 ação anti-inflamatória, antipirética e analgésica que atuam na cascata inflamatória  
131 cessando a síntese de enzimas pró-inflamatórias (Vane et al., 1998). Estudos recentes  
132 reportaram que o uso de AINES como terapia adjunta à MC foi realizada  
133 frequentemente ou sempre em 22,2% de 564 fazendas norte americanas (Kayitsinga et  
134 al., 2017) e em 8 e 20% dos casos de MC leve e moderada de 51 fazendas no estado de  
135 Wisconsin, respectivamente (Oliveira e Ruegg, 2014). Apesar do uso frequente, a  
136 eficácia no tratamento da MC ainda é pouco esclarecida na literatura.

137 O cetoprofeno é um AINES caracterizado pela rápida absorção e eliminação  
138 após administração intramuscular (**IM**). Por essa via, atinge concentração plasmática  
139 máxima entre 30 e 60 minutos e 80% é eliminado em até 12 horas (NOAH, 2018). Por  
140 apresentar características de rápido início de ação, meia-vida plasmática curta e baixa  
141 toxicidade (Kantor, 1986) e não apresentar necessidade de descarte do leite após a  
142 utilização, pode ser apropriado para uso em MC. Dentre a literatura consultada, nenhum  
143 estudo avaliou a eficácia dos AINES no tratamento seletivo de MC, em casos  
144 caracterizados pela ausência de isolamento de patógenos pelo SCF. O uso dos AINES  
145 em tais casos de MC poderia proporcionar benefícios econômicos aos produtores  
146 leiteiros e melhoria do bem-estar animal, por meio da redução dos sinais clínicos e do  
147 tempo de descarte do leite, aumento da taxa de cura microbiológica, e redução do risco  
148 de recorrência e recidiva de MC.

149 Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do cetoprofeno no  
150 tratamento de casos naturais de MC leve ou moderada caracterizados pela ausência de  
151 isolamento de patógenos pelo SCF e não tratados com antimicrobianos.

152

## 153 MATERIAL E MÉTODOS

154

155 O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ,  
156 UNESP-Botucatu (protocolo 0202/2017).

157

### 158 *Delineamento experimental*

159 O estudo foi um ensaio clínico em paralelo (2 grupos), totalmente randomizado,  
160 preparado de acordo com as diretrizes do *Reflect Statment* (Sargeant et al., 2016), para  
161 condução válida e ética de ensaios clínicos incluindo animais de produção.

162

### 163 *Critérios de inclusão e exclusão de fazendas e animais*

164 Uma amostra de conveniência incluindo três rebanhos leiteiros foi utilizada para  
165 o estudo. As fazendas tinham que utilizar o SCF para todos os casos de MC e iniciar  
166 tomada de decisão de tratamento após o diagnóstico microbiológico dos casos. Tetos  
167 com resultado negativo ao cultivo microbiológico não poderiam ser tratados com  
168 antimicrobianos, com exceção daqueles que requeressem tratamento imediato devido à  
169 gravidade. Os rebanhos deveriam ter no mínimo 200 vacas em lactação com  
170 predominância da raça holandesa, ser livres de brucelose e tuberculose, utilizar sistema  
171 mecanizado de ordenha e oferecer cooperação voluntária para a realização das  
172 atividades propostas.

Vacas foram elegíveis para inclusão no estudo se apresentaram casos de MC leve ou moderada (Wenz et al., 2001) sem isolamento de patógenos no SCF, em um ou mais quartos mamários. Vacas não foram elegíveis para inclusão no estudo se tiveram casos de MC leve ou moderada que resultaram em isolamento de qualquer patógeno, em pelo menos um quarto mamário. Além disso, vacas não foram elegíveis se foram tratadas com antimicrobianos ou anti-inflamatórios 7 dias antes do caso de MC incluído no estudo, se já tivessem sido incluídas no estudo anteriormente, se apresentaram MC grave, ou qualquer outra enfermidade que não a estudada.

181

### ***Definição de caso***

Os casos de MC foram detectados pelos técnicos de ordenha, em todas as ordenhas, por meio de exame visual do leite e da glândula mamária. Casos de MC foram classificados em três escores, como proposto por WENZ et al. (2001). Casos leves foram definidos quando houve somente alterações na aparência do leite (cor, viscosidade e consistência). Casos moderados foram definidos quando houve alterações na aparência do leite e no quarto mamário (rubor, tumor, calor, dor ou perda de função). Casos graves foram definidos quando houve todos os sinais supracitados além de alterações sistêmicas, tais como febre, prostração e desidratação

191

### ***Procedimentos de amostragem e coleta de dados***

Inicialmente foi realizada uma primeira visita às propriedades para a explicação da proposta da pesquisa e obtenção do consentimento experimental. Os técnicos de ordenha e produtores receberam treinamento sobre a classificação dos graus de gravidade da MC, sobre os procedimentos de coleta asséptica de amostras de leite e administração dos tratamentos propostos.



198           Imediatamente após a detecção do caso de MC, foram coletados assepticamente  
199   20 mL de leite de cada quarto mamário incluído no estudo. Primeiramente foi realizado,  
200   por pessoa treinada, o cultivo da amostra de leite em placa bipartida comercial contendo  
201   os meios de cultura ágar sangue e MacConkey. Um “swab” estéril foi utilizado para  
202   semear o leite nos meios de cultura e as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.  
203   Após a incubação as placas foram examinadas e os casos negativos (sem isolamento de  
204   patógenos) que atenderam aos critérios de inclusão foram alocados aleatoriamente nos 2  
205   grupos experimentais.

206           As amostras de leite foram congeladas nas fazendas e posteriormente enviadas  
207   para o Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico de Mastite Bovina da UNESP/Botucatu,  
208   para análise microbiológica. Nas fazendas A e B os cultivos das amostras de leite dos  
209   casos de MC foram realizados em dois momentos do dia (manhã e tarde). Na fazenda C  
210   os cultivos das amostras de leite dos casos de MC foram realizados somente no turno da  
211   manhã.

212           Em todas as ordenhas durante um período de 7 dias após a inclusão dos casos no  
213   estudo, técnicos de ordenha utilizaram formulários preparados para o estudo para  
214   registrar sinais clínicos dos casos de MC (gravidade e presença ou ausência de  
215   alterações no leite), necessidade de utilização de antimicrobianos e acompanhamento do  
216   tempo de retorno do leite ao aspecto normal (cura clínica). Esses registros de evolução  
217   dos casos não foram realizados no turno da noite, devido a dificuldades logísticas nas  
218   fazendas participantes.

219           Além das amostras de leite coletadas no momento da detecção dos casos (D0),  
220   amostras adicionais foram coletadas 14 (D14) e 21 (D21) dias após o diagnóstico, para  
221   realização de exame microbiológico e CCS. Dados mensais de casos prévios e

222 posteriores de MC e outros dados zootécnicos das vacas incluídas no estudo foram  
223 registrados para análise.

224

### 225 ***Randomização***

226 O método de randomização em blocos (Friedman et al., 2010) foi utilizado para  
227 formação dos grupos experimentais. Para cada rebanho participante, blocos de 4  
228 animais foram aleatoriamente distribuídos nos dois grupos, de forma que cada bloco  
229 continha dois animais alocados a cada grupo experimental. O procedimento foi repetido  
230 até que todos os animais necessários para o estudo fossem distribuídos nos grupos  
231 experimentais. Se mais de um quarto da mesma vaca apresentou MC, todos os quartos  
232 afetados foram alocados no mesmo grupo de tratamento.

233 Cada fazenda recebeu uma pilha de envelopes previamente randomizados e  
234 numerados de forma crescente. Dentro de cada envelope havia o grupo experimental  
235 (controle ou cetoprofeno) ao qual o animal foi sorteado e o formulário de campo para  
236 acompanhamento do caso. Os funcionários das fazendas foram orientados a sempre  
237 respeitar a ordem crescente dos envelopes, ou seja, a cada novo caso incluído na  
238 pesquisa deviam sempre pegar o primeiro envelope da pilha. Imediatamente após a  
239 randomização deveriam ser aplicados os tratamentos utilizados nos grupos  
240 experimentais.

241

### 242 ***Tratamentos***

243 Vacas cujos resultados do SCF foram negativos foram alocadas em dois grupos  
244 experimentais: 1) grupo cetoprofeno: receberam uma injeção intramuscular (IM) de 3  
245 mg/kg de peso vivo de cetoprofeno (Ketofen, Ceva, Paulínia, São Paulo, Brasil), no  
246 momento da confirmação do diagnóstico negativo do SCF. O leite dos animais tratados

247 não precisou ser descartado após a aplicação do medicamento, de acordo com as  
248 instruções do fabricante; 2) grupo controle: não receberam nenhum tipo de tratamento  
249 ou placebo.

250

### 251 ***Métodos laboratoriais***

252 As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com as recomendações  
253 do National Mastitis Council (NMC, 1999). Os cultivos microbiológicos foram  
254 realizados sem o conhecimento dos grupos experimentais ao qual pertenciam as  
255 amostras. Em suma, foram inoculados 10 µL de leite em placas de ágar sangue e  
256 McConkey, que foram incubadas por até 72 horas a 37 °C. A infecção intramamária  
257 (**IIM**) foi definida quando houve crescimento de pelo menos três colônias da mesma  
258 espécie na placa de cultura. Amostras foram consideradas contaminadas se houve  
259 crescimento de três ou mais espécies bacterianas. Amostras foram consideradas  
260 negativas quando não houve crescimento bacteriano, ou se houve até duas colônias da  
261 mesma espécie (crescimento não significativo). Quando houve o crescimento de duas  
262 espécies distintas, a infecção foi considerada mista.

263 O diagnóstico microbiológico foi realizado com base na morfologia das colônias  
264 nos meios de cultura, coloração de Gram e provas bioquímicas adicionais. Patógenos  
265 Gram-negativos foram cultivados em meios específicos para diagnóstico em nível de  
266 espécie, tais como citrato, ferro triplo açúcar e MIO (motilidade, indol e ornitina).

267 A CCS foi realizada com teste Somaticell (Idexx, São Paulo, Brasil). A  
268 pesquisadora que realizou a CCS não sabia a qual dos grupos experimentais as amostras  
269 pertenciam.

270

271

272 **Análise estatística**

273

274 **Definição das variáveis-resposta.** As variáveis resposta utilizadas foram as seguintes:

275 1) cura clínica: retorno do leite ao aspecto normal (sim = 1 e não = 0) em até 7 dias após  
276 a inclusão do caso; 2) tempo até a cura clínica: tempo (dias) até o retorno do leite ao  
277 aspecto normal, em até 7 dias após a inclusão do caso; 3) recidiva de MC: definida  
278 quando ocorreu a cura clínica seguida de observação de sinais clínicos de mastite até 14  
279 dias após a inclusão do caso no estudo; 4) recorrência de mastite clínica: definida  
280 quando ocorreu cura clínica e posterior observação de sinais clínicos entre 15 e 90 dias  
281 após a inclusão do caso no estudo; 5) tempo até recidiva ou recorrência: tempo (dias)  
282 entre a inclusão do caso no estudo e a recidiva ou recorrência, respectivamente; 6) risco  
283 de nova IIM em D14 e D21 (sim ou não, definida como o isolamento de patógenos em  
284 D14 ou D21, em quartos cujos resultados da cultura do leite foram negativos em D0); 7)  
285 CCS (células/mL) das amostras de leite coletadas em D14 e D21.

286

287 **Procedimentos analíticos.** A unidade de análise foi quarto mamário. Inicialmente

288 estatísticas descritivas foram produzidas para caracterizar as fazendas e animais

289 incluídos no estudo. Modelos de risco proporcional de Cox (PROC PHREG; SAS

290 Institute, Cary, NC, EUA) foram utilizados para comparar 1) tempo até cura clínica, 2)

291 tempo até primeira recidiva e 3) tempo até primeira recorrência de MC entre os grupos

292 experimentais. Análises bivariadas foram realizadas para identificar variáveis

293 explanatórias associadas a cada desfecho supracitado. As variáveis explanatórias

294 consideradas foram 1) paridade (1, 2 e > 2 lactações), 2) dias em lactação, categorizada

295 em 1 (< 100, 100-199, ≥ 200 dias), 3) fazenda (A, B ou C), 4) e grupo experimental

296 (cetoprofeno ou controle).

297           Posteriormente, foram realizadas análises multivariadas por meio da inclusão de  
298 todas as variáveis explanatórias nos modelos de risco proporcional de Cox  
299 correspondentes à cada desfecho. Tentou-se eliminação de variáveis de forma passo à  
300 frente a passo a trás. Como nenhuma variável explanatória foi associada aos desfechos  
301 estudados, os modelos finais apresentados incluíram forçadamente a variável grupo.  
302 Fazenda foi inicialmente incluída nos modelos como efeito fixo e, devido à ausência de  
303 associação com todos os desfechos estudados, permaneceu incluída nos modelos como  
304 efeito aleatório, para considerar a possível correlação entre observações entre quartos  
305 dentro do mesmo rebanho.

306           Curvas de sobrevivência foram produzidas para comparar o tempo até cada  
307 desfecho estudado entre os grupos experimentais. Para a variável tempo até cura clínica,  
308 quartos foram censurados quando o tempo de retorno do leite ao normal foi  $\geq 7$  dias  
309 após a inclusão, ou quando foram removidos do estudo durante o período de  
310 acompanhamento (e.g., morte, secagem ou tratamento com antimicrobianos). Para as  
311 variáveis recidiva e recorrência de MC, quartos foram censurados quando não houve  
312 recorrência em um período de 14 e 90 dias após a inclusão do caso, respectivamente, ou  
313 quando foram removidos do estudo. A análise da suposição da proporcionalidade dos  
314 riscos foi realizada por meio de gráficos log-log sobrevivência  $[-\ln(-\ln S)]$ , na qual S é a  
315 função de sobrevivência.

316           Modelos lineares generalizados de regressão logística (PROC GLIMMIX; SAS  
317 Institute) foram utilizados para estimar as chances de nova IMI em D14 e D21 entre os  
318 grupos experimentais. Um modelo de medidas repetidas (PROC MIXED; SAS Institute)  
319 foi utilizado para comparar a CCS média no leite das amostras coletadas em D14 e D21  
320 entre os grupos experimentais. Para ambos os modelos supracitados, a análise  
321 multivariada foi realizada como descrito anteriormente. Fazenda foi incluída nos

modelos como efeito aleatório para considerar a correlação entre observações de quartos dentro do mesmo rebanho.

324

### 325 ***Cálculo do tamanho da amostra***

326 O cálculo do tamanho da amostra foi realizado com base no teste de  
327 superioridade (Dohoo et al., 2010), com o objetivo de demonstrar que, 3 dias após a  
328 detecção do caso de MC, a proporção de vacas curadas clinicamente (diminuindo assim  
329 o tempo de retorno do leite ao tanque de leite comercializável) seria maior no grupo  
330 cetoprofeno do que no grupo controle. Os cálculos foram realizados supondo-se nível  $\alpha$   
331 de 0,05, poder estatístico de 0,8, proporção esperada de cura clínica de 90% no grupo  
332 cetoprofeno e 75% no grupo controle no terceiro dia de observação. Com base nessas  
333 suposições, 61 quartos mamários por grupo foram necessários para o estudo. Os  
334 cálculos foram realizados com o procedimento PROC POWER (SAS Institute).

335

## 336 **RESULTADOS**

337

### 338 ***Características dos rebanhos***

339 O estudo foi conduzido em três fazendas comerciais nos estados de São Paulo e  
340 Minas Gerais entre janeiro de 2018 e maio de 2019. A fazenda A participou durante  
341 todo o período do estudo. Já a fazenda B participou durante os meses de janeiro e  
342 fevereiro de 2018 e a fazenda C participou entre novembro de 2018 e maio de 2019.

343 Todas as fazendas possuíam vacas de alta produção leiteira da raça holandesa e  
344 CCS do leite do tanque < 203,000 células/mL (Tabela 1). Vacas eram ordenhadas três  
345 vezes ao dia e mantidas confinadas em sistemas de *freestall* com cama de areia  
346 (fazendas B e C) e *compost barn* (fazenda A).

347 As fazendas A, B e C contribuíram com 44 (34,11%), 5 (3,88%) e 80 (62,02%)  
348 dos casos de MC incluídos no estudo, respectivamente. A maioria (95,35%) dos casos  
349 de MC incluídos no estudo foram de grau leve (Tabela 1).

350

### 351 ***Animais incluídos no estudo***

352 Foram incluídos, 129 casos de MC de 127 vacas atenderam aos critérios de  
353 inclusão e foram randomizadas nos grupos controle (N = 64) e cetoprofeno (N = 65)  
354 (Figura 1). A Fazenda C, por possuir muitos animais em lactação (N = 2020),  
355 apresentava diariamente muitos casos de MC sem crescimento bacteriano. Dessa forma,  
356 para viabilizar um manejo adequado dos procedimentos do estudo, os casos foram  
357 incluídos somente em um dia da semana. O número de observações perdidas referente a  
358 cada variável-resposta está apresentado na Figura 1.

359

### 360 ***Características dos grupos experimentais***

361 Após a randomização, exceto pela paridade, não foram encontradas diferenças  
362 significantes entre os grupos nas variáveis posição do quarto incluído no estudo, DEL  
363 no dia do caso de MC e percentagem de culturas negativas no laboratório referência em  
364 D0 (Tabela 2). Todos os casos de MC de grau moderado (N = 6) foram incluídos  
365 aleatoriamente no grupo controle.

366 No momento D0, 89,83% (N = 53) das amostras negativas no SCF do grupo  
367 controle foram negativas na cultura realizada pelo laboratório de referência. Os  
368 patógenos isolados foram *Klebsiella pneumoniae* (N = 3), estafilococos coagulase-  
369 negativa (N = 2) e *Corynebacterium spp.* (N = 1). Cinco amostras foram extraviadas  
370 durante o transporte.

No momento D0, 87,72% (N = 50) das amostras negativas no SCF do grupo cetoprofeno foram negativas na cultura realizada pelo laboratório de referência. Os patógenos isolados foram *Corynebacterium spp.* (N = 2), estafilococos coagulase-negativa (N = 2), *Enterococcus spp.* (N = 1), *Streptococcus spp.* (N = 1) e levedura (N = 1). Sete amostras foram extraviadas durante o transporte e uma amostra foi considerada contaminada.

O intervalo mediano entre o caso de MC e as coletas do D14 e D21 foi de 14,0 e 21 dias no grupo cetoprofeno e no grupo controle, respectivamente (Tabela 2).

### ***Efeito do tratamento***

**Cura clínica.** Onze e 9 quartos foram censurados e a proporção de cura clínica foi de 83,08% e 85,94% nos grupos cetoprofeno e controle, respectivamente (Tabela 3).

Nenhuma das variáveis explanatórias testadas foi associada ao tempo de cura clínica.

Dessa forma, o modelo final incluiu forçadamente o efeito do grupo e fazenda como termo aleatório (Tabela 4). O risco relativo de cura clínica não foi diferente entre os grupos experimentais ( $P = 0,60$ ; Figura 2 e Tabela 4).

**Recidiva e recorrência de mastite clínica.** Quarenta e quatro e 46 quartos foram censurados e a proporção de recidiva foi de 18,52% e 18,18% nos grupos cetoprofeno e controle, respectivamente (Tabela 3). O modelo final (recidiva) incluiu o efeito do grupo e fazenda como termo aleatório (Tabela 4). O risco relativo de recidiva não foi diferente entre os grupos experimentais (Figura 2 e Tabela 4).

Quarenta e cinco e 47 quartos foram censurados e a proporção de recorrência foi de 16,67% e 16,36% nos grupos cetoprofeno e controle, respectivamente (Tabela 3). O modelo final (recorrência) incluiu forçadamente o efeito do grupo e fazenda como termo



396 aleatório (Tabela 4). O risco relativo de recorrência não foi diferente entre os grupos  
 397 experimentais (Figura 2 e Tabela 4).

398

399 **Risco de nova infecção intramamária.** No momento D14, 20,75% e 30,19% dos  
 400 quartos tiveram novas IIM nos grupos cetoprofeno e controle, respectivamente (Tabela  
 401 3). Nenhuma das variáveis explanatórias testadas foi associada às chances de uma nova  
 402 IMI em D14. O modelo final de regressão logística incluiu o efeito fixo do grupo e  
 403 fazenda como termo aleatório (Tabela 4). As chances de uma nova IMI em D14 não  
 404 foram diferentes entre os grupos experimentais (Tabela 4).

405 Dos quartos com cultura negativa em D0 e cultura positiva em D14 (nova IIM),  
 406 foram isolados, no grupo cetoprofeno, *Streptococcus* spp. (N = 4), estafilococos  
 407 coagulase-negativa (N = 3), *Corynebacterium* (N = 2), Levedura (N = 1) e *Bacillus* spp.  
 408 (N = 1). No grupo controle os patógenos isolados foram estafilococos coagulase-  
 409 negativa (N = 6), *Bacillus* spp. (N = 2), *Corynebacterium* (N = 2), *Streptococcus* spp.  
 410 (N = 2), *Klebsiella pneumoniae* (N = 1), *Klebsiella oxytoca* (N = 1), *Trueperella*  
 411 *pyogenes* (N = 1) e infecção mista (N = 1).

412 No momento D21, 28,57% e 15,69% dos quartos tiveram novas IIM nos grupos  
 413 cetoprofeno e controle, respectivamente (Tabela 3). Nenhuma das variáveis  
 414 explanatórias testadas foi associada às chances de uma nova IIM em D21. O modelo  
 415 final de regressão logística incluiu o efeito fixo do grupo e fazenda como termo  
 416 aleatório (Tabela 4). As chances de uma nova IMI em D21 não foram diferentes entre  
 417 os grupos experimentais (Tabela 4).

418 Dos quartos com cultura negativa em D0 e cultura positiva em D21 (nova IIM)  
 419 foram isolados, no grupo cetoprofeno, *Streptococcus* spp. (N = 5), estafilococos  
 420 coagulase-negativa (N = 2), *Corynebacterium* (N = 1), *Enterococcus* (N = 1),

421 *Escherichia coli* (N = 1), *Klebsiella oxytoca* (N = 1) e *Pseudomonas spp.* (N = 1). No  
422 grupo controle os patógenos isolados foram estafilococos coagulase-negativa (N = 3),  
423 *Bacillus spp.* (N = 2), *Klebsiella oxytoca* (N = 1), *Trueperella pyogenes* (N = 1) e  
424 *Prototheca spp.* (N = 1).

425

426 **Contagem de células somáticas.** Apesar da CCS média ter diminuído entre D14 e D21  
427 em ambos os grupos, não houve diferença significativa entre os dias de amostragem ou  
428 grupos experimentais (Figura 5).

429

430

## DISCUSSÃO

431

432 A hipótese científica do presente estudo foi que o tratamento IM de casos  
433 naturais de MC com cetoprofeno no momento do diagnóstico negativo no SCF poderia  
434 resultar em benefícios, incluindo retorno mais rápido do leite ao aspecto normal,  
435 diminuição do risco de recidiva, recorrência e novas IIM, assim como diminuição mais  
436 rápida da CCS a níveis basais após o caso de MC. O cetoprofeno foi o fármaco de  
437 escolha porque possui características desejáveis para o tratamento de MC, tais como  
438 rápido início de ação, potente ação anti-inflamatória e ausência da necessidade de  
439 descarte do leite, justificando assim o uso em casos de MC não tratados com  
440 antimicrobianos.

441

442 Tais benefícios do uso dos AINES seriam decorrentes da atenuação dos efeitos  
443 deletérios causados pelo processo inflamatório no tecido da glândula mamária e no leite.  
444 No processo inflamatório ocorre influxo maciço de leucócitos, oriundo da corrente  
445 sanguínea para a glândula mamária, com objetivo de combater o agente agressor.  
Durante a ação fagocitária e apoptose dos leucócitos e células epiteliais, ocorre

446 liberação de substâncias, tais como citocinas pró-inflamatórias, radicais de oxigênio,  
447 peroxidases e proteases (Aitken, et al., 2011) que, juntamente com os danos causados  
448 pelo agente agressor, provocam destruição do tecido alveolar e dos componentes do  
449 leite, comprometendo a quantidade e qualidade do leite produzido (Sordillo et al.,  
450 1997).

451 Os poucos estudos que investigaram o efeito dos AINES em casos naturais de  
452 MC utilizaram principalmente meloxicam e sugerem alguns efeitos benéficos de uma  
453 aplicação IM no momento do tratamento dos casos, principalmente em índices  
454 reprodutivos, melhora dos sinais inflamatórios na glândula mamária e na CCS após o  
455 caso (Shpigel et al., 1994; McDougall et al., 2009; McDougall et al., 2016). O efeito dos  
456 AINES na taxa de cura microbiológica de MC ainda é controverso. Enquanto alguns  
457 estudos não reportaram efeitos positivos (McDougall et al., 2009), apenas um estudo  
458 (McDougall et al., 2016) reportou aumento da taxa de cura microbiológica após  
459 tratamento IMM de MC com cefalexina e canamicina associadas ao meloxicam IM (taxa  
460 de cura = 66%), quando comparado ao grupo tratado apenas com os antimicrobianos  
461 (taxa de cura = 50%). Poucos estudos avaliaram o efeito do cetoprofeno no tratamento  
462 de MC (Shpigel et al., 1994; Banting et al., 2008; Dan et al., 2018). No entanto,  
463 desfechos relevantes como cura clínica e microbiológica, efeito na ocorrência de  
464 recidiva e recorrência de MC não foram estudados.

465 No presente estudo não houve evidência da eficácia do cetoprofeno no  
466 tratamento de casos de MC sem isolamento de patógenos e que não receberam  
467 tratamento com antimicrobianos. Além da similaridade entre os grupos experimentais  
468 no tempo de retorno do leite ao aspecto normal, foi observada tendência (não  
469 estatisticamente significativa) de cura clínica mais rápida nos quartos inseridos no grupo  
470 controle, sugerindo que a utilização do cetoprofeno poderia resultar em retorno mais

471 lento do leite ao aspecto normal. Esta hipótese pode ser explicada pela supressão da  
472 atividade das células responsáveis pela reparação do tecido mamário.

473 Dan et al. (2018) estudaram o efeito do cetoprofeno IMM durante a resposta  
474 imune induzida por lipopolissacarídeos na glândula mamária e demonstraram, *in vivo* e *in*  
475 *vitro*, que houve supressão do aumento da CCS e redução dos danos à barreira hemato-  
476 láctea (com base na concentração de albumina sérica e da enzima lactato  
477 desidrogenase), redução da concentração de IgG e da expressão de vários fatores  
478 inflamatórios no leite durante o curso do processo inflamatório. Os autores discutem a  
479 hipótese de que tais alterações poderiam reduzir o sucesso da defesa contra a infecção.  
480 Em concordância com estudos anteriores (McDougall et al., 2009; Dan et al., 2018), nos  
481 animais amostrados, embora de forma não significativa, foi observada diminuição  
482 numérica da CCS no leite após o tratamento com cetoprofeno (D14). Dessa forma, mais  
483 estudos incluindo casos naturais de MC são necessários para confirmar essa hipótese.

484 Não foram encontradas também diferenças entre os grupos experimentais nas  
485 variáveis recidiva e recorrência de MC e presença de nova IIM em D14 e D21. Swartz  
486 et al. (2018) observaram que vacas que receberam meloxicam antes ou após o parto  
487 tiveram menor incidência de MC quando comparadas ao grupo não tratado, sugerindo  
488 que os AINES poderiam ter efeito preventivo de MC. No entanto, nenhum estudo  
489 investigou o efeito preventivo do cetoprofeno na ocorrência de MC. No presente estudo,  
490 apesar de nenhuma tendência ter sido observada, o tamanho amostral não foi calculado  
491 para detectar diferenças significativas entre o risco de recidiva e recorrência de MC.

492 Foi observado que 12 e 10% das amostras cultura-negativas no SCF em D0 dos  
493 grupos cetoprofeno e controle, respectivamente, foram positivas na cultura realizada  
494 pelo laboratório de referência. Estas amostras não foram excluídas das análises de cura  
495 clínica, recidiva e recorrência de MC e CCS, pois o objetivo do estudo foi avaliar o

efeito do cetoprofeno em amostras cultivadas nas fazendas. Como a distribuição dos resultados falso negativos foi homogênea entre os grupos experimentais, não é provável que nenhum viés tenha sido introduzido. Esses achados podem ser explicados pelas diferenças metodológicas entre as culturas realizadas na fazenda e no laboratório referência. Uma das principais diferenças seria o tempo de incubação (24 horas na fazenda e 72 horas no laboratório referência), possibilitando o isolamento de patógenos de isolamento lento, tais como *Corynebacterium spp.*, *Prototheca spp.*, *Nocardia spp.* e *Trueperella pyogenes* (Markey et al, 2013). Este fato reforça a importância de que casos de MC não devem ser somente cultivados na fazenda, mas também enviados para laboratórios de referência, para evitar erros diagnósticos e, principalmente resultados falso negativos.

Quanto a validade externa do estudo, os rebanhos estudados eram compostos de animais da raça holandesa de alta produção leiteira e que eram alojadas em sistema de confinamento, condições que podem ser extrapoladas para rebanhos leiteiros com características semelhantes em outros países.

511

### 512 ***Limitações do estudo***

Uma das limitações deste estudo foi a falta de avaliação dos sinais clínicos dos casos de MC (gravidade e presença ou ausência de alterações no leite) no turno da noite. Todas as fazendas participantes, ao conhecerem a proposta da pesquisa, mencionaram que dificilmente conseguiriam realizar tal avaliação no turno da noite devido ao menor número de funcionários trabalhando neste período. Esse fato pode ter resultado em superestimação do tempo até a cura clínica, pois casos que retornaram ao normal no turno da noite só foram avaliados no próximo dia pela manhã. Porém, não é provável

520 que tenha ocorrido viés no estudo porque tal imprecisão diagnóstica foi distribuída  
521 aleatoriamente entre os grupos experimentais.

522 Ademais, apesar de casos de MC moderada participaram do estudo, apenas seis  
523 casos foram incluídos, todos aleatoriamente alocados no grupo controle. Isso se deve,  
524 provavelmente, à necessidade percebida pelos produtores, de tratamento com anti-  
525 inflamatórios e antimicrobianos de tais casos. Em dois desses casos foi observada piora  
526 nos sinais clínicos e, em um dos casos, não houve cura clínica em 7 dias, resultando na  
527 censura durante o período de observação. No entanto, mesmo com a concentração dos  
528 casos com menor probabilidade de cura no grupo controle, e possível subestimação da  
529 diferença entre grupos, os resultados indicam que a hipótese de maior risco de cura  
530 clínica no grupo cetoprofeno não foi confirmada.

531

## 532 **CONCLUSÕES**

533

534 Os resultados sugerem que o uso de cetoprofeno em casos de MC sem  
535 isolamento microbiano no SCF não resulta em retorno mais rápido do leite ao aspecto  
536 normal, diminuição do risco de recidiva, recorrência e novas IIM, assim como  
537 diminuição mais rápida da CCS a níveis basais após o caso de MC.

538

## 539 **AGRADECIMENTOS**

540

541 Agradecemos aos produtores rurais e funcionários participantes do estudo pela  
542 cooperação voluntária, em especial Sérgio Soriano, Morivaldo Silva, Ricardo Araújo,  
543 Fábio Lucas Resende de Gouvêa e Ananda Finco de César Lopes. Agradecemos a  
544 CEVA Saúde Animal pela doação de parte dos medicamentos utilizados nesse estudo. A

545 bolsa de mestrado de Giulia S. Latosinski foi financiada pela Fundação de Amparo à  
 546 Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2017/20576-5.

547

## 548 **REFERÊNCIAS**

549

550 Aitken, S. L., Corl, C. M., & Sordillo, L. M. 2011. Immunopathology of mastitis:  
 551 insights into disease recognition and resolution. Journal of mammary gland  
 552 biology and neoplasia, 16(4), 291-304.

553 Banting, A.; Banting, S.; Heinonen, K.; Mustonen, K. 2008. Efficacy of oral and  
 554 parenteral ketoprofen in lactating cows with endotoxin-induced acute mastitis.  
 555 Vet Rec. 163(17):506-509.

556 Cardoso, C. S., Hotzel, M. J., Weary, D. M., Robbins, J. A., Marina, A. G., Von  
 557 Keyserlingk, M. A. 2016. Imagining the ideal dairy farm. J Dairy Sci.  
 558 99(2):1663–1671.

559 Cortinhas, C.S., Tomazi, T., Zoni, M.S.F., Moro, E., Santos, M.V. 2016. Randomized  
 560 clinical trial comparing ceftiofur hydrochloride with a positive control protocol  
 561 for intramammary treatment of nonsevere clinical mastitis in dairy cows. J Dairy  
 562 Sci. 99(7):5619-5628.

563 Dan, D., Bruckmaier, R.M., Wellnitz, O. 2018. Ketoprofen affects the mammary  
 564 immune response in dairy cows in vivo and in vitro. J Dairy Sci. 101(12):11321-  
 565 11329.

566 Dohoo, I. R.; Martin, W.; Stryhn, H. E. Veterinary Epidemiologic Research. 2<sup>nd</sup> ed.  
 567 VER Inc., Charlottetown, Prince Edward Island, Canadá, 2010.

- 568 Friedman, L. M.; Furberg, C.; Demets, D. L.; Reboussin, D. M.; Granger, C. B. 2010.  
569 Fundamentals of clinical trials. 4<sup>th</sup> ed. New York, USA: Springer International  
570 Publishing; 2010.
- 571 Halasa, T., huijps, K., osteras, O., hogeveen, H. 2007. Economic effects of bovine  
572 mastitis and mastitis management: A review. *Vet. Q.* 29(1):18–31.
- 573 Kantor, T. G. 1986. A review of its pharmacologic and clinical properties.  
574 *Pharmacotherapy.* 6(3):93–103.
- 575 Kayitsinga, J.; Schewe, R. L.; Contreras G. A.; Erskine R. J. 2017. Antimicrobial  
576 treatment of clinical mastitis in the eastern United States: The influence of dairy  
577 farmers' mastitis management and treatment behavior and attitudes. *J Dairy Sci.*  
578 100(2):1388–1407.
- 579 Lago, A., Godden, S. M., Bey, R., Ruegg, P. L., Leslie, K. 2011a. The selective  
580 treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on  
581 antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological  
582 outcomes. *J Dairy Sci.* 94(9):4441-4456.
- 583 Lago, A., Godden, S. M., Bey, R., Ruegg, P. L., Leslie, K. 2011b. The selective  
584 treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: II. Effects on  
585 lactation performance, including clinical mastitis recurrence, somatic cell count,
- 586 Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A., Maguire, D. Clinical  
587 *Veterinary Microbiology.* 2 ed. Dublin: Elsevier, 2013.
- 588 McDougall, S., Abbeloos E., Piepers S., Rao, A. S., Astiz S., Van Werven, T., Statham,  
589 J., Pérez-Villalobos, N. 2016. Addition of meloxicam to the treatment of clinical  
590 mastitis improves subsequent reproductive performance. *J. Dairy Sci.* 99(3):1-  
591 17.



- 592 McDougall, S., Arthur, D.G., Bryan, M.A., Vermunt, J.J., Weir, A.M. 2007. Clinical  
593 and bacteriological response to treatment of clinical mastitis with one of three  
594 intramammary antimicrobials. *N Z Vet J.* 55(4):161-170.
- 595 Mcdougall, S., Bryan, M.A., Tiddy, R.M. 2009. Effect of treatment with the  
596 nonsteroidal antiinflammatory meloxicam on milk production, somatic cell  
597 count, probability of retreatment, and culling of dairy cows with mild clinical  
598 mastitis. *J. Dairy Sci.* 92(9):4421-4431.
- 599 NOAH. 2018. Rifen 100 mg/ml solution for injection for horses, cattle and swine:  
600 Further information. Accessed Sep. 20, 2018.  
601 <http://www.noahcompendium.co.uk/?id=-449368>.
- 602 Nobrega, D. B., De Buck, J., Naqvi, S. A., Liu, G., Naushad, S., Saini, V., Barkema, H.  
603 W. 2017. Comparison of treatment records and inventory of empty drug  
604 containers to quantify antimicrobial usage in dairy herds. *J. Dairy Sci.* 100(12),  
605 9736-9745.
- 606 Oliveira, L., Ruegg, P.L. 2014. Treatments of clinical mastitis occurring in cows on 51  
607 large dairy herds in Wisconsin. *J. Dairy Sci.* 97(9):5426–5436.
- 608 Redding, L. E., Bender, J., Baker, L. 2019. Quantification of antibiotic use on dairy  
609 farms in Pennsylvania. *J. Dairy Sci.* 102(2), 1494-1507.
- 610 Sargeant, J.M., O'Connor A., Dohoo I.R, Erb H.N., Cevallos M., Egger M., Ersbøll  
611 A.K., Martin S.W., Nielsen L.R., Pearl D.L., Pfeiffer D.U., Sanchez J., Torrence  
612 M.E., Vigre H., Waldner C., Ward M.P. 2016. Methods and processes of  
613 developing the strengthening the reporting of observational studies in  
614 epidemiology – veterinary (STROBE-Vet) statement. *Prev Vet Med.* 134:188–  
615 196.

- 616 Shpigel, N. Y., Chen, R., Winkler, M., Saran, A., ZIV, G., Longo, F. 1994. The anti-  
617 inflammatory ketoprofen in the treatment of field cases of bovine mastitis. Res  
618 Vet Sci. 56(1):62–68,
- 619 Sordillo, L.M.; Shafer-Weaver, K.; Derosa, D. 1997. Immunobiology of the mammary  
620 Gland. J. Dairy Sci. 80(8):1851-1865.
- 621 Swartz, T.H., Schramm, H.H., Bewley, J.M., Wood, C.M., Leslie, K.E., Petersson-  
622 Wolfe, C.S. 2018. Meloxicam administration either prior to or after parturition:  
623 Effects on behavior, health, and production in dairy cows. J Dairy Sci.  
624 101(11):1–17.
- 625 Vane, J.R., Botting R.M. 1998. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs: an  
626 overview. In: Vane J., Botting J. (eds) Selective COX-2 Inhibitors. Springer,  
627 Dordrecht.
- 628 Vasquez, A. K., Nydam, D. V., Capel, M. B., Eicker, S., & Virkler, P. D. 2017. Clinical  
629 outcome comparison of immediate blanket treatment versus a delayed pathogen-  
630 based treatment protocol for clinical mastitis in a New York dairy herd. J. Dairy  
631 Sci. 100(4):2992-3003.
- 632 Wenz, J. R.; Barrington, G. M.; Garry, F. B.; Dinsmore, R. P.; Callan, R. J. 2001. Use  
633 of systemic disease signs to assess disease severity in dairy cows with acute  
634 coliform mastitis. Javma-J Am Vet Med A. 218(4):567-572.
- 635
- 636
- 637
- 638
- 639
- 640

641 **Tabela 1.** Características dos rebanhos bovinos leiteiros participantes do estudo.

| Variável                                                           | Rebanho     |             |              |
|--------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|--------------|
|                                                                    | A           | B           | C            |
| CCS do tanque (x1000 células/mL) <sup>1</sup>                      | 203         | 109         | 165          |
| Número de vacas em lactação                                        | 285         | 890         | 2020         |
| Produção de leite (kg/vaca/dia)                                    | 37,0        | 31,0        | 38,3         |
|                                                                    | N (%)       | N (%)       | N (%)        |
| Paridade <sup>2</sup>                                              |             |             |              |
| 1                                                                  | 97 (34,03)  | 287 (32,24) | 906 (44,85)  |
| ≥ 2                                                                | 188 (65,97) | 603 (67,76) | 1114 (55,15) |
| Quartos incluídos no estudo <sup>3</sup>                           | 44 (34,11)  | 5 (3,88)    | 80 (62,02)   |
| Gravidade do caso de mastite clínica <sup>2</sup>                  |             |             |              |
| Leve                                                               | 35 (89,74)  | 4 (80,00)   | 75 (100,00)  |
| Moderada                                                           | 5 (11,36)   | 1 (20,00)   | 0 (0,00)     |
| Número de quartos incluídos por grupo experimental <sup>2, 4</sup> |             |             |              |
| Cetoprofeno                                                        | 20 (45,45)  | 2 (40,00)   | 43 (53,75)   |
| Controle                                                           | 24 (54,55)  | 3 (60,00)   | 37 (46,25)   |

642 <sup>1</sup>Média geométrica da contagem de células somáticas no leite do tanque dos três últimos  
 643 meses de participação no estudo.

644 <sup>2</sup> Percentagens se referem ao total da coluna.

645 <sup>3</sup> Percentagens se referem ao total da linha.

646 <sup>4</sup> Cetoprofeno: tratado com uma injeção intramuscular de cetoprofeno na dosagem de 3  
 647 mg/kg de peso vivo; controle: não recebeu tratamento.

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

**Tabela 2.** Características dos animais, quartos e casos de mastite clínica após alocação randomizada nos grupos experimentais.

| Variável                                 | Grupo experimental <sup>1</sup>    |                        | Valor-P <sup>2</sup> |
|------------------------------------------|------------------------------------|------------------------|----------------------|
|                                          | Cetoprofeno                        | Controle               |                      |
|                                          | N (%)                              | N (%)                  |                      |
| Quartos incluídos no estudo <sup>3</sup> | 65                                 | 64                     | 0,97                 |
| AD                                       | 23 (35,38)                         | 20 (34,38)             |                      |
| AE                                       | 18 (29,23)                         | 17 (26,56)             |                      |
| PD                                       | 7 (10,77)                          | 7 (10,94)              |                      |
| PE                                       | 16 (24,62)                         | 18 (28,13)             |                      |
| Gravidade do caso de MC                  |                                    |                        | 0,01                 |
| Leve                                     | 65 (100,00)                        | 58 (90,63)             |                      |
| Moderado                                 | 0 (0,00)                           | 6 (9,38)               |                      |
| % culturas negativas em D0 <sup>4</sup>  | 50 (87,72)                         | 53 (89,83)             | 0,71                 |
|                                          | <b>Mediana (Q1-Q3)<sup>6</sup></b> | <b>Mediana (Q1-Q3)</b> |                      |
| Paridade                                 | 2,00 (2,00-3,00)                   | 3,00 (2,00-3,00)       | 0,04                 |
| DEL em D0 <sup>5</sup>                   | 137,00 (75,00-227,00)              | 111,00 (72,00-213,00)  | 0,57                 |
| Intervalo médio D0-D14 (dias)            | 14,00 (13,00-16,00)                | 14,00 (13,50-16,00)    | 0,87                 |
| Intervalo médio D0-D21 (dias)            | 21,00 (20,00-23,00)                | 21,00 (21,00-24,00)    | 0,89                 |

<sup>1</sup> Cetoprofeno: tratado com uma injeção intramuscular de cetoprofeno na dosagem de 3

mg/kg de peso vivo; controle: não recebeu tratamento.

<sup>2</sup> Teste de Wilcoxon para variáveis contínuas e teste de Qui-quadrado para variáveis categóricas.

<sup>3</sup> Anterior direito (AD), anterior esquerdo (AE), posterior direito (PD) e posterior esquerdo (PE).

<sup>4</sup> Percentagem de quartos com cultura negativa no sistema de cultura na fazenda que foram negativos na cultura realizada no laboratório referência.

<sup>5</sup> Dias em lactação na data do caso de mastite clínica.

<sup>6</sup> Mediana (1º quartil – 3º quartil).

675 **Tabela 3.** Estatísticas descritivas dos desfechos estudados, por grupo experimental.

| Variável                              | Grupo experimental <sup>1</sup> |              |                        |              |
|---------------------------------------|---------------------------------|--------------|------------------------|--------------|
|                                       | Cetoprofeno                     |              | Controle               |              |
|                                       | Total                           | N (%)        | Total                  | N (%)        |
| Cura clínica <sup>2</sup>             | 65                              | 54 (83,08)   | 64                     | 55 (85,94)   |
| Recidiva de MC <sup>3</sup>           | 54                              | 10 (18,52)   | 55                     | 10 (18,18)   |
| Recorrência de MC <sup>4</sup>        | 54                              | 9 (16,67)    | 55                     | 9 (16,36)    |
| Risco de nova IIM em D14 <sup>5</sup> | 53                              | 11 (20,75)   | 53                     | 16 (30,19)   |
| Risco de nova IIM em D21 <sup>6</sup> | 42                              | 12 (28,57)   | 51                     | 8 (15,69)    |
|                                       | <b>Mediana (Q1-Q3)</b>          |              | <b>Mediana (Q1-Q3)</b> |              |
| Tempo até a cura clínica (dias)       | 54                              | 1,00 (1-1,5) | 55                     | 1,00 (1-1,5) |
| Tempo até recidiva (dias)             | 10                              | 4,7 (3-5,0)  | 10                     | 3,75 (3-6,0) |
| Tempo até recorrência (dias)          | 9                               | 34 (30-45)   | 9                      | 34 (33-65)   |
| CCS D14 (log10 cel/mL)                | 57                              | 5,39 (0,07)  | 54                     | 5,50 (0,08)  |
| CCS D21 (log10 cel/mL)                | 52                              | 5,39 (0,08)  | 55                     | 5,42 (0,07)  |

676 <sup>1</sup> Cetoprofeno: tratado com uma injeção intramuscular de cetoprofeno na dosagem de 3

677 mg/kg de peso vivo; controle: não recebeu tratamento.

678 <sup>2</sup> Regressão dos sinais clínicos em até 7 dias após a inclusão no estudo.

679 <sup>3</sup> Ocorrência de cura clínica seguida de observação de sinais clínicos de mastite até 14

680 dias após a inclusão do caso no estudo.

681 <sup>4</sup> Ocorrência de cura clínica e posterior observação de sinais clínicos entre 15 e 90 dias

682 após a inclusão do caso no estudo.

683 <sup>5</sup> Quartos com cultura negativa em D0 e cultura positiva em D14.

684 <sup>6</sup> Quartos com cultura negativa em D0 e cultura positiva em D21.

685

686

687

688

689

690

691

692 **Tabela 4.** Análise multivariada para comparação dos desfechos estudados entre os grupos  
 693 experimentais.

| Variável                             | Coefficiente | EP <sup>1</sup> | Valor-P | RR ou RC <sup>2</sup> | IC 95% <sup>3</sup> |
|--------------------------------------|--------------|-----------------|---------|-----------------------|---------------------|
| <b>Cura clínica<sup>4</sup></b>      |              |                 |         |                       |                     |
| Cetoprofeno                          | Referência   |                 |         | Referência            |                     |
| Controle                             | 0,09         | 0,19            | 0,60    | 1,10                  | 0,75-1,60           |
| <b>Recidiva de MC<sup>5</sup></b>    |              |                 |         |                       |                     |
| Grupo <sup>6</sup>                   |              |                 |         |                       |                     |
| Cetoprofeno                          | Referência   |                 |         | Referência            |                     |
| Controle                             | 0,04         | 0,44            | 0,91    | 1,05                  | 0,43-2,52           |
| <b>Recorrência de MC<sup>7</sup></b> |              |                 |         |                       |                     |
| Grupo                                |              |                 |         |                       |                     |
| Cetoprofeno                          | Referência   |                 |         | Referência            |                     |
| Controle                             | -0,19        | 0,47            | 0,68    | 0,82                  | 0,33-2,07           |
| <b>Risco de nova IMI<sup>8</sup></b> |              |                 |         |                       |                     |
| D14                                  |              |                 |         |                       |                     |
| Intercepto                           | -2,05        | 0,89            |         |                       |                     |
| Grupo <sup>6</sup>                   |              |                 |         |                       |                     |
| Cetoprofeno                          | Referência   |                 | 0,15    | Referência            |                     |
| Controle                             | 0,67         | 0,47            |         | 1,97                  | 0,76-5,11           |
| <b>Risco de nova IMI<sup>9</sup></b> |              |                 |         |                       |                     |
| D21                                  |              |                 |         |                       |                     |
| Intercepto                           | -0,91        | 0,34            |         |                       |                     |
| Grupo                                |              |                 |         |                       |                     |
| Cetoprofeno                          | Referência   |                 | 0,14    | Referência            |                     |
| Controle                             | -0,76        | 0,51            |         | 0,46                  | 0,16-1,29           |
| <b>CCS</b>                           |              |                 |         |                       |                     |
| Intercepto                           |              |                 |         |                       |                     |
|                                      | 5,36         | 0,08            |         |                       |                     |
| Grupo                                |              |                 |         |                       |                     |
| Cetoprofeno                          | 0            |                 | 0,20    |                       |                     |
| Controle                             | 0,09         | 0,10            |         |                       |                     |
| Dia                                  |              |                 |         |                       |                     |
| D14                                  | 0,03         | 0,09            | 0,45    |                       |                     |
| D21                                  | 0            |                 |         |                       |                     |
| Grupo*Dia                            |              |                 |         |                       |                     |
| Controle D14                         | 0,04         | 0,13            | 0,75    |                       |                     |
| Controle D21                         | 0            |                 |         |                       |                     |
| Tratamento D14                       | 0            |                 |         |                       |                     |
| Tratamento D21                       | 0            |                 |         |                       |                     |

694 <sup>1</sup> Erro padrão.

695 <sup>2</sup> Risco relativo (modelos de Cox de riscos proporcionais) ou Razão das chances (modelos  
696 de regressão logística).

697 <sup>3</sup> Intervalo de confiança 95%.

698 <sup>4</sup> Regressão dos sinais clínicos em até 7 dias após a inclusão do caso.

699 <sup>5</sup> Ocorrência de cura clínica seguida de observação de sinais clínicos de mastite até 14  
700 dias após a inclusão do caso no estudo.

701 <sup>6</sup> Cetoprofeno: tratado com uma injeção intramuscular de cetoprofeno na dosagem de 3  
702 mg/kg de peso vivo; controle: não recebeu tratamento.

703 <sup>7</sup> Ocorrência de cura clínica e posterior observação de sinais clínicos entre 15 e 90 dias  
704 após a inclusão do caso no estudo.

705 <sup>8</sup> Quartos com cultura negativa em D0 e cultura positiva em D14.

706 <sup>9</sup> Quartos com cultura negativa em D0 e cultura positiva em D21.

707

708

709

710

711

712

713

714

715

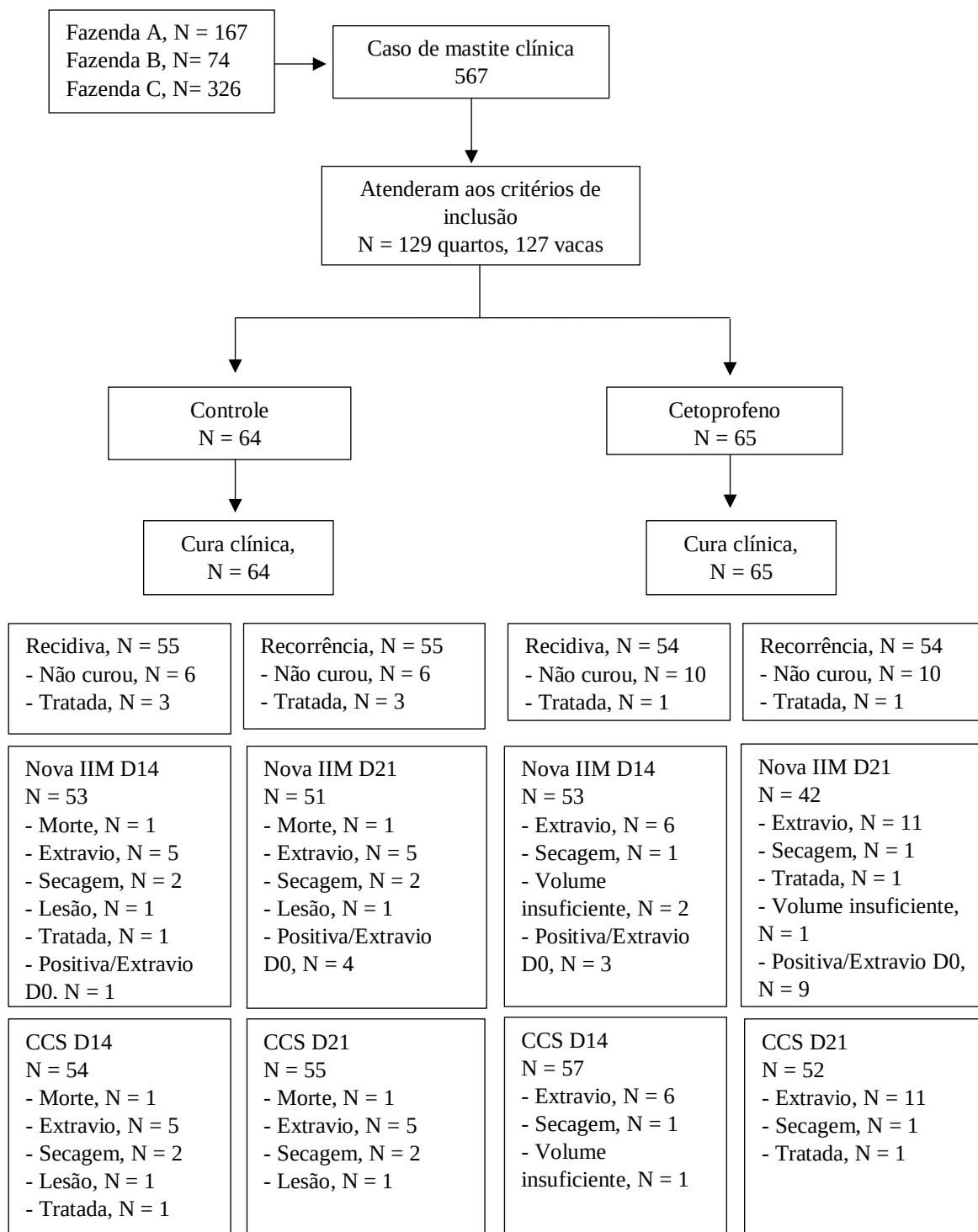
716

717

718

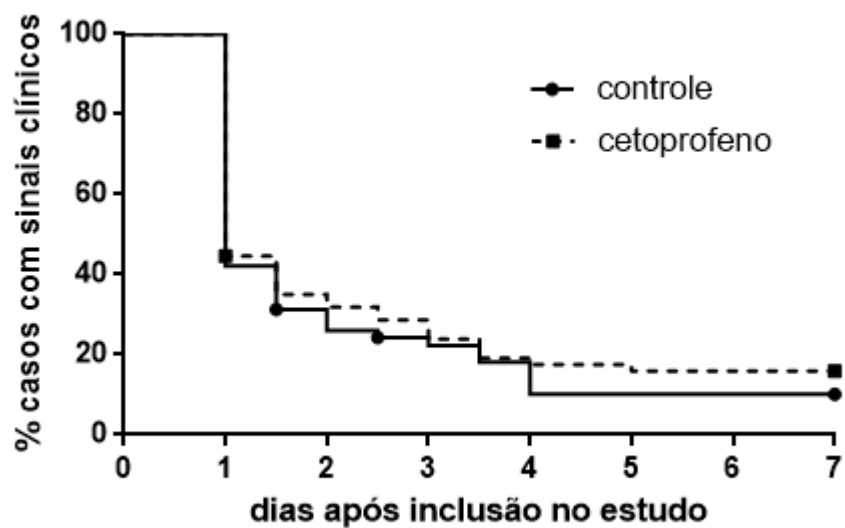
719

Latosinski, Figura 1.

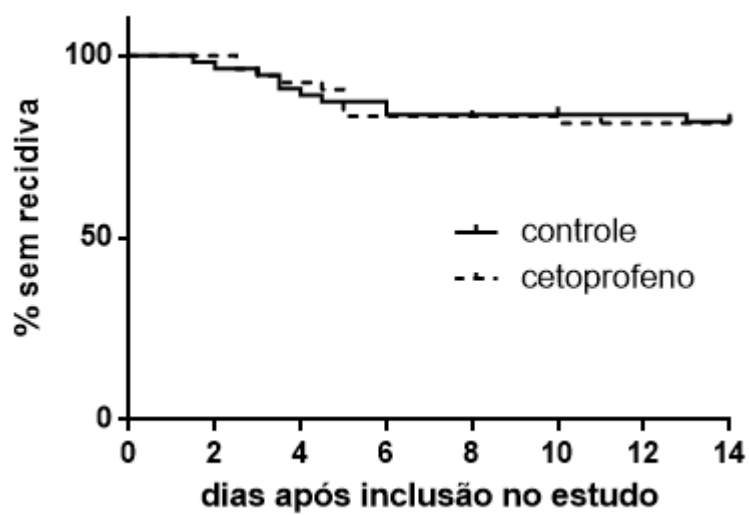




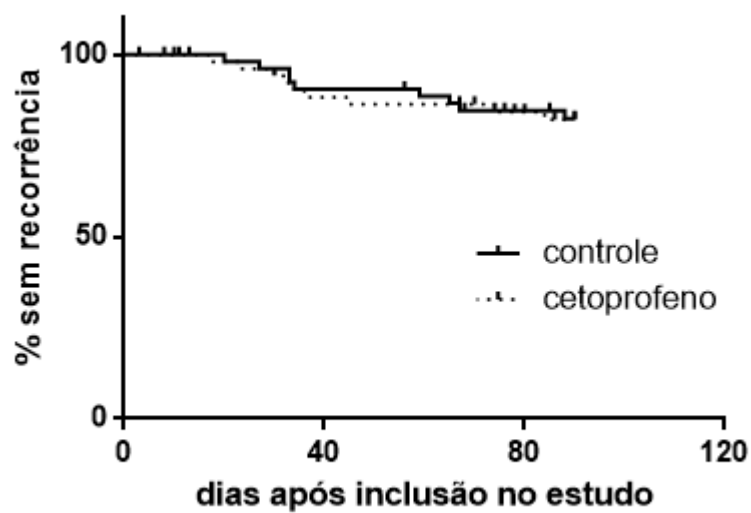
745 Latosinski, Figura 2.



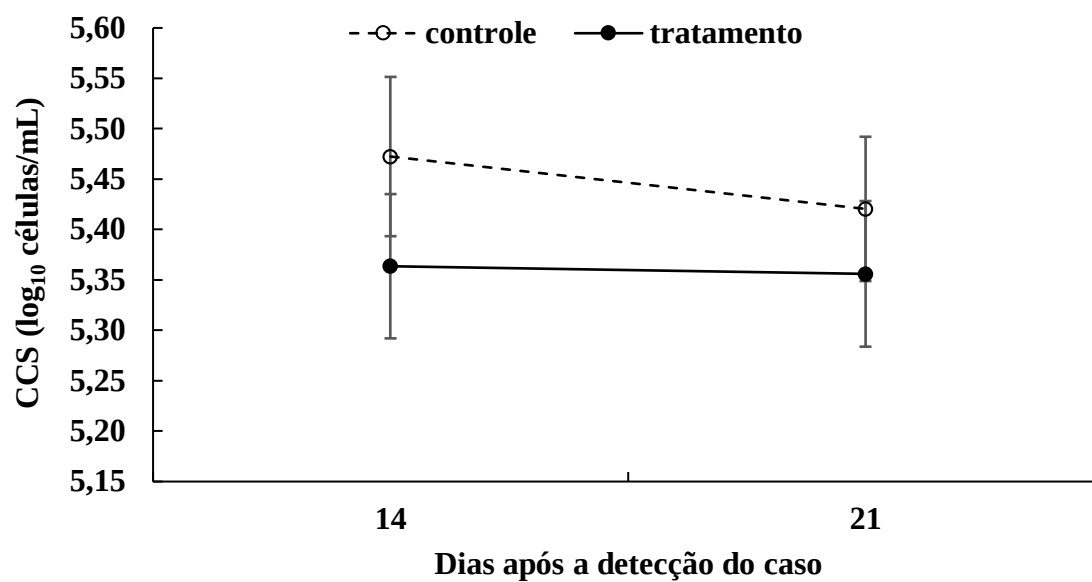
762 Latosinski, Figura 3.



781 Latosinski, Figura 4.



799 **Latosinski, Figura 5.**



**Figura 1.** Fluxograma do conjunto de dados utilizado para análise. Cetoprofeno: tratado com uma injeção intramuscular de cetoprofeno na dosagem de 3 mg/kg de peso vivo; controle: não recebeu tratamento. Cura clínica: regressão dos sinais clínicos em até 7 dias após a inclusão no estudo. Recidiva de MC: ocorrência de cura clínica seguida de observação de sinais clínicos de mastite até 14 dias após a inclusão do caso no estudo. Recorrência de MC: ocorrência de cura clínica e posterior observação de sinais clínicos entre 15 e 90 dias após a inclusão do caso no estudo. Nova infecção intramamária (IMM) em D14: quartos com cultura negativa em D0 e cultura positiva em D14. Nova IMM em D21: quartos com cultura negativa em D0 e cultura positiva em D21. CCS em D14: CCS (células/mL) das amostras de leite coletadas em D14. CCS em D21: CCS (células/mL) das amostras de leite coletadas em D21

**Figura 2.** Curva de sobrevivência representando o tempo de cura clínica (retorno do leite ao aspecto normal) em até 7 dias após a inclusão do quarto no estudo, nos dois grupos experimentais.

**Figura 3.** Curva de sobrevivência representando o tempo de recidiva no mesmo quarto mamário até 14 dias após a inclusão do quarto no estudo, nos dois grupos experimentais.

**Figura 4.** Curva de sobrevivência representando o tempo de recorrência no mesmo quarto mamário até 90 dias após a inclusão do quarto no estudo, nos dois grupos experimentais.

840 **Figura 5.** CCS (log10 e erro padrão) no leite, 14 e 21 dias após o caso de mastite  
841 clínica.

## **CAPÍTULO 3**

### **DISCUSSÃO GERAL**

O uso de AINES em casos de MC é bastante frequente, apesar de poucos estudos terem sido realizados para avaliar o real efeito em desfechos de importância para a saúde da glândula mamária, tais como cura clínica, cura bacteriológica, recidiva e recorrência de MC. O presente estudo teve como principal motivação contribuir com a resposta científica desta questão. Na literatura consultada este é o único estudo que avaliou a eficácia do cetoprofeno em casos de MC caracterizados pela ausência de isolamento de patógenos pelo SCF. A principal hipótese foi que o tratamento IM com cetoprofeno no momento do diagnóstico negativo do SCF poderia resultar em retorno do leite mais rápido ao aspecto normal quando comparado ao grupo não tratado. Porém, não foram observadas diferenças significantes, entre os grupos experimentais, nas variáveis estudadas.

No presente estudo não houve evidência da eficácia do cetoprofeno no tratamento de casos de MC sem isolamento de patógenos e que não receberam tratamento com antimicrobianos. Além da similaridade entre os grupos experimentais no tempo de retorno do leite ao aspecto normal, foi observada tendência de cura clínica mais rápida nos quartos inseridos no grupo controle, sugerindo que a utilização do cetoprofeno poderia resultar em retorno mais lento do leite ao aspecto normal. Esta hipótese pode ser justificada pela supressão da atividade das células responsáveis pela reparação do tecido mamário. Porém, mais estudos incluindo casos naturais de MC são necessários para confirmar essa hipótese. Ademais, ressalta-se a importância de que os casos de MC não devem ser somente cultivados na fazenda, mas também devem ser enviados para diagnóstico em laboratórios de referência, pois a identificação dos micro-organismos causadores de mastite requer experiência. Erros de diagnósticos podem ser frequentemente cometidos por pessoas sem formação na área de microbiologia aplicada a medicina veterinária. Posto que a maioria dos actinomicetos, algas e leveduras – agentes de mastite clínica em vacas – são isolados a partir de 24 horas, que é o tempo de utilização de incubação no SCF, podendo gerar resultados falso-negativos.

### **CONCLUSÃO GERAL**

Os resultados sugerem que o uso de cetoprofeno em casos de MC caracterizados pela ausência de isolamento microbiano no SCF não resulta em retorno mais rápido do

leite ao aspecto normal, diminuição do risco de recidiva, recorrência e novas IIM, assim como diminuição mais rápida da CCS a níveis basais após o caso de MC.

## REFERÊNCIAS

ALLISON, J.R.D. Antibiotic residues in milk. *The British veterinary journal*. v. 141, p.121-124, 1985.

ANDERON, K.L; HUNT, E. Anti-inflammatory therapy in acute endotoxin-induced bovine mastitis. *Veterinary research communications*. v. 13, n. 1, p. 17-26, 1989.

BANTING, A.; BANTING, S.; HEINONEN, K.; MUSTONEN, K. Efficacy of oral and parenteral ketoprofen in lactating cows with endotoxin-induced acute mastitis. *The veterinary record*. v. 163, n. 17, p. 506-509, 2008.

BARNOUIN, J.; BORD, S.; BAZIN, S.; CHASSAGNE, M. Dairy management practices associated with incidence rate of clinical mastitis in low somatic cell score herds in France. *Journal of dairy science*, v. 88, n. 10, p. 3700–3709, 2005.

BOTREL, M.A.; HAENNI, M.; MORIGNAT, E.; SULPICE, P.; MADEC, J.Y.; CALAVAS, D. Distribution and Antimicrobial Resistance of Clinical and Subclinical Mastitis Pathogens in Dairy Cows in Rhône-Alpes, France. *Foodborne pathogens and disease*, v.7, n.5, p.479-487, 2010.

CARDOSO, C. S.; HOTZEL, M. J.; WEARY, D. M.; ROBBINS, J. A.; MARINA, A. G.; VON KEYSERLINGK, M. A. Imagining the ideal dairy farm. *Journal of dairy science*, v. 99, n. 2, p. 1663–1671, 2016.

CHAPINAL, N.; FITZPATRICK, C.E.; LESLIE, K. E.; WAGNER, S.A. short communication: Automated assessment of the effect of flunixin meglumine on rumination in dairy cows with endotoxin-induced mastites. v. 94, n. 1, p. 21-25, 2014.

CORTINHAS, C.S.; TOMAZI, T.; ZONI, M.S.F.; MORO, E.; SANTOS, M.V. Randomized clinical trial comparing ceftiofur hydrochloride with a positive control protocol for intramammary treatment of nonsevere clinical mastitis in dairy cows. *Journal of dairy Science*. v. 99, n. 7, p. 5619-5628, 2016.

CRUPPE. L.H.; FOE. F.H.; FRANCO. F.; VASCONCELOS. C. Characteristics of mastitis agents in Brazilian dairy farms. In: 47º Annual Meeting of the National Mastitis



Council. 2008. New Orleans. Louisiana. Anais. Washington: National Mastitis Council. p. 218-219.

DAN, D.; BRUCKMAIER, R.M.; WELLNITZ, O. Ketoprofen affects the mammary immune response in dairy cows in vivo and in vitro. *Journal of dairy science*, v. 101, n. 12, p. 11321-11329, 2018

DOSOGNE, H.; VANGROENWEGHE, F.; MEHRZAD, J.; MASSART-LEEN, A.M.; BURVENICH, C. Differential Leukocyte Count Method for Bovine Low Somatic Cell Count Milk. *Journal of dairy science*. v. 86, n. 3, p. 828–834, 2003.

DOWN, P.M.; BRADLEY, A.J.; BREEN, J.E.; GREEN, M.J. Factors affecting the cost-effectiveness of on-farm culture prior to the treatment of clinical mastitis in dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*. v. 145, p. 91-99, 2017.

ERSKINE. R. J.; WALKER. R. D.; BOLIN. C. A.; BARTLETT. P. C.; WHITE. D. G. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. *Journal of Dairy Science*. v. 85. n. 5. p. 1111-1118, 2002.

FITZPATRICK, C.E.; CHAPINAL, N.; PETERSSON-WOLFE, C.S.; DEVRIES, T.J.; KELTON, D.F.; DUFFIELD, T.F.; LESLIE, K.E. The effect of meloxicam on pain sensitivity, rumination time, and clinical signs in dairy cows with endotoxin-induced clinical mastitis. *Journal of dairy science*. v. 96, n. 5, p. 2847–2856, 2013.

FUENZALIDA, M. J.; RUEGG, P. L. Negatively controlled, randomized clinical trial to evaluate use of intramammary ceftiofur for treatment of nonsevere culture-negative clinical mastitis. *Journal of dairy science*, v. 102, n. 4, p. 3321-3338, 2019.

GANDA, E.K.; BISINOTTO, R.S.; DECTER, D.H.; BICALHO, R.C. Evaluation of an On-farm Culture System (Accumast) for Fast Identification of Milk Pathogens Associated with Clinical Mastitis in Dairy Cows. *Plos one*. v. 11, n. 5, p. 1-16, 2016.

HALASA, T.; HUIJPS, K.; OSTERAS, O.; HOGEVEEN, H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary Quarterly*, v. 29, n. 1, p. 18–31, 2007.

HEIKKILA, A.M.; LISKI, E.; PYORALA, S.; TAPONEN, S. Pathogen-specific production losses in bovine mastitis. *Journal of dairy science*. v. 101, n. 10, p. 1-12, 2018.

- HEIKKILA, A.M.; NOUSIAINESN, J.I.; PYORALA, S. Costs of clinical mastitis with special reference to premature culling. Costs of clinical mastitis with special reference to premature culling. *Journal of dairy science*. v. 95, n. 1, p. 139–150, 2012.
- HIITIO, H.; RIVA, R.; AUTIO, T.; POHJANVIRTA, T.; HOLOPAINESN, 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*. v. 82, n. 2, p. 200-208, 2015.
- HOE, F.G.H.; RUEGG, P.L. Opinions and Practices of Wisconsin Dairy Producers About Biosecurity and Animal Well-Being. *Journal of dairy Science*. v. 89, n. 6, p. 2297–2308, 2006.
- HUIJPS, K.; LAM, T. J.; HOGEVEEN, H. Costs of mastitis: facts and perception. *Journal of Dairy Research*, v. 75, n. 1, p. 113-120, 2008.
- KANTOR, T. G. A review of its pharmacologic and clinical properties. *Pharmacotherapy*. v. 6, n. 3, p. 93–103, 1986.
- KAYITSINGA, J.; SCHEWE, R. L.; CONTRERAS G. A.; ERSKINE R. J. Antimicrobial treatment of clinical mastitis in the eastern United States: The influence of dairy farmers' mastitis management and treatment behavior and attitudes. *Journal of dairy Science*. v. 100, n. 2, p. 1388–1407, 2017.
- KEANE, O.M.; BUDD, K.E.; FLYNN, J.; MCCOY, F. Increased detection of mastitis pathogens by real-time PCR compared to bacterial culture. *Veterinary Record*. v. 173, p. 268-273, 2013.
- KOSKINEN, M. T.; WELLENBERG, G. J.; SAMPIMON, O. C.; HOLOPAINESN, J.; ROTHKAMP, A.; SALMIKIVI, L.; VAN HAERINGEN, W. A.; LAM, T. J.; PYORALA, S. Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *Journal of dairy Science*. v. 93, n. 12, p. 5707–5715, 2010.
- LAGO, A.; GODDEN, S. M.; BEY, R.; RUEGG, P. L.; LESLIE, K. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: II. Effects on lactation performance, including clinical mastitis recurrence, somatic cell count, milk production, and cow survival. *Journal of dairy science*, v. 94, n. 9, p. 4457–4467, 2011b.

- LAGO, A.; GODDEN, S. M.; BEY, R.; RUEGG, P. L.; LESLIE, K. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. *Journal of dairy science*, v. 94, n. 9, p. 4441-4456, 2011a.
- LAHOUESSA, H.; MOUSSAY, E.; RAINARD, P.; RIOLLET, C. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Cytokine*. v. 38, n. 1, p. 12-21, 2007.
- LEVISON, L. J.; MILLER-CUSHON, E. K.; TUCKER, A. L.; BERGERON, R.; LESLIE, K. E.; BARKEMA, H. W.; DEVRIES, T. J. Incidence rate of pathogen-specific clinical mastitis on conventional and organic Canadian dairy farms. *Journal of dairy science*, v. 99, n. 2, p. 1341-1350, 2016.
- LOHUIS, J.A.C.M.; VAN WERVEN, T.; BRAND, A.; VAN MIERT, A. S. J. P. A. M.; ROHDE, E.; LUDWIG, B.; HEIZMANN, P.; REHM, W.F. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of carprofen, a non-steroidal anti-inflammatory drug, in healthy cows and cows with *Escherichia coli* endotoxin-induced mastitis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. v. 14, n. 3, p. 219-229, 1991.
- MA. Y.; RYAN. C.; BARBANO. D. M.; GALTON. D. M.; RUDAN. M. A.; BOOR. K. J. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. *Journal of dairy Science*. v. 83, n. 2, p.264-274, 2000.
- MCDUGALL, S.; ABBELOOS E.; PIEPERS S.; RAO, A. S.; ASTIZ S.; VAN WERVEN, T.; STATHAM, J.; PÉREZ-VILLALOBOS, N. Addition of meloxicam to the treatment of clinical mastitis improves subsequent reproductive performance. *Journal of dairy science*, v. 99, n. 3, p.1-17, 2016.
- MCDUGALL, S.; ARTHUR, D.G.; BRYAN, M.A.; VERMUNT, J.J.; WEIR, A.M. Clinical and bacteriological response to treatment of clinical mastitis with one of three intramammary antimicrobials. *New Zealand Veterinary Journal*. v. 55, n. 4, p. 161-170, 2007.
- MCDUGALL, S.; BRYAN, M.A.; TIDDY, R.M. Effect of treatment with the nonsteroidal antiinflammatory meloxicam on milk production, somatic cell count, probability of retreatment, and culling of dairy cows with mild clinical mastitis. *Journal of dairy Science* v. 92 n. 9, p.4421-4431, 2009.

MEHRZAD, J.; DESROSIERS, C.; LAUZON, K.; ROBITAILLE, G.; ZHAO, X.; LACASSE, P. Proteases Involved in Mammary Tissue Damage During Endotoxin-Induced Mastitis in Dairy Cows. *Journal of dairy science*. v. 88, n. 1, p. 211–222, 2005.

NASH, D.L.; ROGERS, G.W.; COOPER, J.B.; HARGROVE, G.L.; KEOWN, J.F. Relationship among severity and duration of clinical mastitis and sire transmitting abilities for somatic cell score, udder type traits, productive life, and protein yield. *Journal of Dairy Science*. v. 85. n. 5. p. 1273- 1284, 2002.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. NMC, Verona, WI, EUA, 1999.

National Office of Animal Health. Dinalgen 150 mg/ml Solution for Injection for Cattle, Pigs and Horses: Further information. Disponível em: <  
<http://www.noahcompendium.co.uk/?id=-446505>>. Acessado em 20 de set de 2018a.

National Office of Animal Health. Rifen 100 mg/ml solution for injection for horses, cattle and swine: Further information. Disponível em: <  
<http://www.noahcompendium.co.uk/?id=-449368>>. Acessado em 20 de set de 2018b.

NEESER, N.L.; HUESTON, W.D.; GODDEN, S.M.; BEY, R.F. Evaluation of the use of an on-farm system for bacteriologic culture of milk from cows with low-grade mastitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 228, n. 2, p. 254-260, 2006.

OLDE RIEKERINK, R.G.M.; BARKEMA, H.W.; KELTON, D.F.; SCHOLL, D.T. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *Journal of dairy Science*. v. 91, n. 4, p. 1366-1377, 2008.

OLIVEIRA, C. S. F.; HOGEVEEN, H.; BOTELHO, A. M.; MAIA, P. V.; COELHO, S. G.; HADDAD, J. P. A. Cow-specific risk factors for clinical mastitis in Brazilian dairy cattle. *Preventive veterinary medicine*, v. 121, n. 3, p. 297-305, 2015.

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

OLIVEIRA, L.; RUEGG, P.L. Treatments of clinical mastitis occurring in cows on 51 large dairy herds in Wisconsin. *Journal of dairy Science*. v. 97, n. 9, p. 5426–5436, 2014.

OLIVER, S.P.; MURINDA, S.E. Antimicrobial Resistance of Mastitis Pathogens. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, v.28, p. 165–185, 2012.

Organização Mundial da Saúde. Critically important antimicrobials for human medicine, fifth revision. 2017. Disponível em: <  
[https://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/antimicrobial-resistance/cia/en/](https://www.who.int/foodsafety/areas_work/antimicrobial-resistance/cia/en/)>. Acesso em: 28 ago. 2018.

PINZÓN-SÁNCHEZ, C.; RUEGG, P. L. Risk factors associated with short-term posttreatment outcomes of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, v. 94, n. 7, p. 3397– 3410, 2011.

PITKALA. A.; HAVERI. M.; PYORALA. S.; MYLLYS. V.;  
 HONKANENBUZALSKI. T. Bovine mastitis in Finland 2001: Prevalence. distribution of bacteria. and antimicrobial resistance. *Journal of Dairy Science*. v. 87. n. 8. p. 2433-2441, 2004.

POL, M.; RUEGG, P.L. Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. *Journal of dairy science*, v. 90, n.1, p. 249-261, 2007.

POLITIS, I.; MCBRIDE, B. W.; BURTON, J. H.; ZHAO, X.; TURNER, J. D. Secretion of interleukin-1 by bovine milk macrophages. *American journal of veterinary research*, v. 52, n. 6, p. 858-862, 1991.

REDDING, L.E.; BENDER, J.; BAKER, L. Quantification of antibiotic use on dairy farms in Pennsylvania. *Journal of dairy science*, v. 102, n. 2, p. 1494-1507, 2019.

RIOLLET, C.; RAINARD, P.; POUTREL, B. Cells and Cytokines in Inflammatory Secretions of Bovine Mammary Gland. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. v. 480, p. 247-258, 2000a.

RIOLLET, C.; RAINARD, P.; POUTREL, B. Differential Induction of Complement Fragment C5a and Inflammatory Cytokines during Intramammary Infections with

*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Clinical and diagnostic laboratory immunology. v. 7, n. 2, p. 161–167, 2000b.

RODRIGUES, A.C.O.; RUEGG, P.L. Actions and outcomes of Wisconsin dairy herds completing milk quality teams. Journal of Dairy Science. v. 88. n. 7. p. 2672-2680, 2005.

ROLLIN, E.; DHUYVETTER, K. C.; OVERTON, M. W. The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. Preventive veterinary medicine, v. 122, n. 3, p. 257-264, 2015.

RUEGG, P. L.; TABONE, T. J. The relationship between antibiotic residue violations and somatic cell counts in Wisconsin dairy herds. Journal of Dairy Science, v. 83, n. 12, p. 2805–2809, 2000.

RUEGG, P.L. New Perspectives in Udder Health Management Veterinary Clinics: Food Animal Practice. v. 28, p. 149-163, 2012.

SANTMAN-BERENDS, I. M. G. A.; LAM, T. J. G. M.; KEURENTJES, J.; VAN SCHAIK, G. An estimation of the clinical mastitis incidence per 100 cows per year based on routinely collected herd data. Journal of dairy science, v.98, n. 10, p. 6965-6977, 2015.

SEEGERS, H.; FOURICHON, C.; BEAUDEAU. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. Veterinary Research, v. 34, n. 5, p. 475–491, 2003.

SELSTED, M.E.; TANG, Y.; MORRIS, W.L.; MCGUIRE, P.A.; NOVOTNY, M.J.; SMITH, W.; HENSCHEN, A.H. CULLOR, J.S. Purification, Primary Structures, and Antibacterial Activities of B-Defensins, a New Family of Antimicrobial Peptides from Bovine Neutrophils. The journal of biological chemistry. v. 268, n. 9, p. 6641-6648, 1993.

SHPIGEL, N. Y.; CHEN, R.; WINKLER, M.; SARAN, A.; ZIV, G.; LONGO, F. The anti-inflammatory ketoprofen in the treatment of field cases of bovine mastitis. Research in Veterinary Science. v.56, n. 1, p. 62–68, 1994.

SHUSTER, D. E.; KEHRLI JR, M. E.; RAINARD, P.; PAAPE, M. Complement Fragment C5a and Inflammatory Cytokines in Neutrophil Recruitment during

Intramammary Infection with *Escherichia coli*. *Infection and immunity*. v. 65, n. 8, p. 3286–3292, 1997.

SORDILLO, L.M. Symposium review: Oxylipids and the regulation of bovine mammary inflammatory responses. *Journal of dairy science*. v, 101, n. 6, p. 5629–5641, 2018.

SORDILLO, L.M.; NICKERSON, S.C. Pathology of *Staphylococcus aureus* Mastitis During Lactogenesis: Relationships with Bovine Mammary Structure and Function. *Journal of dairy Science*. v. 72, n. 1, p. 228-240, 1989.

SORDILLO, L.M.; SHAFER-WEAVER, K.; DeROSA, D. Immunobiology of the Mammary Gland. *Journal of dairy science*. v. 80, n. 8, p. 1851-1865, 1997.

SUOJALA, L.; SIMOJOKI, H.; MUSTONEN, K.; KAARTINEN, L.; PYORALA, S. Efficacy of enrofloxacin in the treatment of naturally occurring acute clinical *Escherichia coli* mastites. *Journal of dairy Science*. v. 93, n. 5, p. 1960–1969, 2010.

SWARTZ, T.H.; SCHRAMM, H.H.; BEWLEY, J.M.; WOOD, C.M.; LESLIE, K.E.; PETERSSON-WOLFE, C.S. Meloxicam administration either prior to or after parturition: Effects on behavior, health, and production in dairy cows. *Journal of dairy science*. v. 101, n. 11, p. 1–17, 2018.

TAPONEN, S.; SALMIKIVI, L.; SIMOJOKI, H.; KOSKINEN, M.T.; PYORALA, S. Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *Journal of dairy Science*. v. 92, n.6, p. 2610–2617, 2009.

TOMAZI, T.; LOPES, T.A.F.; MASSON, V.; SWINKELS, J.M.; SANTOS, M.V. Randomized noninferiority field trial evaluating cephapirin sodium for treatment of nonsevere clinical mastites. *Journal of dairy Science*. v. 101, n. 8, p. 1-14, 2018.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Part III: Reference of Dairy Cattle Health and Management Practices in the United States, 2007. 2008. Disponível em:

<[https://www.aphis.usda.gov/animal\\_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07\\_dr\\_PartIII\\_rev.pdf](https://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07_dr_PartIII_rev.pdf)>. Acessado em: 27 de ago 2018.

VANE, J.R., BOTTING R.M. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs: an overview. In: Vane J., Botting J. (eds) Selective COX-2 Inhibitors. Springer, Dordrecht. 1998.

VANGROENWEGHE, F, DUCHATEAU, L., BOUTET, P., LEKEUX, P., RAINARD, P., PAAPE, M. J., & BURVENICH, C. Effect of carprofen treatment following experimentally induced *Escherichia coli* mastitis in primiparous cows. *Journal of dairy science*, v. 88, n. 7, p. 2361-2376, 2005.

VASQUEZ, A. K., NYDAM, D. V., CAPEL, M. B., EICKER, S., & VIRKLER, P. D. Clinical outcome comparison of immediate blanket treatment versus a delayed pathogen-based treatment protocol for clinical mastitis in a New York dairy herd. *Journal of dairy science*, v. 100, n. 4, p. 2992-3003, 2017.

WAGNER, Sarah A.; APLEY, Michael D. Effects of two anti-inflammatory drugs on physiologic variables and milk production in cows with endotoxin-induced mastitis. *American journal of veterinary research*, v. 65, n. 1, p. 64-68, 2004.

WENZ, J. R.; BARRINGTON, G. M.; GARRY, F. B.; DINSMORE, R. P.; CALLAN, R. J. Use of systemic disease signs to assess disease severity in dairy cows with acute coliform mastitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 218, n. 4, p. 567-572, 2001.

YEISER, E. E.; LESLIE, K. E.; MCGILLIARD, M. L.; PETERSSON-WOLFE, C. S. The effects of experimentally induced *Escherichia coli* mastitis and flunixin meglumine administration on activity measures, feed intake, and milk parameters. *Journal of dairy science*, v. 95, n. 9, p. 4939-4949, 2012.

ZECCONI, A.; FROSI, S.; CIPOLLA, M.; GUSMARA, C. Effects of chronic mastitis and its treatment with ketoprofen on the milk ejection curve. *Journal of Dairy Research*, v. 85, n. 1, p. 50-52, 2018.



**ANEXO I – Ficha de acompanhamento dos casos de mastite clínica.**

|                |  |
|----------------|--|
| <b>ANIMAL:</b> |  |
|----------------|--|

**Grupo TRATAMENTO: TRATAMENTO COM KETOFEN****QUARTO AFETADO:**

( ) AD                      ( ) AE                      ( ) PD                      ( ) PE

**GRAU DE MASTITE:**

( ) 1 - LEVE    ( ) 2 - MODERADA

**ACOMPANHAMENTO DA CURA CLÍNICA:**

| <b>DATA:</b> | <b>SINTOMAS<br/>MANHÃ</b>                           | <b>SINTOMAS TARDE</b>                               |
|--------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| ___/___/19   | ( ) SEM GRUMO<br>( ) POUCO GRUMO<br>( ) MUITO GRUMO | ( ) SEM GRUMO<br>( ) POUCO GRUMO<br>( ) MUITO GRUMO |
| ___/___/19   | ( ) SEM GRUMO<br>( ) POUCO GRUMO<br>( ) MUITO GRUMO | ( ) SEM GRUMO<br>( ) POUCO GRUMO<br>( ) MUITO GRUMO |
| ___/___/19   | ( ) SEM GRUMO<br>( ) POUCO GRUMO<br>( ) MUITO GRUMO | ( ) SEM GRUMO<br>( ) POUCO GRUMO<br>( ) MUITO GRUMO |
| ___/___/19   | ( ) SEM GRUMO<br>( ) POUCO GRUMO<br>( ) MUITO GRUMO | ( ) SEM GRUMO<br>( ) POUCO GRUMO<br>( ) MUITO GRUMO |
| ___/___/19   | ( ) SEM GRUMO<br>( ) POUCO GRUMO<br>( ) MUITO GRUMO | ( ) SEM GRUMO<br>( ) POUCO GRUMO<br>( ) MUITO GRUMO |
| ___/___/19   | ( ) SEM GRUMO<br>( ) POUCO GRUMO<br>( ) MUITO GRUMO | ( ) SEM GRUMO<br>( ) POUCO GRUMO<br>( ) MUITO GRUMO |
| ___/___/19   | ( ) SEM GRUMO<br>( ) POUCO GRUMO<br>( ) MUITO GRUMO | ( ) SEM GRUMO<br>( ) POUCO GRUMO<br>( ) MUITO GRUMO |

Realizou tratamento com antibiótico? ( ) Sim ( ) Não **Quando?** \_\_\_/\_\_\_/19

Qual o motivo? ( ) Não melhorou ( ) Piorou

**ANEXO II** – Normas de publicação da revista Journal of Dairy Science