

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**SONOELASTOGRAFIA, UMA FERRAMENTA ÚTIL NO
DIAGNÓSTICO DE LESÕES MAMÁRIAS DECORRENTES
DA MASTITE SUBCLÍNICA E CLÍNICA EM VACAS?**

**Talissa Camargo Mantovani De Bonis
Médica Veterinária**

2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**SONOELASTOGRAFIA, UMA FERRAMENTA ÚTIL NO
DIAGNÓSTICO DE LESÕES MAMÁRIAS DECORRENTES DA
MASTITE SUBCLÍNICA E CLÍNICA EM VACAS?**

Discente: Talissa Camargo Mantovani De Bonis

Orientador: Prof. Dr. Paulo Aléscio Canola

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Marita Vedovelli Cardozo

**Dissertação apresentada à Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias –
Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como
parte das exigências para a obtenção do
título de Mestre em Cirurgia Veterinária**

B715s

Bonis, Talissa Camargo Mantovani De

Sonoelastografia, uma ferramenta útil no diagnóstico de lesões
mamárias decorrentes da mastite subclínica e clínica em vacas? /

Talissa Camargo Mantovani De Bonis. -- Jaboticabal, 2023

42 p. : il., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Paulo Alécio Canola

Coorientadora: Marita Vedovelli Cardozo

1. Medicina veterinária. 2. Bovinos de leite. 3. Mastite. 4.
Ultrassonografia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

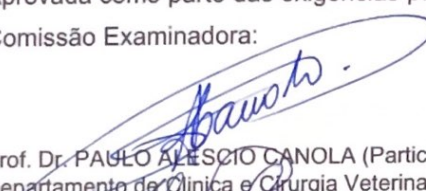
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: SONOELASTOGRAFIA , UMA FERRAMENTA ÚTIL NO DIAGNÓSTICO DE LESÕES MÂMARIAS DECORRENTES DA MASTITE SUBCLÍNICA E CLÍNICA EM VACAS?

AUTORA: TALISSA CAMARGO MANTOVANI DE BONIS

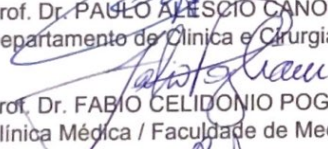
ORIENTADOR: PAULO ALÉSCIO CANOLA

COORDENADORA: MARITA VEDOVELLI CARDOZO

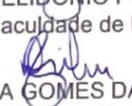
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Cirurgia Veterinária, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. PAULO ALÉSCIO CANOLA (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal



Prof. Dr. FÁBIO CELIDÔNIO POGLIANI (Participação Virtual)
Clínica Médica / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP, Pirassununga/SP



Pós Doc. DANIELA GOMES DA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 01 de fevereiro de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Talissa Camargo Mantovani De Bonis – nascida na cidade de Franca, São Paulo, no dia 19 de maio de 1994. Médica Veterinária graduada pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/Unesp), Câmpus de Jaboticabal, início em fevereiro de 2013 e término em dezembro de 2017. Foi bolsista FAPESP no projeto de iniciação científica intitulado “Proteinograma do soro lácteo, com ênfase em proteínas de fase aguda e imunoglobulina G, em cabras infectadas com *Staphylococcus aureus* por via intramamária” processo número “2015/17078-8” em 2015, sob orientação do Professor Dr. José Jurandir Fagliari. Realizou estágio curricular no ano de 2017 nas áreas de Clínica e Cirurgia de Grandes Animais no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Câmpus de Botucatu; Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo e Brazo’s Valley Equine Hospital, Stephenville – Texas. Realizou residência pelo Programa de Residência em Área Profissional da Saúde – Medicina Veterinária e Saúde, na subárea de Clínica Médica de Grandes Animais no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/Unesp), Câmpus de Jaboticabal, com início em março de 2018 e término em fevereiro de 2020, sob orientação do Professor Dr. José Corrêa de Lacerda Neto. Atualmente é mestrande e bolsista CNPq do programa de pós-graduação em Cirurgia Veterinária da FCAV/Unesp, com início em março de 2020, sob orientação do Professor Dr. Paulo Alécio Canola.

“Eis meu segredo. É muito simples: Só se vê bem com o coração, o essencial é
invisível aos olhos”
O pequeno Príncipe

Dedico este trabalho à Antonella, minha filha, inspiração e fonte inesgotável de força e amor. Ao meu noivo Lucas, o alicerce da nossa família, escolhido para trilhar o caminho da vida ao meu lado. Aos meus pais Vanessa e Sergio que fizeram e fazem o impossível por mim. Essas e todas as outras dedicatórias serão eternamente para vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me mostrar sempre os caminhos a seguir, manter a minha fé e por todas as orações escutadas e atendidas.

Agradeço aos meus pais, Vanessa e Sergio por não medirem esforços para me ver feliz e realizando meus sonhos, vocês são o motivo de tudo.

Agradeço à minha filha Antonella, o meu bem mais valioso, que chegou ao mundo sem saber nada mas foi capaz de me ensinar tudo. A você, o que há de melhor em mim.

Agradeço ao meu amor, Lucas, por me acompanhar nessa jornada da vida, fazer dos meus sonhos os seus e cuidar tão bem da gente.

Agradeço à minha irmã Victória e minha sobrinha amada Manuela pelo amor, companheirismo e apoio em todos os momentos.

Agradeço aos meus avós e bisavós Yaeko, Herold, Rita, Wanderley (*in memoriam*), Therezinha (*in memoriam*) e Dirley (*in memoriam*) pelos princípios ensinados em vida que me acompanharam e estarão comigo por toda minha existência e pelo amor incondicional. Aos que partiram desse plano, minha eterna saudade e gratidão, sempre serão uma doce lembrança.

Ao meu companheiro Beethoven, por me acompanhar em todos os momentos e fazer os meus dias mais felizes.

Agradeço, especialmente, aos meus colegas Paloma e Gabriel, funcionários da fazenda São Luiz, funcionários do Hospital Veterinário e ao meu Tio José Nelson, que foram fundamentais na execução desse projeto.

Agradeço ao Prof. Dr. Paulo A. Canola, por todos os ensinamentos e amizade e por aceitar me orientar e aconselhar em mais essa etapa acadêmica.

Agradeço aos animais, não só os que participaram do projeto, mas todos com que tive contato nesta caminhada e me motivaram a seguir com amor a minha profissão.

Agradeço, por fim, ao CNPq, pelo auxílio e pela bolsa de estudo, para que esse projeto fosse realizado com sucesso.

Sumário

	Página
CEUA.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
1.INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Glândula mamária e lactação.....	2
2.2 Mastite.....	3
2.3 Sonoelastografia	7
3. OBJETIVO.....	9
3.1 Objetivo geral	9
3.2 Objetivos específicos	9
4. MATERIAL E MÉTODOS	9
4.1 Comissão de Ética no Uso de Animais	9
4.2 Animais	10
4.3 Avaliação clínica.....	11
4.4 Exames laboratoriais.....	12
4.5 Exames da secreção láctea	12
4.5.1 Teste da caneca de fundo preto.....	12
4.5.2 <i>California Mastitis Test</i> (CMT)	13
4.5.3 Contagem de células somáticas (CCS).....	13
4.5.4 Análises microbiológicas	14
4.6 Avaliação clínica da glândula mamária	15
4.7 Sonoelastografia por compressão.....	16
4.8 Análise estatística	18
5. RESULTADOS	18
5.1. Avaliação clínica.....	18
5.2. Exames laboratoriais.....	19
5.3. Exames da secreção láctea	19
5.3.1. Teste da caneca de fundo preto, <i>California Mastitis Test</i> (CMT) e contagem de células somáticas (CCS)	19
5.3.2 Análise microbiológica	22
5.4. Avaliação glândula mamária	24

5.5 Sonoelastografia por compressão	25
6. DISCUSSÃO	28
7. CONCLUSÃO.....	34
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Sonoelastografia como método preditivo da mastite em vacas holandesas"**, protocolo nº 3750/20, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Alécio Canola, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 25 de agosto de 2020.

Vigência do Projeto	02/08/2020 a 28/02/2021
Espécie / Linhagem	Bovina - Holandês
Nº de animais	12 a 20
Peso / Idade	550 kg / 55 meses
Sexo	Fêmea
Origem	Fazenda São Luiz

Jaboticabal, 25 de agosto de 2020.


Prof.ª Dr.ª Fabiana Pilarski
 Coordenadora – CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

DECLARAÇÃO

Declaramos que o trabalho de pesquisa intitulado "Sonoelastografia como método preditivo da mastite em vacas holandesas", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Aléscio Canola e Certificado CEUA protocolo nº 3750/2020, aprovado em reunião ordinária em 25 de agosto de 2020, teve o número de animais alterado de "12 a 20" para "30 a 40" animais.

Solicitação aprovada em reunião ordinária de 10 de dezembro de 2020.

Jaboticabal, 10 de dezembro de 2020.

Profa. Dra. Fabiana Pilarski

Coordenadora – CEUA

SONOELASTOGRAFIA, UMA FERRAMENTA ÚTIL NO DIAGNÓSTICO DE LESÕES MAMÁRIAS DECORRENTES DA MASTITE SUBCLÍNICA E CLÍNICA EM VACAS?

RESUMO – A técnica de sonoelastografia tem sido amplamente utilizada e explorada na avaliação de lesões mamárias em mulheres, porém estudos pertinentes à glândula mamária de bovinos ainda não foram realizados. Pelo presente estudo pretendeu-se avaliar a utilização deste método na avaliação da saúde da glândula mamária e diagnóstico da mastite em vacas Holandesas e mestiças Girolando em lactação; além disso, o método foi comparado com os resultados de outras metodologias já descritas e utilizadas na produção leiteira para o diagnóstico da doença afim de encontrar correlações entre eles. Foi realizada a triagem de 26 vacas em lactação, para diagnóstico de mastite por meio do teste da caneca de fundo preto, contagem de células somáticas (CCS) e *Califórnia Mastitis Test* (CMT), afim de diagnosticar quadros clínicos e subclínicos de mastite, além de selecionar quartos mamários saudáveis. Os animais positivos para o teste da caneca de fundo preto, CMT e elevação na CCS foram considerados positivos para mastite clínica. Animais positivos no CMT e com elevação da CCS foram considerados quadros subclínicos. Casos com positividade associada a histórico da enfermidade nas lactações anteriores, caracterizou-se cronicidade da lesão. Além disso, foram coletadas amostras para avaliação microbiológica de todos os quartos mamários (positivos e negativos) para mastite. Após caracterização da enfermidade, os animais foram submetidos à sonoelastografia por compressão nos quartos saudáveis e afetados obtendo análises ortogonais avaliadas de acordo com escore de porcentagem de dureza do tecido. A interrelação entre as variáveis resultantes da avaliação da secreção láctea utilizando os testes caneca de fundo preto, CMT, CCS, avaliação clínica da glândula mamária, avaliação ultrassonográfica modo B e avaliação sonoelastográfica foi averiguada por meio da análise multivariada de componentes principais. A sonoelastografia por compressão fornece informações valiosas a respeito da elasticidade dos tecidos. No presente estudo, a técnica não apresentou correlação entre os grupos avaliados permitindo, a partir da metodologia utilizada, novas oportunidades para prosseguir com os estudos visto que é uma abordagem ultrassonográfica recente que permite larga exploração em virtude da literatura ainda restrita.

Palavras-chave: Elastografia de compressão, glândula mamária, inflamação, lesões mamárias.

SONOELASTOGRAPHY, A USEFUL TOOL IN THE MAMMARY LESION'S DIAGNOSIS RESULTING FROM SUBCLINICAL AND CLINICAL MASTITIS IN COWS?

ABSTRACT – The sonoelastography technique has been widely used and explored in the evaluation of breast lesions in women, but studies related to the bovine mammary gland have not yet been carried out. The present study aimed to evaluate the use of this method in assessing the health of the mammary gland and diagnosing mastitis in lactating Holstein and Girolando crossbred cows; in addition, the method was compared with the results of other methodologies already described and used in dairy production for the diagnosis of the disease in order to find correlations between them. Twenty-six lactating cows were screened for the diagnosis of mastitis using the black bottom mug test, somatic cell count (SCC) and California Mastitis Test (CMT) in order to diagnose clinical and subclinical conditions of mastitis, in addition to select healthy mammary quarters. Animals positive for the black bottom mug test, CMT and elevation in SCC were considered positive for clinical mastitis. Animals positive for CMT and with elevated SCC were considered subclinical. Cases with positivity associated with a history of the disease in previous lactations were characterized as chronicity of the lesion. In addition, samples for microbiological evaluation were collected from all breast quarters (positive and negative) for mastitis. After characterization of the disease, the animals were submitted to compression sonoelastography in the healthy and affected quarters, obtaining orthogonal analyzes evaluated according to the tissue hardness percentage score. The interrelation between the variables resulting from the evaluation of milk secretion using the black bottom mug test, CMT, SCC, clinical evaluation of the mammary gland, B-mode ultrasonographic evaluation and sonoelastographic evaluation was verified through the analysis principal component multivariate. Compression sonoelastography provides valuable information about tissue elasticity. In the present study, the technique did not present a correlation between the evaluated groups, allowing, based on the methodology used, new opportunities to continue with the studies, since it is a recent ultrasound approach that allows wide exploration due to the limited literature.

Keywords: Strain elastography, mammary gland, inflammation, mammary lesions.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Animal em posição quadrupedal para avaliação sonoelastográfica da glândula mamária anterior direita utilizando aparelho de ultrassom Esaote myLab Alpha e transdutor convexo multifrequencial, posicionado no ponto médio entre a inserção do úbere na musculatura abdominal e a transição entre a glândula mamária e teto. FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2021.....	17
Figura 2. Animal em posição quadrupedal para avaliação sonoelastográfica da glândula mamária posterior esquerda utilizando aparelho de ultrassom Esaote myLab Alpha e transdutor convexo multifrequencial, posicionado no ponto médio na região caudal da glândula mamária. FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2021.	18
Figura 3. Amostra de leite submetida ao <i>California Mastitis Test</i> (CMT). Áreas demarcadas com os números 1,3 e 4: resultado negativo (escore 0) no teste CMT. Área demarcada com número 2: resultado positivo (++, escore 2) FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2021.....	20
Figura 4. Amostra de leite obtida durante a ordenha para inspeção de suas características macroscópicas por meio de exame de caneca de fundo preto sendo evidenciado leite espesso e com presença de grumos, classificada. FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2021.....	20
Figura 5. Amostra de leite submetida ao <i>California Mastitis Test</i> (CMT). Áreas demarcadas com os números 1,3 e 4: resultado negativo (escore 0) no teste CMT. Área demarcada com o número 2: resultado positivo (++, escore 2). FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2021.....	21
Figura 6. Amostra de leite submetida ao teste <i>California Mastitis Test</i> (CMT). Áreas demarcadas com os números 1 e 3: resultado positivo (++, escore 2) no teste CMT. Área demarcada com números 2 e 4: resultado fortemente positivo (+++, escore 3). FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2021.....	21
Figura 7. Crescimento bacteriano após inoculação de amostra de secreção láctea em placa de Petri contendo ágar sangue bovino a 5% após 48 horas de manutenção a 37°C em condições aeróbias. FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2021.....	22

Figura 8.	Crescimento bacteriano após inoculação de amostra de secreção láctea em placa de Petri contendo ágar Mac Conkey após 48 horas de manutenção a 37°C em condições aeróbias. FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2021.....	23
Figura 9.	Característica morfofotintorial pela técnica de coloração de Gram de microrganismos pertencentes ao gênero <i>Staphylococcus</i> spp. FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2021.....	23
Figura 10.	Inspeção visual do úbere. Quarto mamário posterior direito apresentando assimetria em relação aos quartos mamários adjacentes após ordenha completa. FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2021.....	25
Figura 11.	Imagem ultrassonografia modo B ao lado esquerdo da imagem demonstrando a presença de alteração do parênquima sugestivo para presença de abscesso. Imagem sonoelastografica a direita apresentando imagem sugestiva de abscesso com interior predominantemente vermelho e circundado por coloração verde e azul com 71.82% dos pixels fora da escala de dureza dos tecidos. FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2021.....	26
Figura 12.	Imagem ultrassonografia modo B ao lado esquerdo da imagem demonstrando parênquima mamário homogêneo, sem alterações. Imagem sonoelastografica a direita apresentando 72.11% dos pixels fora da escala de dureza dos tecidos. FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2021.....	26
Figura 13.	Gráfico biplot 1 originado pela interação entre o componente principal 1 (Dim1) e 2 (Dim2), os quais expressam 71,5% dos resultados obtidos para 76 quartos mamários de 26 vacas leiteiras das raças Holandesa e mestiças Girolando, divididos em três grupos: controle (Mastite_N), mastite subclínica (Mastite_Sub) e mastite clínica (Mastite_Cli). À esquerda demonstra-se a correlação entre as variáveis ultrassonografia modo B (Ultrassom_N), teste da caneca de fundo preto (Caneca_Sadio), California Mastitis Test (CMT_N), contagem de células somáticas (CCS_0), microbiológico negativo (Cult_NEG), palpação da glândula mamária (Palpacao_N) e temperatura da glândula mamária (Temp_N) para o grupo controle (Mastite_N). À direita, demonstra-se no quadrante superior a correlação entre as variáveis contagem de células somáticas (CCS_1) e microbiológico positivo (Cult_POS) para o grupo mastite subclínica (MASTITE_SUB). À direita, demonstra-se no	

	quadrante inferior a correlação entre as variáveis contagem de células somáticas (CCS_2), California Mastitis Test (CMT_G), microbiológico positivo (Cult_POS), teste da caneca de fundo preto (Caneca_Lesao) e palpação da glândula mamária (PALPAÇÃO_A) para o grupo mastite clínica (MASTITE_CLI). Ultrassonografia modo B (ULTRASSOM_A) demonstrando não correlação entre os grupos mastite clínica e subclínica.....	27
Figura 14.	Gráfico biplot 2 originado pela interação entre o componente principal 1 (Dim1) e 2 (Dim2), os quais expressam 69,48% dos resultados obtidos 76 quartos mamários de 26 vacas leiteiras das raças Holandesa e mestiças Girolando, divididos em três grupos: controle (Mastite_N), mastite subclínica (Mastite_Sub) e mastite clínica (Mastite_Cli). Ao centro está demonstrada a não correlação do exame de elastografia (ELAS>60 e ELAS<60) com as demais variáveis ultrassonografia modo B (ULTRASSOM_N e ULTRASSOM_A), teste da caneca de fundo preto (Caneca_Sadio e Caneca_Lesao), palpação da glândula mamária (PALPACAO_N e PALPACAO_A), análise microbiológica (CULT_NEG e CULT_POS), contagem de células somáticas (CCS_0, CCS_1 e CCS_2) e California Mastitis Test (CMT_N e CMT_G) para os grupos controle (MASTITE_N), grupo mastite clínica (MASTITE_CLI) e mastite subclínica (MASTITE_SUB).....	27

1.INTRODUÇÃO

A mastite, sob o ponto de vista econômico, está entre as doenças mais comuns e desafiadoras dos rebanhos leiteiros. É caracterizada por reação inflamatória que acomete os tecidos mamários devido a danos físicos, irritação química ou infecções, podendo ser apresentada sob as formas, clínica, subclínica e crônica (Viguier et al., 2009; Hurley e Theil, 2011; Ruegg et al., 2014). Sinais evidentes de inflamação, tais como presença de grumos, edema, aumento de temperatura, enrijecimento e dor caracterizam o quadro clínico da doença (Fonseca e Santos, 2000). Já na forma subclínica, não há sinais visíveis de inflamação do úbere e sim alterações na composição do leite. A persistência da infecção do úbere caracteriza a forma crônica, que pode durar meses ou anos e pode levar à fibrose dos quartos acometidos e, em alguns casos, até atrofia do mesmo (Hillerton, 1996). Redução da produção, alteração das características físico-químicas do leite e custos com tratamento e reposição de animais, causados pela mastite, são responsáveis por perdas financeiras notáveis em diferentes países (Halasa et al., 2007).

O diagnóstico de mastite clínica e subclínica é usualmente obtido avaliando as características macroscópicas do leite por meio do teste da caneca de fundo preto, através do *California Mastitis Test* (CMT), que avalia indiretamente a presença de células somáticas na secreção láctea e contagem de células somáticas (CCS), realizada com equipamentos automatizados (Maiochi et al., 2019; Massote et al., 2019).

O avanço da tecnologia na Medicina Veterinária promoveu estudos que viabilizaram outros métodos de diagnóstico como, por exemplo, a ultrassonografia da glândula mamária e a teloscopia (Geishauser et al., 2005; Blond e Buczinski, 2009).

No início dos anos de 1990 foi desenvolvida a técnica de elastografia por ultrassonografia (ou sonoelastografia), que tem por objetivo estudar a rigidez dos tecidos. Tal procedimento tem sido utilizado em humanos para diagnóstico de tumores prostáticos, monitoramento de lesões e estudo das propriedades

estruturais dos rins, fígado e, de maneira relevante, em incontáveis pesquisas, sobre sua utilidade no diagnóstico, tratamento, prognóstico de lesões mamárias, incluindo neoplasias e mastite (Srinivasan et al., 2004; Dudea et al., 2011; Arslan et al., 2018).

Ao que se sabe, até o presente momento, não foram encontrados estudos que reportem o uso da sonoelastografia para avaliação de tecidos mamários de bovinos; tampouco, sua utilização como método preditivo para diagnóstico da mastite. Pelo posto, conjecturou-se o presente estudo com o propósito de descrever o uso dessa nova técnica de ultrassonografia na avaliação de glândulas mamárias de vacas saudáveis e portadoras de mastite. Além disso, pretendeu-se averiguar a aplicabilidade da técnica no diagnóstico precoce da enfermidade e das lesões que podem ser associadas à redução da produção leiteira e perda da qualidade do leite.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Glândula mamária e lactação

A glândula mamária é definida como uma glândula sudorípara modificada, tubuloacínosa, composta por células do tipo secretório holomerócrino ou apócrino, divididas por tecido conjuntivo. Produz uma secreção glandular que é responsável por alimentar recém-nascidos das espécies (Bragulla e König, 2004; Feitosa, 2008; Araújo et al., 2012). Há uma similaridade estrutural entre os mamíferos, porém, existe variações interespecies relacionadas à aparência e quantidade relativa dos componentes secretados (Feitosa, 2008). Nos bovinos, o úbere é composto por quatro glândulas mamárias independentes, denominados quartos (Peek e Divers, 2018).

A glândula mamária é distribuída em dois tecidos diferentes, são eles o parênquima e estroma. O parênquima glandular contém unidades morfofuncionais encarregadas da secreção láctea. Já o estroma é o tecido que contém os capilares sanguíneos, células mioepiteliais e fibras reticulares compondo o tecido conjuntivo intersticial intraparenquimatoso (Bragulla e König, 2004; Davidson e Stabenfeldt, 2008).

O úbere consiste em estrutura repleta de tecido adiposo que contém diversos tubos interconectados que confluem para um ponto em comum, denominado de cisterna da glândula (Blowey e Edmondson, 2010). O teto possui textura elástica e formato cilíndrico (ou cônico) e está presente em cada glândula mamária. Tem por função promover a saída do leite (Hurley, 2010).

O canal do teto é considerado mecanismo primário de defesa por possuir superfície queratinizada, que forma uma barreira natural, capaz de aprisionar o patógeno, no entanto essa camada pode ser removida mecanicamente por meio da ordenha (Ferreira et al., 2007; Andrews et al., 2008).

A descida do leite ocorre em resposta a estímulos táteis, visuais ou auditivos que enviam sinais ao cérebro nos núcleos supraóptico e paraventricular do hipotálamo que se localiza na região central do cérebro. Nos núcleos, a ocitocina é sintetizada e transportada para a hipófise e liberada para a circulação sanguínea, após a estimulação dos tetos (Reece, 2008). Este hormônio promove a contração das células mioepiteliais e musculares localizadas circundando os alvéolos, forçando a descida da secreção láctea dos alvéolos para o ducto (Schmidt, 1971). Deste modo, o leite, produzido pelas células cuboides, situadas no interior dos alvéolos, flui para a glândula e cisternas onde está pronto para ser ordenhado do úbere. Em vacas de alto rendimento, principalmente, pode ocorrer retenção da secreção láctea nos ductos e cisternas entre as ordenhas (leite residual). Este leite residual predispõe a ocorrência de infecções mamárias (Blowey e Edmondson, 2010).

2.2 Mastite

A mastite bovina é caracterizada como o resultado da inflamação da glândula mamária, podendo ser classificada como subclínica, clínica ou crônica, a depender da severidade das manifestações clínicas. Sua importância se deve ao fato de a lesão alterar a quantidade e qualidade do leite nos rebanhos leiteiros (Blowey e Edmondson, 2010). O grau de inflamação varia conforme a natureza do agente etiológico envolvido, idade, raça, estado imunológico e estágio de lactação do animal (Viguier et al., 2009; Hurley e Theil, 2011).

A doença é associada a diversos patógenos. Por isso, o processo pode ser dividido em mastite contagiosa e mastite ambiental. A primeira é causada por

microrganismos que habitam normalmente a pele do animal e atuam de maneira oportunista colonizando a glândula mamária. Dessa forma, se disseminam pelos equipamentos de ordenha e ordenadores. Já a última está relacionada à presença de patógenos usualmente presentes no ambiente, os quais podem ter acesso à cisterna do teto (Radostitis et al., 2007; Peek e Divers, 2018)

Um total de 140 espécies, subespécies e sorovares já foram isolados da glândula mamária de bovinos (Radostitis et al., 2007).

As bactérias que geralmente estão associadas à mastite ambiental são *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus Uberis*, *Streptococcus equinus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. (Radostitis et al., 2007). Já a mastite contagiosa é causada por microrganismos bacterianos que incluem espécies como *Staphylococcus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Corynebacterium bovis* e a contaminação acontece no momento da ordenha (Silva et al., 2010).

A mastite clínica (MC) é uma das doenças mais frequentes que afetam o rebanho leiteiro em todo o mundo. Sua incidência varia de 13 a 40 casos a cada 100 vacas (Peeler et al., 2002; Ruegg, 2003; Halasa et al., 2007; McDougall et al., 2007; Bar et al., 2008; Riekerink et al., 2008; van den Borne et al., 2010). Os sinais clínicos são baseados em alterações locais ou sistêmicas como vermelhidão e inflamação de áreas afetadas, dor, inapetência, redução da temperatura corpórea, redução da produção e alteração da composição do leite são evidentes (De Vliegher et al., 2012).

Quadros clínicos da doença podem persistir por longos períodos, com severidade reduzida (Blowey e Edmonson, 2010). *Staphylococcus aureus* é considerado o pior agente contagioso pela capacidade de causar cronicidade e infecções que atingem profundamente os tecidos glandulares, dificultando a cura (Peek e Divers, 2018).

Já na apresentação subclínica, não ocorre alteração macroscópica na aparência da glândula mamária, assim como na secreção láctea. A contagem de células somáticas também é considerada como indicação primária de mastite subclínica. Demais indicadores da doença subclínica incluem aumento da população bacteriana no leite, redução da produção e alteração na composição e qualidade do

leite (Bian et al., 2014). O diagnóstico da mastite subclínica é de suma importância no controle e manejo estratégico (Hoque et al., 2015).

A epidemiologia da doença é complexa e apresenta particularidades no que diz respeito à mastite contagiosa ou ambiental. Diante de tais diferenças menciona-se que, no contexto ambiental, o reservatório da infecção é o próprio ambiente e os microrganismos são transferidos nos períodos entre ordenhas, por meio da penetração no canal do teto por propulsão ou fluxo reverso de leite. Além disso, grande fração de novas infecções ocorrem durante o período seco (Blowey e Edmonson, 2010).

Em contraste, a mastite contagiosa conta com a própria glândula mamária e a pele do teto como reservatórios da infecção sendo que sua transmissão ocorre de vacas doentes para não afetadas durante o processo de ordenha. A colonização ocorre por meio do crescimento bacteriano no canal do teto, após o estabelecimento da colônia. O período seco não apresenta relevância para que ocorram novos episódios (Blowey e Edmonson, 2010).

Dados relacionados à mastite subclínica expõe a redução de maneira substancial de lactose e caseína, sendo tal alteração significava para os laticínios, principalmente os que produzem queijos, pois reduz o rendimento do leite. Além disso, a mastite pode reduzir a proporção de gordura e proteína do leite causando redução do preço em até 15% (Blowey e Edmonson, 2010).

O diagnóstico primário é baseado nos sinais clínicos locais como edema, inflamação da glândula mamária e alteração na quantidade e qualidade do leite. Casos severos podem causar sinais sistêmicos como febre, fraqueza, desidratação e inapetência (Royster e Wagner, 2015). No caso das formas clínicas, o diagnóstico é realizado pelo uso da caneca de fundo preto (ou telado) no qual se visualizam alterações macroscópicas do leite. A mastite subclínica é aquela que apresenta resultado positivo ao teste de CMT, ou aumento de CCS (Santos, 2001).

Benites et al. (2002) observaram que 55,5% das amostras teciduais da glândula mamária de vacas leiteiras com mastite apresentavam resposta inflamatória local. Ademais, em 63,3% das amostras notou-se perda do parênquima e formação de fibroses, além de dilatações císticas. Tripathy et al. (2018) avaliaram amostras de tecidos mamários coletados a partir de animais com mastite crônica e

constatarem a presença de hemorragias nos ductos, proliferação fibrótica e presença de células inflamatórias.

Na mulher, a mastite de importância clínica é denominada mastite idiopática granulomatosa. Os achados histopatológicos decorrentes desta enfermidade se baseiam na presença de células inflamatórias (leucócitos, células gigantes e epiteliais), além de lobulite crônica, com presença de granulomas não caseosos e alterações fibrocísticas (Sripathi et al., 2016; Manogna et al., 2020).

A CCS no leite é reconhecida internacionalmente como critério para avaliação da sanidade da glândula mamária (Akers e Nickerson, 2011). As células somáticas do leite são formadas por células decorrentes da descamação epitelial natural da glândula e por células de defesa do organismo, que irão migrar do sangue para a glândula com o objetivo de combater os agentes causadores de infecções (Akers e Nickerson, 2011). Vários fatores podem afetar o resultado da CCS como o agente etiológico envolvido, idade, estágio de lactação, variações sazonais, estresse, frequência de lactação, variações do manejo e contagem de células somáticas do rebanho geral (Blowey e Edmonson, 2010).

Outra maneira indireta de estimar o número de células somáticas é a utilização do CMT (Schalm e Noorlander, 1957). Tal teste é baseado no princípio da adição de detergente que ocasionará a liberação de ácido nucleico e outros constituintes celulares que irão resultar na formação de um gel (Muhammad et al., 1995). Apesar de simples, o método pode gerar resultados falso-positivo e falso-negativo. Adicionalmente, o CMT não promove resultado numérico; apenas um indicativo de contagens celulares baixas ou elevadas (Vigueir et al., 2009).

Outros métodos diagnósticos como, por exemplo, a ultrassonografia e a termografia vêm sendo estudados afim de se obter um diagnóstico precoce e preciso da lesão, além de avaliar toda a arquitetura mamária e o comprometimento da glândula como um todo.

A terapia, tradicionalmente, baseia-se na utilização de antimicrobianos, em sua maioria, via intramamária visando atingir concentrações eficazes do fármaco no local ativo da infecção, com baixa restrição na suspensão do uso do leite (Tozetti et al., 2008). O tratamento cirúrgico baseia-se na mastectomia parcial ou radical. O procedimento é recomendado nos casos de mastite crônica ou gangrenosa (Cable

et al., 2004). A combinação do conhecimento do agente etiológico envolvido e do histórico da contagem de células somáticas é um marcador importante para a seleção apropriada do tratamento (Royster e Wagner, 2015). Vale salientar que o sistema imune é capaz de solucionar 20 a 30% das infecções da glândula mamária, tornando a adoção de boas práticas de manejo, alimentação ideal e permanência em ambiente não estressante aliados importantes na redução das infecções (Tozetti et al., 2008).

2.3 Sonoelastografia

A elastografia por ultrassom, ou sonoelastografia, surgiu em meados de 1990 com o objetivo de gerar imagens que demonstrassem a distribuição da tensão através dos tecidos (Lerner et al., 1990). Atualmente, ao menos alguma forma de elastografia está disponível na maioria dos sistemas de ultrassom disponíveis comercialmente. Os equipamentos podem incluir três métodos distintos: elastografia por compressão (*strain*); *acoustic radiation force impulse* ou ARFI; e *real-time shear velocity* ou RSV (Dudea et al., 2011; Barr e Zhang, 2015).

Desde o surgimento da imagem Doppler, a sonoelastografia representa o desenvolvimento técnico mais importante no campo da ultrassonografia. É vantajosa em relação a outros métodos que estimam a elasticidade dos tecidos, por ser um sistema rápido e não invasivo (Drakonaki et al., 2012).

A técnica tem se mostrado altamente específica na avaliação de lesões em diferentes órgãos parenquimatosos como a mama, próstata, tireoide e linfonodos (Itoh et al., 2006; Aigner et al., 2012). Mesmo assim, é um método novo e sua utilização na prática clínica ainda deve ser explorada mais a fundo. Embora existam diferenças nas técnicas, na prática, todas são capazes de mensurar a rigidez dos tecidos (Goddí, 2012). Lesões que não apresentam propriedades ecogênicas podem não ser diagnosticadas a partir de ultrassonografia convencional.

A sonoelastografia por compressão fornece resultados qualitativos e não quantitativos sobre a rigidez relativa do tecido, dentro do campo de visão (Barr et al., 2012; Barr, 2014). As imagens desse método são obtidas por meio de comparação de mudanças quadro a quadro, quando a força de compressão é aplicada no tecido.

Tecidos moles deformam mais, enquanto tecidos com maior firmeza deformam menos (Barr, 2014).

A técnica é capaz de mensurar a resposta local do tecido que foi submetido a força e transforma o cálculo de deslocamento longitudinal dos componentes relevantes em diferentes pontos de determinado tecido em imagem (Ophir et al., 1991). O estudo pode ser realizado em tempo real utilizando equipamentos de ultrassom contendo software específico, com capacidade de avaliar as propriedades físicas dos tecidos e avaliar os graus de rigidez em relação aos tecidos adjacentes por meio da compressão (Jaffer et al., 2012).

É importante considerar que a elastografia por compressão não promove por si só uma imagem matemática exata da elasticidade (Carvalho et al., 2015). A estimativa de força axial computa o deslocamento e exibição na forma de imagem 2D, codificada por cores, que representa a distribuição de elasticidade relativa entre certa lesão e seu tecido normal circundante (Ophir et al., 1991; Ophir et al., 1999; Hall et al., 2003). Assim, o operador deve se lembrar que a mensuração é sensível ao posicionamento e, para se obter um índice confiável, a região de referência deve estar na mesma profundidade que a lesão em estudo (Carvalho et al., 2015). Apesar disso, tal método é relativamente simples e disponível em diversos instrumentos comerciais.

Na Medicina Humana há diversos estudos e evidências crescentes sobre a utilização das técnicas de sonoelastografia em vários tecidos, inclusive o mamário. Estudos preliminares do seu uso no fígado tiveram como objetivo padronizar e avaliar o valor diagnóstico da técnica na detecção de lesões difusas e focais, além de diferenciar a malignidade do processo e detectar processos degenerativos e inflamatórios (Orlacchio et al., 2012; Carvalho et al., 2015).

Na mulher, comprovou-se que a combinação do uso de ultrassom em modo – B e elastografia por compressão foi efetiva na diferenciação de mastite idiopática granulomatosa de lesão maligna na mama, com excelente sensibilidade e especificidade (Arslan et al., 2018). Além disso, diversos autores têm utilizado a técnica como método auxiliar na diferenciação dos tumores mamários benignos e malignos (Barr, 2010; Barr et al., 2012; Barr e Zhang, 2015).

Para a realidade brasileira, diferentemente de países desenvolvidos, ainda há custos elevados relacionado a elastografia por se tratar de um exame em fase de experimentação na Medicina Humana e Medicina Veterinária, porém, assim como diversos métodos diagnósticos, novas perspectivas para utilização e aumento da popularidade da técnica melhorando a viabilidade financeira.

Até o presente momento, não foram encontrados estudos utilizando a técnica de elastografia por compressão na avaliação de estruturas mamárias de bovinos. Pelo posto, hipotetizou-se que a sonoelastografia por compressão pode ser aplicável e de fácil execução na avaliação da glândula mamária de bovinos, assim como na mulher. Neste âmbito o estudo poderia fornecer informações relevantes sobre as características da elasticidade do tecido mamário dos bovinos sadios e acometidos pela mastite.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Pelo presente pretendeu-se traçar o perfil sonoelastográfico, via elastografia por compressão, do úbere de vacas leiteiras saudáveis e acometidas por mastite. Esperou-se, com isso, determinar os padrões sonoelastográficos qualitativos dos quartos mamários acometidos ou não pela mastite.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a inter-relação entre os aspectos clínicos e sonoelastográficos da glândula mamária por meio de métodos estatísticos exploratórios;
- Avaliar a diferença entre o padrão sonoelastográfico de glândulas mamárias sadias e acometidas pela mastite bovina;
- Estadiar a mastite bovina por meio da sonoelastográfica das glândulas mamárias de animais enfermos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comissão de Ética no Uso de Animais

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, sob o protocolo nº 3750/20.

4.2 Animais

As vacas avaliadas foram provenientes de propriedade leiteira da região de Jaboticabal/SP, com produção média de 2.500 litros de leite/dia e 150 vacas em lactação, com idade média de 55 meses, submetidas a duas ordenhas diárias por sistema exclusivamente mecânico. A propriedade utilizava sistema intensivo com pastejo irrigado e a alimentação dos animais era baseada em silagem de milho e concentrado. Os animais possuíam acesso livre a água. Durante o estudo, os animais foram mantidos em seu ambiente usual, sem quaisquer alterações de manejo e dieta.

Foram avaliados os quartos mamários de 26 fêmeas leiteiras, da raça Holandesa e mestiças Girolandas, no terço inicial da lactação, selecionadas após exame clínico geral dos animais, das glândulas mamárias e da secreção láctea.

Os animais não foram categorizados como unidade experimental e sim cada quarto mamário avaliado que se enquadravam nas características desejadas foram considerados como “n amostral” e divididos em três grupos distintos: Grupo Controle, Grupo Mastite Clínica e Grupo Mastite Subclínica.

O Grupo Controle conteve 30 quartos mamários, considerados como saudáveis por meio de resultado negativo pelos testes da caneca de fundo preto, CMT, baixa CCS (abaixo de 200×10^3 células somáticas por mL de leite) e ausência de crescimento microbiológico. O segundo grupo, nomeado como Grupo Mastite clínica, foi composto por 19 quartos positivos para mastite clínica a partir de presença de alterações macroscópicas no leite pelo teste da caneca de fundo preto, CMT positivo e contagens elevadas de células somáticas. Os quartos positivos para mastite subclínica, ou seja, aqueles que não apresentaram alterações clínicas aparentes na glândula mamária; teste da caneca de fundo preto negativo; CMT positivo e aumento na contagem de células somáticas foram enquadrados no Grupo Mastite Subclínica, contendo 27 quartos. Apesar da disponibilidade total de 104

quartos mamários quando avaliado o n amostral (26 animais), foram utilizados no estudo o total de 76 pois os animais que apresentavam quartos positivos e negativos para mastite (clínica ou subclínica), tinham as glândulas caracterizadas como saudáveis (a partir dos exames da secreção láctea) excluídas das avaliações posteriores (elastografia e ultrassonografia). Isso ocorreu com o objetivo de obter elevada padronização na análise do grupo controle quando critérios como CCS, análises laboratoriais e exame físico fossem avaliados e submetidos a análise estatística, pois as amostras seriam provenientes de animais que apresentavam quartos positivos para mastite subclínica ou clínica e quartos mamários saudáveis, ou seja, de maneira sistêmica, sem avaliar isoladamente os quartos, tais animais poderiam apresentar alterações dessas variáveis compatíveis com animais doentes levando a resultados não fidedignos.

4.3 Avaliação clínica

Os animais foram submetidos a exame clínico geral no momento que antecedeu a avaliação ultrassonográfica. Os parâmetros avaliados foram frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal, coloração das membranas mucosas e movimentos ruminais. A frequência respiratória, em movimentos respiratórios por minuto (mpm), foi avaliada pela observação da movimentação toracoabdominal do animal durante a inspiração e expiração, sendo considerado normal, a variação de 10 a 30 mpm. A frequência cardíaca, em batimentos por minuto (bpm), foi avaliada com auxílio de estetoscópio posicionado entre o 3º e o 5º espaço intercostal esquerdo, sendo considerado fisiológico para espécie intervalos de 60 a 80 bpm. Para registro da temperatura foi utilizado termômetro clínico digital introduzido na ampola retal do animal, sendo o valor expresso em graus Celsius e o intervalo de normalidade para a espécie variando de 37,8 a 39,2°C. Do mesmo modo, foi avaliada a coloração das membranas mucosas oculopalpebrais e vulvares, que, em animais saudáveis, apresentam-se róseas (normocoradas). Os movimentos ruminais foram avaliados por meio da ausculta da fossa paralombar esquerda durante dois minutos, considerando o fisiológico 2 a 4 movimentos em 2 minutos (mp2m) (Feitosa, 2008).

4.4 Exames laboratoriais

Após seleção dos animais foi efetuada coleta de sangue venoso para realização de hemograma. A amostra foi obtida por punção da veia jugular externa ou veia epigástrica superficial caudal (*i.e.* veia mamária) após antissepsia com algodão embebido em álcool 70%. O sangue foi coletado em tubo vacutainer contendo EDTA. As amostras, devidamente identificadas, foram encaminhadas para o Laboratório de Patologia Clínica “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, Jaboticabal - SP. Os valores obtidos incluíram contagem de hemácias (HE), hematócrito (HT), concentração de hemoglobina (HB), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM); leucograma com a avaliação da contagem total de leucócitos (LE), neutrófilos bastonetes (BAST), neutrófilos segmentados (SEG), linfócitos (LINF), monócitos (MON), eosinófilos (EOS) e basófilos (BAS), além de fibrinogênio plasmático e proteína total.

A concentração da proteína plasmática total foi determinada pelo método refratometria e o teor de fibrinogênio pela técnica de precipitação e calor. O sangue coletado foi centrifugado para posterior mensuração da proteína total através do refratômetro, em seguida, 1 mL de plasma foi adicionado a um tubo de eppendorf submetido a aquecimento em banho maria a 56°C por 3 minutos e centrifugado para posterior mensuração em refratômetro, sendo o fibrinogênio a diferença da proteína plasmática após exposição ao calor.

4.5 Exames da secreção láctea

4.5.1 Teste da caneca de fundo preto

Os microrganismos de interesse direto no estudo foram *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Escherichia coli*. Para avaliar as alterações físicas ocasionadas pela presença potencial destes microrganismos no leite foi realizado o teste da caneca de fundo preto, seguindo as determinações de Haddad (2012).

O teste foi realizado imediatamente antes ordenha. Os primeiros jatos de leite de cada teto foram desprezados em uma caneca com fundo preto e observados para

avaliar o aspecto da secreção láctea a fim de detectar possíveis alterações de cor, consistência ou presença de grumos, pus ou sangue. Os tetos cujo leite apresentava-se sem alterações foram caracterizados como negativos para a presença de mastite clínica. Já a presença de alterações visuais da secreção láctea configurava quartos positivos.

Os resultados dos exames da secreção láctea relacionados ao teste da caneca de fundo preto foram categorizados para possibilitar a análise estatística multivariada de componentes principais, sendo resultado 0 atribuído à secreção láctea sem alteração visual, ou seja, negativo, e 1 para secreção láctea positiva para alterações macroscópicas que incluíram presença de grumos, secreção láctea aquosa ou espessa e presença de pus ou sangue.

Os resultados do teste da caneca de fundo preto, posteriormente, foram correlacionados aos demais exames da secreção láctea, exame clínico da glândula mamária, achados microbiológicos, exame de ultrassonografia modo B e sonoelastografia de compressão.

4.5.2 California Mastitis Test (CMT)

O *California Mastitis Test* foi aplicado às amostras de leite dos quartos mamários antes da realização do exame de sonoelastografia. Foi realizado mediante as descrições e recomendações de Philpot e Nickerson (1991).

Para o CMT o valor 0 foi atribuído a teste negativo, ou seja, sem aglutinação; 1 relativo à presença de uma cruz, demonstrando resultado fracamente positivo; 2 (duas cruces) resultado distintamente positivo e 3 (três cruces) um resultado fortemente positivo. Os resultados do CMT, posteriormente, foram correlacionados aos demais exames da secreção láctea, exame clínico da glândula mamária, achados microbiológicos, exame de ultrassonografia modo B e sonoelastografia de compressão.

4.5.3 Contagem de células somáticas (CCS)

Foram coletadas amostras de todos os animais incluídos no estudo. As amostras foram coletadas no momento que antecedeu a primeira ordenha. Para isso, utilizou-se frascos plásticos contendo conservante bronopl os quais foram

preenchidos com conteúdo lácteo dos quatro tetos de cada animal (*pool amostral*). Imediatamente após a coleta, o frasco foi fechado e foram realizados movimentos giratórios por 10 vezes. Após 15 minutos, o processo foi repetido. Os frascos foram devidamente identificados e enviados para o laboratório da Clínica do Leite, Piracicaba – SP, e as amostras avaliadas em até cinco dias. A contagem de células somáticas se deu por citometria de fluxo em contador automático.

A contagem de células somáticas foi dividida em três categorias distintas, sendo 0 resultados que variaram de 0 a 200 ($\times 10^3$ células/mL), 1 resultados de 201 a 4000 ($\times 10^3$ células/mL) e 2 resultados variando de 4001 a 10.000 ($\times 10^3$ células/mL). Os resultados da CCS, posteriormente, foram correlacionados aos demais exames da secreção láctea, exame clínico da glândula mamária, achados microbiológicos, exame de ultrassonografia modo B e sonoelastografia de compressão.

4.5.4 Análises microbiológicas

Todas as amostras obtidas provenientes de quartos mamários saudáveis e positivos para mastite clínica e subclínica pelos testes da caneca de fundo escuro, CMT e CCS (Schalm e Noorlander, 1957; Zafalon et al. 2010) foram submetidas às análises microbiológicas. Previamente à coleta, foi realizada assepsia rigorosa com gaze cirúrgica embebida em clorexidine degermante a 2% e posteriormente retirado com gaze embebida em clorexidine aquoso a 1%. Esse procedimento foi realizado três vezes por teto a ser coletado. Em seguida, 30 mL de amostras de leite de cada quarto mamário foram coletadas em tubos Falcon estéreis e armazenadas em caixa de isopor com gelo para serem transportadas até o Laboratório de Microbiologia da FCAV/Unesp. Em seguida, as amostras de leite foram semeadas em placas contendo ágar sangue bovino a 5% e ágar Mac Conkey e mantidas a 37°C em condições aeróbias, por até 72 horas. Os testes microbiológicos foram baseados nos protocolos padrão da *National Mastitis Council* (NMC) (LHBM, 1999). Os microrganismos foram isolados e identificados de acordo com as características morfotintoriais e bioquímicas, pela coloração de Gram, ágar *triple sugar iron* (TSI), teste do citrato de Simmons, teste da urease, teste da catalase e semeadura em sal manitol com indicador (Leonard et al., 2011).

4.6 Avaliação clínica da glândula mamária

A avaliação clínica das glândulas mamárias foi realizada por meio de inspeção e palpação. Foi observado o úbere antes da ordenha a fim de localizar aumentos de volumes, assimetrias ou alteração na coloração (hiperemia). A palpação foi realizada após a ordenha assim como a realização do pregueamento da pele que reveste o parênquima para avaliar a elasticidade da pele e tecido subcutâneo. Ato contínuo, foi realizada a palpação de todo o parênquima mamário do sentido caudal para cranial e dorsal a ventral de cada quarto mamário separadamente. Ambas as avaliações foram conduzidas seguindo as descrições de Feitosa (2008).

Após realizada a palpação completa de todas as estruturas (parênquima glandular, tetos e pele), à cada glândula mamária foi atribuída o score de Hannover que consiste em uma notação (em algarismos romanos que variam de 0 ou SA a VII) para representar os resultados da palpação do parênquima designados pela Escola Superior de Veterinária de Hannover. Lendo: 0 ou SA: mama recém ordenhada, apresenta-se firme a pressão com granulação fina, distendida e tensa antes da ordenha interpretado como glândula mamária normal; 1: nodulação grosseira, dura mas pequena e localizada, também caracterizado como normal; 2: nodulação grosseira, dura e generalizada com nódulos localizados de pequeno tamanho, normal em vacas de várias lactações; 3: nódulos duros de tamanho médio com distribuição generalizada no parênquima mamário, vaca recuperada de mastite ou mastite atual; 4: nódulos grandes e duros, confluentes, com endurecimento de lóbulos glandulares, interpretado como mastite em fase de cronificação; 5: endurecimento difuso do parênquima glandular, designando mastites crônicas; 6: edema inflamatório agudo da glândula mamária, rubor, calor, dor e tumor, consistência pastosa, além da alteração de função, associado a mastite aguda; 7: edema fisiológico da mama no pós-parto, há menos sinais alarmantes mas assemelha-se as do processo inflamatório (Feitosa, 2008).

Além disso foram realizadas avaliação da temperatura e coloração da glândula mamária, sendo para temperatura escala atribuída de 0: temperatura

normal, 1: para temperatura diminuída e 2: temperatura aumentada. Resultados para coloração variaram de 0: sem alterações e 1: presença de alteração na coloração da glândula mamária.

4.7 Sonoelastografia por compressão

Os exames elastográficos dos quartos mamários foram realizados após higienização com compressas embebidas em álcool 70%. Todas as avaliações elastográficas foram realizadas imediatamente após a segunda ordenha do dia.

Antes dos exames foi aplicado gel específico para a realização da ultrassonografia, para melhor cooptação do transdutor à pele. As avaliações foram realizadas com os animais em posição quadrupedal, com os membros apoiados no solo em local adequado para manejo de bovinos. Para tal, foi utilizado aparelho ultrassonográfico portátil com transdutor convexo multifrequencial¹. O exame foi realizado por um único ultrassonografista, alheio aos resultados das análises clínicas, microbiológicas, do CMT e da CCS.

As imagens sonoelastográficas foram obtidas conforme protocolo descrito para mulheres (Arslan et al., 2018), aqui adaptado aos bovinos. Foram obtidas imagens parasagittais dos quatro quartos mamários.

Para os quartos anteriores, as imagens foram obtidas no aspecto lateral das glândulas mamárias, no ponto médio entre a inserção do úbere na musculatura abdominal e o ponto de transição entre a glândula e o teto. Já nos quartos posteriores, as imagens foram obtidas na porção caudal das glândulas mamárias (Figuras 1 e 2).

A interpretação das imagens sonoelastográficas foi baseada em escala de porcentagem. Quartos mamários atribuídos como 0 na sonoelastografia por compressão representam resultados que variam de 0 a 60%. Resultados de 61 a 100% foram categorizados como 2. Quanto maior a porcentagem, menor a firmeza do tecido avaliado (ou mais macio) em relação aos tecidos adjacentes.

Assim como descrito por Arslan et al. (2018), concomitantemente às avaliações elastográficas foi realizada avaliação ultrassonográfica em modo B (janela dupla). A caracterização das lesões teciduais, à avaliação ultrassonográfica em modo B, seguiu os critérios estabelecidos por Flöck e Winter (2006).

¹ aparelho de ultrassom Esaote myLab Alpha e transdutor convexo multifrequencial

Para a avaliação ultrassonográfica, os resultados variaram de 0, atribuídos a parênquima normal e 1, àqueles com alteração estrutural no parênquima. As alterações estruturais avaliadas foram, parênquima não homogêneo e hipoecoico; parênquima não homogêneo e hiperecoico; parênquima não homogêneo e presença de edema; presença de abscesso; presença de hematoma e padrão mosqueado.

Ressalva-se que o exame ultrassonográfico não foi utilizado para caracterização da higidez ou presença de lesão nos quartos mamários durante a caracterização (e divisão) dos grupos. Isto para que o ultrassonografista fosse completamente imparcial, posteriormente, durante sua avaliação, já que o mesmo realizou o exame sem conhecer os resultados dos outros testes clínico



Figura 1. Animal em posição quadrupedal para avaliação sonoelastográfica da glândula mamária anterior direita utilizando aparelho de ultrassom Esaote myLab Alpha e transdutor convexo multifrequencial, posicionado no ponto médio entre a inserção do úbere na musculatura abdominal e a transição entre a glândula mamária e teto. FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2021.



Figura 2. Animal em posição quadrupedal para avaliação sonoelastográfica da glândula mamária posterior esquerda utilizando aparelho de ultrassom Esaote myLab Alpha e transdutor convexo multifrequencial, posicionado no ponto médio na região caudal da glândula mamária. FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2021.

4.8 Análise estatística

A associação entre a presença (e a classificação) da mastite e as variáveis avaliadas, dentre elas, a inspeção física dos quartos mamários, o teste de caneca de fundo preto, *California Mastitis Test*, contagem de células somáticas, cultura microbiana, avaliação clínica e avaliação ultrassonográfica foram avaliados por técnica exploratória multivariada de componentes principais, após caracterização dos resultados e padronização das variáveis (média nula e variância unitária). O nível de significância atribuído foi de $p < 0,05$. Para tal utilizou-se programa computacional *Statistical Data Analysis Software System* versão 7 (StatSoft, TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA). As demais variáveis foram avaliadas de forma descritiva.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação clínica

A média dos parâmetros avaliados bem como valores individuais da frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura retal, coloração de mucosas e movimentos ruminais estão apresentados em formato de tabela. Não houve

diferença estatística entre os grupos para os parâmetros clínicos submetidos ao teste T de Student.

5.2. Exames laboratoriais

A média dos parâmetros laboratoriais avaliados bem como valores individuais da contagem de hemácias, teor de hemoglobina, hematócrito, contagem de plaquetas, contagem de leucócitos totais, basófilos, eosinófilos, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos, concentração de proteína total plasmática e teor de fibrinogênio estão apresentados em formato de tabela. Não houve diferença estatística entre os grupos para os parâmetros laboratoriais submetidos ao teste T de Student.

5.3. Exames da secreção láctea

5.3.1. Teste da caneca de fundo preto, *California Mastitis Test* (CMT) e contagem de células somáticas (CCS)

Os quartos caracterizados como controle, por não apresentarem características compatíveis com quadros de mastite clínica e mastite subclínica (Figura 3, Figura 4, Figura 5 e Figura 6) apresentaram correspondência das variáveis CMT, CCS e caneca de fundo preto pela análise multivariada de correspondência múltipla (Figura 13). O grupo mastite subclínica, apresentou correspondência da variável CCS. Já o grupo referente aos quartos positivos para mastite clínica foi observada correspondência entre as variáveis CMT, CCS e caneca de fundo preto (Figura 13).



Figura 3. Amostra de leite obtida durante a ordenha para inspeção de suas características macroscópicas por meio de exame de caneca de fundo preto sendo evidenciada secreção láctea espessa com presença de secreção purulenta. FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2021.



Figura 4. Amostra de leite obtida durante a ordenha para inspeção de suas características macroscópicas por meio de exame de caneca de fundo preto sendo evidenciado leite espesso e com presença de grumos, classificada. FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2021.

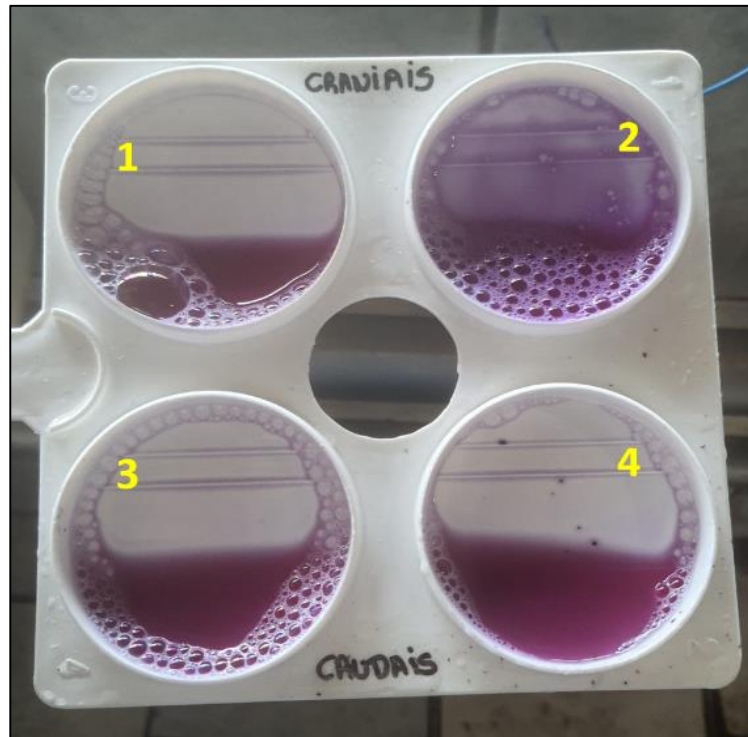


Figura 5. Amostra de leite submetida ao *California Mastitis Test* (CMT). Áreas demarcadas com os números 1,3 e 4: resultado negativo (escore 0) no teste CMT. Área demarcada com o número 2: resultado positivo (++, escore 2). FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2021.

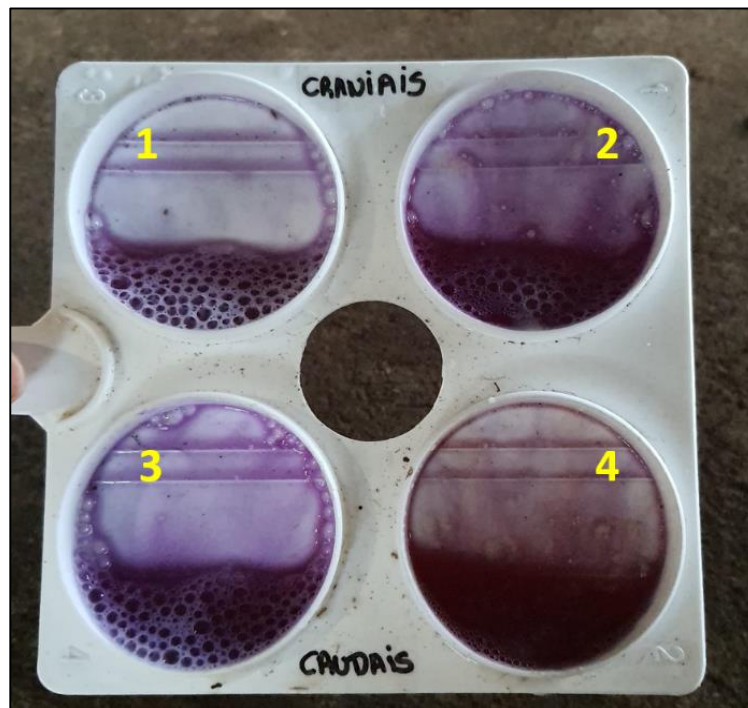


Figura 6. Amostra de leite submetida ao teste *California Mastitis Test* (CMT). Áreas demarcadas com os números 1 e 3: resultado positivo (++, escore 2) no teste CMT. Área demarcada com números 2 e 4: resultado fortemente positivo (+++, escore 3). FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2021.

5.3.2 Análise microbiológica

O grupo categorizado como mastite clínica apresentou 68,42% (13/19) dos quartos positivos para crescimento microbiológico, sendo 52,63% (10/19) sugestivo para *Staphylococcus aureus*, 10,53% (2/19) sugestivo para *Escherichia coli* e 5,27% (1/19) sugestivo de infecção mista entre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Dos quartos pertencentes ao grupo mastite subclínica, 14,81% (4/27) apresentaram resultados negativos e 85,18% (23/27) apresentaram crescimento bacteriano (Figura 7, Figura 8 e Figura 9). Referente aos quartos positivos, 82,61% (19/27) foram sugestivos para presença de *Staphylococcus aureus*, 17,29% (3/27) sugestivos para *Staphylococcus não aureus* e 4,35% sugestivo de *Escherichia coli* (1/27). Os quartos pertencentes ao grupo controle não apresentaram crescimento bacteriano.

Os resultados positivos na análise microbiológica apresentaram correlação estatística com ambos os grupos, mastite clínica e mastite subclínica, bem como resultado negativo com o grupo controle.

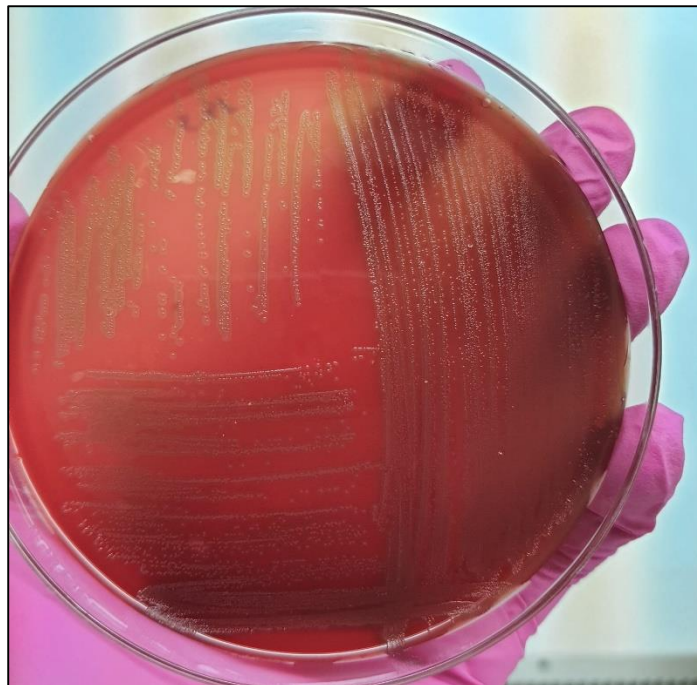


Figura 7. Crescimento bacteriano após inoculação de amostra de secreção láctea em placa de Petri contendo ágar sangue bovino a 5% após 48 horas de manutenção a 37°C em condições aeróbias. FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2021.

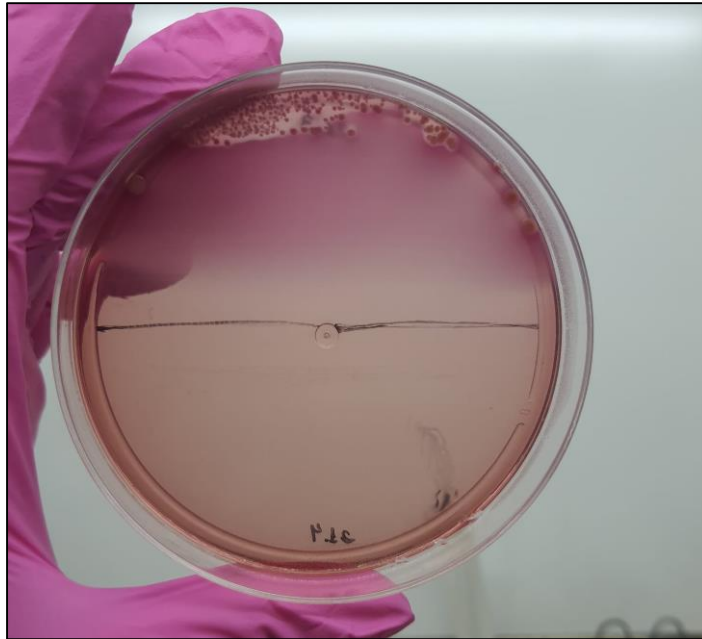


Figura 8. Crescimento bacteriano após inoculação de amostra de secreção láctea em placa de Petri contendo ágar Mac Conkey após 48 horas de manutenção a 37°C em condições aeróbias. FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2021.

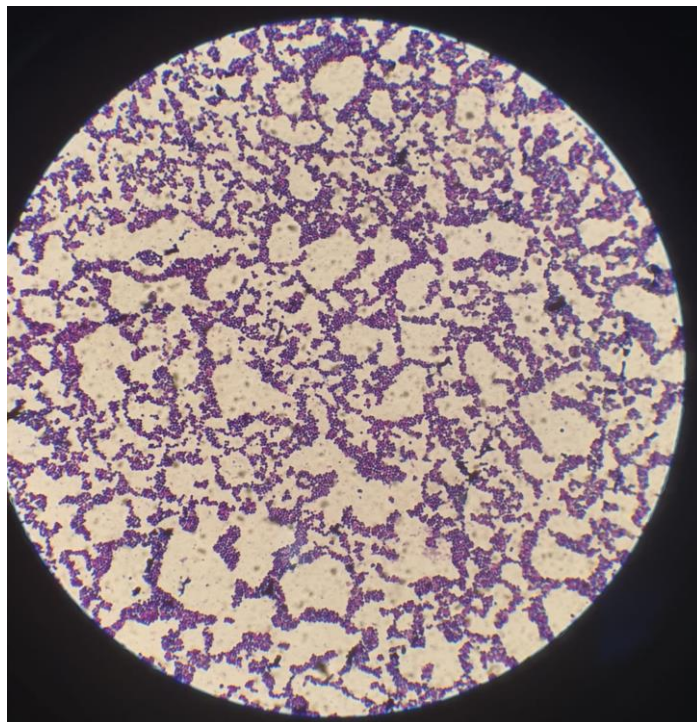


Figura 9. Característica morfotintorial pela técnica de coloração de Gram de microrganismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp. FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2021.

5.4. Avaliação glândula mamária

Dos 19 quartos diagnosticados com mastite clínica, apenas três (15%) não apresentaram alterações durante a palpação e avaliação da temperatura e coloração do úbere. Os demais apresentaram alterações compatíveis com resultados que variaram de 3 a 6 no escore de Hannover, sendo interpretados como, vaca recuperada de mastite ou caso de mastite atual, mastite em fase de cronificação, mastite crônica e mastite aguda com edema e congestão, respectivamente, totalizando 84% (16/19) dos quartos avaliados. Em 31,6% (6/19) dos quartos foi observado aumento da temperatura e em 26,31% (5/19) foram constatadas alterações na coloração do úbere, com presença de áreas hiperêmicas. Foi observada correspondência na análise estatística entre as variáveis palpação e temperatura com as demais avaliações da secreção láctea para o grupo referente aos quartos diagnosticados com mastite clínica (Figura 13).

Para o grupo mastite subclínica, 62,97% (17/27) dos quartos apresentaram resultado normal à palpação (0, 1 e 2) interpretados como parênquima normal ou normal em vacas de várias lactações. Em 18,52% (5/27) de quartos observou-se aumento de temperatura e 22,22% (6/27) apresentaram áreas de hiperemia. O grupo mastite subclínica não apresentou correspondência estatística da avaliação clínica direta da glândula mamária (temperatura e palpação).

As variáveis descritas, palpação e temperatura foram estatisticamente correspondentes entre si e com as demais avaliações da secreção láctea e ultrassonografia modo B para o grupo controle (Figura 13).



Figura 10. Inspeção visual do úbere. Quarto mamário posterior direito apresentando assimetria em relação aos quartos mamários adjacentes após ordenha completa. FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2021.

5.5 Sonoelastografia por compressão

À esquerda do gráfico biplot 2 (Figura 14) observa-se que os animais do grupo controle (Mastite_N) estão relacionados aos aspectos ultrassonográficos normais dos quartos mamários, bem como ausência de achados ao exame da caneca de fundo preto (Caneca_Sadio), palpação (Palpação_N e Temp_N), CMT (CMT_N), contagem de células somáticas baixa (CCS_0) e cultura microbiana negativa (Cult_N). Já os quartos classificados com mastite subclínica (Mastite_Sub) apresentaram forte relação com contagens moderadas de células somáticas (CCS_1), cultura microbiana positiva (Cult_pos) e presença de grumos ao CMT (CMT_G). Naqueles quartos caracterizados com mastite clínica (Mastite_Cli), observou-se forte relação com alterações ao CMT (CMT_G) e ao teste da caneca de fundo preto (Caneca_Lesão), bem como constatação de alterações na estrutura do parênquima à palpação (Palpação_A), conjuntamente com aumento de temperatura local (Temp_A) e contagens mais relevantes de células somáticas (CCS_2). Ainda, como pode ser constatado, as alterações ultrassonográficas observadas nos quartos avaliados

(Ultrassom_A), não foram sensíveis o suficiente para distinguir quartos apresentando mastite subclínica daqueles com mastite clínica.

No gráfico biplot 1 (Figura 13) não foi incluído os resultados da elastografia, pois conforme pode ser observado no gráfico biplot 2 (Figura 14), a variável em questão configurou um processo isolado, sem qualquer relação com os demais achados clínicos.

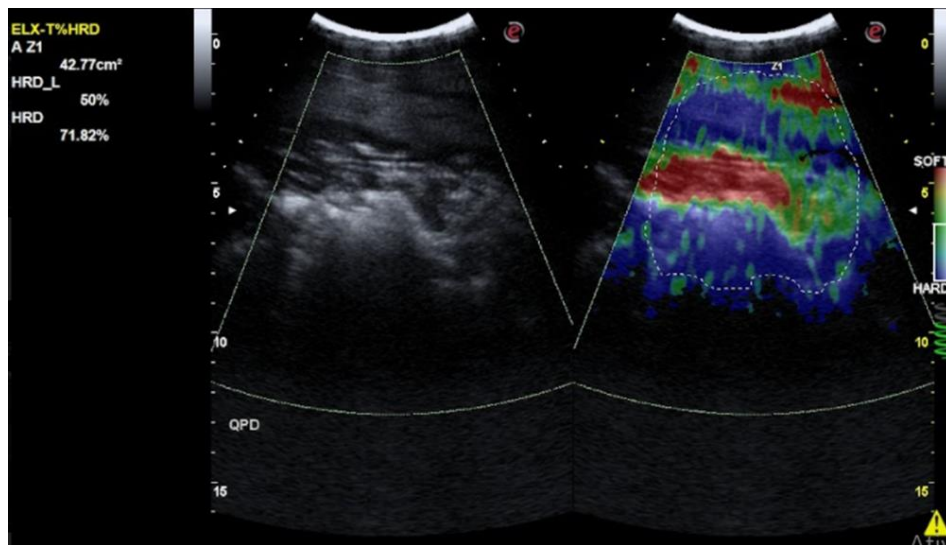


Figura 11. Imagem ultrassonografia modo B ao lado esquerdo da imagem demonstrando a presença de alteração do parênquima sugestivo para presença de abscesso. Imagem sonoelastografica a direita apresentando imagem sugestiva de abscesso com interior predominantemente vermelho e circundado por coloração verde e azul com 71.82% dos pixels fora da escala de dureza dos tecidos. FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2021.

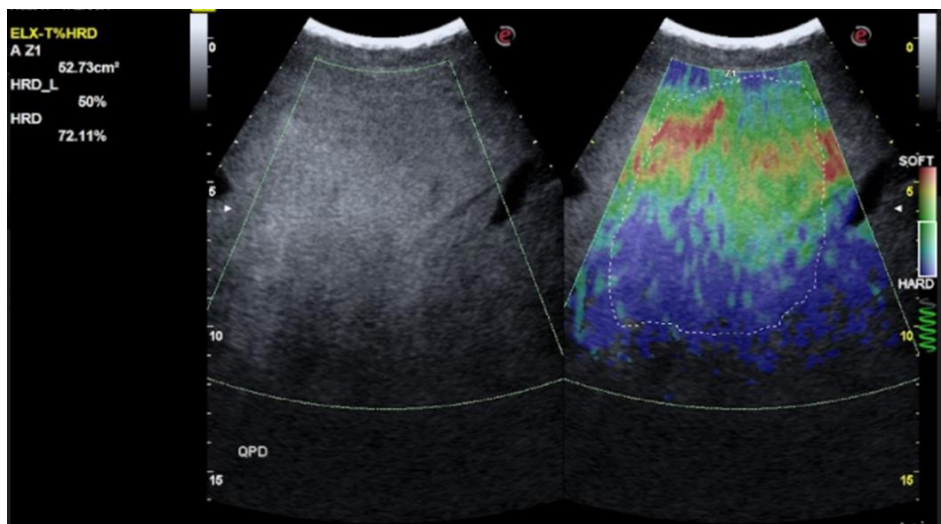


Figura 12. Imagem ultrassonografia modo B ao lado esquerdo da imagem demonstrando parênquima mamário homogêneo, sem alterações. Imagem sonoelastografica a direita apresentando 72.11% dos pixels fora da escala de dureza dos tecidos. FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2021.

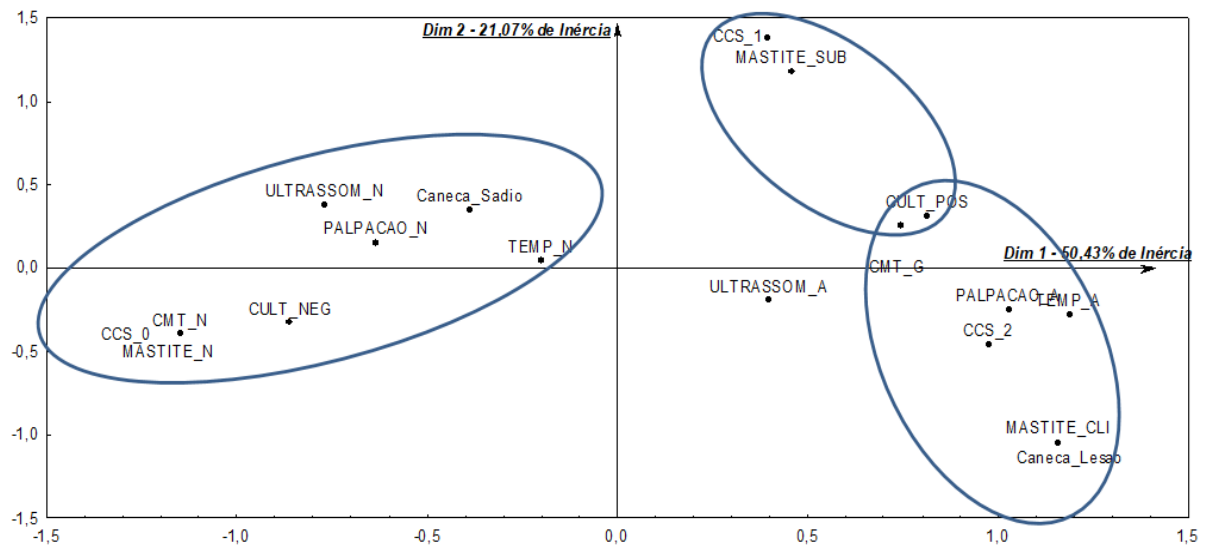


Figura 13. Gráfico biplot 1 originado pela interação entre o componente principal 1 (Dim1) e 2 (Dim2), os quais expressam 71,5% dos resultados obtidos para 76 quartos mamários de 26 vacas leiteiras das raças Holandesa e mestiças Girolando, divididos em três grupos: controle (Mastite_N), mastite subclínica (Mastite_Sub) e mastite clínica (Mastite_Cli). À esquerda demonstra-se a correlação entre as variáveis ultrassonografia modo B (Ultrassom_N), teste da caneca de fundo preto (Caneca_Sadio), *California Mastitis Test* (CMT_N), contagem de células somáticas (CCS_0), microbiológico negativo (Cult_NEG), palpação da glândula mamária (Palpacao_N) e temperatura da glândula mamária (Temp_N) para o grupo controle (Mastite_N). À direita, demonstra-se no quadrante superior a correlação entre as variáveis contagem de células somáticas (CCS_1) e microbiológico positivo (Cult_POS) para o grupo mastite subclínica (MASTITE_SUB). À direita, demonstra-se no quadrante inferior a correlação entre as variáveis contagem de células somáticas (CCS_2), *California Mastitis Test* (CMT_G), microbiológico positivo (Cult_POS), teste da caneca de fundo preto (Caneca_Lesao) e palpação da glândula mamária (PALPAÇÃO_A) para o grupo mastite clínica (MASTITE_CLI). Ultrassonografia modo B (ULTRASSOM_A) demonstrando não correlação entre os grupos mastite clínica e subclínica.

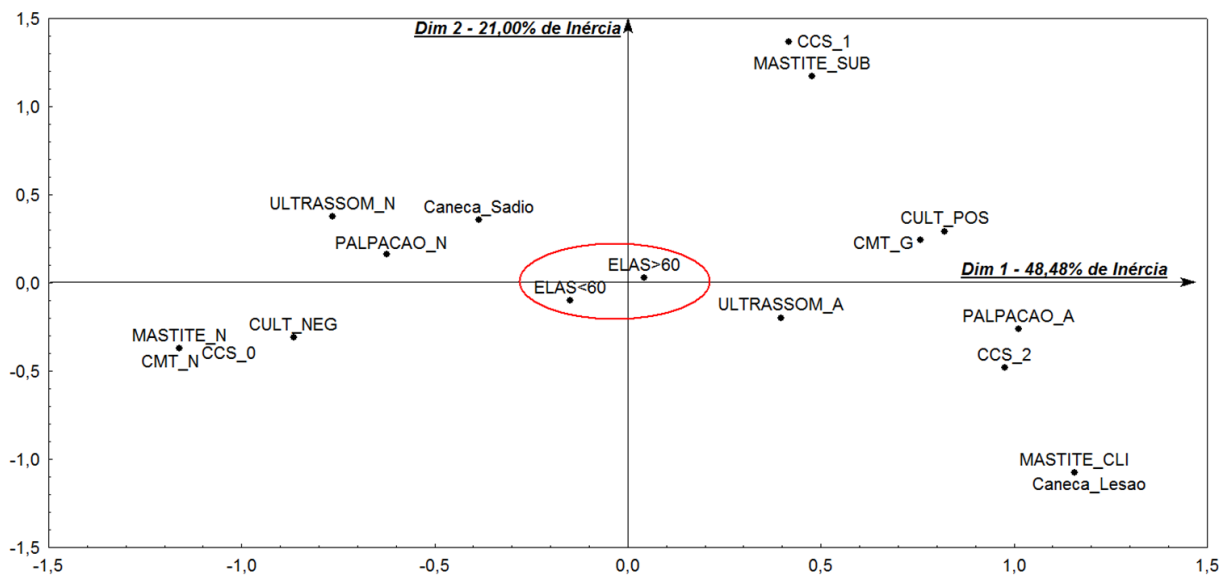


Figura 14. Gráfico biplot 2 originado pela interação entre o componente principal 1 (Dim1) e 2 (Dim2), os quais expressam 69,48% dos resultados obtidos 76 quartos mamários de 26 vacas leiteiras das raças Holandesa e mestiças Girolando, divididos em três grupos: controle (Mastite_N), mastite subclínica (Mastite_Sub) e mastite clínica (Mastite_Cli). Ao centro está demonstrada a não correlação do exame de elastografia (ELAS>60 e ELAS<60) com as demais variáveis ultrassonografia modo B (ULTRASSOM_N e ULTRASSOM_A), teste da caneca de fundo preto (Caneca_Sadio e Caneca_Lesao), palpação da glândula mamária (PALPAÇAO_N e PALPAÇAO_A), análise microbiológica (CULT_NEG e CULT_POS), contagem de células somáticas (CCS_0, CCS_1 e CCS_2) e *California Mastitis Test* (CMT_N e CMT_G) para os grupos controle (MASTITE_N), grupo mastite clínica (MASTITE_CLI) e mastite subclínica (MASTITE_SUB).

6. DISCUSSÃO

A inflamação da glândula mamária, descrita como mastite, pode ser decorrente, ou não, de processo infeccioso e é uma das mais importantes doenças em rebanhos leiteiros (Bergonier e Berthelot, 2003). A massiva maioria das mastites são infecciosas, sendo 90% dos casos de origem bacteriana, onde frequentemente são isoladas bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. promovendo mastites clínicas (Philpot e Nickerson, 1991; Contreras et al., 2007; Arsenault et al., 2008), além de bactérias do gênero *Streptococcus* spp. e outras menos incidentes (Bergonier e Berthelot, 2003; Gonzalo et al., 2004; Contreras et al., 2007). Outros patógenos como fungos, leveduras, algas e vírus também podem estar envolvidos na etiologia da doença, porém a ocorrência é considerada baixa (Tozetti et al., 2008).

Tais dados corroboram os achados do presente estudo que demonstrou crescimento microbiológico em 68,42% das amostras lácteas provenientes de

quartos mamários classificados como positivos para mastite clínica e crescimento microbiológico em 82,61% das amostras provenientes de quartos classificados como mastite subclínica, presumindo assim que, de maneira majoritária, a doença foi decorrente de agentes infecciosos, sobretudo, bactérias. As demais amostras, negativas na análise microbiológica, apesar do diagnóstico positivo para a enfermidade, pode ser explicado pelo envolvimento de agentes etiológicos de origem não bacteriana, ou fisiológicos, que apesar de menos prevalentes, podem estar associados aos quadros clínicos e subclínicos.

Ademais, o isolamento do agente etiológico pode não ser possível por diversas razões, como a excreção intermitente e em quantidade reduzida do microrganismo, patógeno relacionado pode não ser detectável pela utilização de testes microbiológicos convencionais, algumas enzimas ou proteínas presentes no leite podem mascarar a detecção do patógeno e a infecção pode ser apoiada por endotoxinas bacterianas e outros compostos liberados por neutrófilos que podem permanecer, mesmo após a eliminação das bactérias invasoras (Pyörälä 2003; Nunes et al., 2008).

Estudo realizado em fazendas leiteiras na região sul do Brasil objetivou identificar as principais espécies presentes nas amostras coletadas a partir de quartos mamários com alterações visuais da secreção láctea ou positivos no teste CMT, demonstrando como resultado a ocorrência de *Staphylococcus* spp. em maior prevalência (82,3%) seguida de *Bacillus* spp. (3,9%), *Klebsiella* spp. (3,9%), *Streptococcus* spp. (3,9%), *Corynebacterium* spp. (2%), *Enterococcus* spp. (2%) e *Serratia* spp. (2%) (Lopes et al., 2021). A partir das análises, o *Staphylococcus* spp. foi o agente etiológico isolado na maioria das amostras positivas para mastite clínica e subclínica, concordando a literatura consultada.

Além da identificação microbiológica, a contagem de células somáticas tem sido utilizada amplamente como indicador de infecções intramamárias, sendo incluída como componente de definição de mastite e aumentando acentuadamente durante a infecção (Pyörälä 2003; Schukken et al., 2003; Della Libera et al., 2011; Dufour e Dohoo, 2013). Há, na literatura, ampla variação do limite considerado saudável para contagem de células somáticas no leite. Autores defendem que CCS acima de 200×10^3 células somáticas/mL de leite já é indicativo de quedas na

produção e qualidade do leite, indicando mastite subclínica em níveis elevados no rebanho (Barbosa et al., 2002; Coldebella et al. 2004; Magalhães et al. 2006).

A sensibilidade e especificidade utilizando limite abaixo de 200×10^3 células somáticas/mL de leite, têm sido avaliada em diversos estudos demonstrando variação de 73 a 89% de sensibilidade e 75 a 85% de especificidade (Ruegg, 2002).

No presente estudo, para enquadrar o quarto mamário no grupo controle foram utilizados como parâmetros CMT negativo, associado a ausência de alterações no exame físico da glândula mamária, ausência de alterações visuais na secreção láctea e, apenas confirmada a inclusão, após resultados inferiores a 200×10^3 células somáticas/mL de leite de leite e cultura negativa, corroborando a literatura, a qual relata a necessidade de sempre avaliar a CCS em conjunto com análise microbiológica, pois pode não haver concordância completa dos resultados (Pyorala, 2003).

Estudo reportou que 59,6% de amostras de leites com resultados de CCS inferior a 200.000 células/mL apresentaram cultura negativa (Hisira et al., 2019). No presente estudo, 100% das vacas classificadas como controle, a partir da avaliação da secreção láctea, CMT e avaliação clínica geral e específica da glândula mamária apresentaram CCS abaixo de 200.000 células/mL e cultura negativa.

Os valores de CCS e os resultados do CMT, bem como a correlação positiva entre ambos os testes, também demonstrou ser bastante úteis na fase inicial da lactação, por conseguir identificar, qualitativamente, a presença de microrganismos causadores da mastite nos quartos mamários. Diante disso, o CMT foi creditado como um teste útil para o diagnóstico da mastite subclínica nos rebanhos (Sargeant et al. 2001; Barbosa et al. 2002; de Sá et al. 2018). Neste aspecto, nossos resultados corroboram as observações dos autores no que tange a eficácia do CCS e do CMT na identificação da mastite clínica ou subclínica em vacas leiteiras.

Estudo realizado por Arslan et al. (2018) avaliou as vantagens do ultrassom do modo B combinadas com a elastografia de tensão na diferenciação de mastite granulomatosa idiopática de lesões malignas nos seios de mulheres. Foram realizadas comparações da relação de tensão (*strain ratio*) fornecido pelo próprio software durante o exame e escore elastográfico das lesões em relação as áreas

subjacentes que é caracterizado visualmente em escores de 1 a 5, sendo 1 a 3 lesões caracterizadas como benignas e 4 e 5 malignas. Os valores médios de relação de tensão e escore elastográfico para lesões mamárias malignas foram significativamente maiores do que aqueles para a mastite granulomatosa concluindo que o uso combinado de modo B e elastografia é eficaz para diferenciação de mastite e lesões mamárias malignas com excelente sensibilidade e taxas de especificidade.

Da Silva et al. (2021), avaliaram 27 fêmeas ovinas, suas glândulas mamárias e linfonodos utilizando elastografia por impulso de força de radiação acústica (ARFI) para diagnóstico de mastite em glândulas fibrosadas dividindo os grupos experimentais de acordo com a CCS em: GC com CCS < 500 x10³ células somáticas/ml de leite, sem fibrose em parênquima; Grupo CB com baixa contagem de células (CCS < 500 x10³ células somáticas/ml de leite) e presença de fibrose na glândula; CA com CCS > 500 x10³ células somáticas/ml de leite e presença de fibrose. A partir das variáveis qualitativas (ecogenicidade e ecotextura) e quantitativas (velocidade de cisalhamento, profundidade e proporção eixo curto/longo) obtidas concluíram que a elastografia ARFI pode indicar pontos de corte para que haja diferenciação de um processo de mastite ativa de mastites que já se curaram. A elastografia ARFI foi uma ferramenta excelente para diferenciação das áreas normais de áreas fibrosadas em parênquima. Diferentemente do relatado, no estudo em questão, a elastografia configurou um processo isolado, sem qualquer relação com a mastite clínica e mastite subclínica.

Contudo, há de se levar em consideração que as alterações estruturais do parênquima mamário dos animais avaliados apresentou-se muito discreta. Neste aspecto, a elastografia não foi eficaz na detecção destas alterações pormenores. Entretanto, permitiu, conjuntamente com a ultrassonografia em modo-B, a identificação de alterações focais nas glândulas mamárias, tais como a presença de edema ou abscessos. Há de se averiguar as alterações elastográficas presentes no parênquima mamário de pacientes com mastite crônica visto que, a mastite crônica aumenta substancialmente o risco de fibrose nos tecidos mamários acometidos (Hillerton, 1996). Nestes casos há prolongada agressão e morte celular, que proporciona o aparecimento de cicatrizes ou endurecimento do quarto mamário

(Pereira, 2011). A fibrose pode afetar de maneira parcial ou total um ou mais quartos mamários a depender da extensão do problema. Quando parcial, o úbere pode seguir produzindo leite, ou se transformar em não produtivo quando afetado totalmente. Ademais, tais quadros podem acarretar a persistência da infecção após período seco (Santos et al., 2022).

A capacidade de detectar áreas de fibrose imperceptíveis à palpação em casos de mastite crônica pode facilitar o diagnóstico e tratamento e ainda ser ferramenta para orientar o descarte preciso de animais do rebanho pois capacitaria a distinção de vacas com redução na produtividade devido a causas reversíveis, responsivas a tratamento, de outras em que a cronicidade da enfermidade ocasionou comprometimento da glândula mamária afetando a produção de maneira irreversível e ainda caracterizando possíveis reservatórios para manutenção da doença no rebanho. Pela ausência de animais com este quadro clínico, não foi possível a inclusão de um grupo “mastite crônica” no estudo.

O edema local, presente nos tecidos em quadros de mastite é facilmente identificado utilizando ultrassonografia Segundo O'Brien et al. (2002). Na imagem elastográfica, a inflamação e o edema demonstram aumento significativo nos valores de rigidez tecidual. Imagens obtidas por meio da elastografia que se relacionam a abscessos apresentam maior maciez central, caracterizando a lesão, envolta por tecido rígido decorrente do edema e inflamação (Barr, 2020). A elastografia, nesse sentido, pode colaborar juntamente com a ultrassonografia na diferenciação de edema fisiológico daqueles ocasionados pela enfermidade.

Uma das glândulas mamárias avaliadas no presente estudo, apresentava imagem sugestiva de abscesso na avaliação modo B. Quando comparada com a imagem sonoelastográfica, foi possível notar imagem semelhante ao relatado em literatura, em que o centro da formação nodular apresentava coloração vermelha, caracterizando tecido de menor dureza, envolto por camada de coloração verde que, comparada ao vermelho na escala de cores, sugere tecido de maior rigidez, sendo assim, reforçando assim a suspeita clínica.

Tal informação é relevante pois vários fatores podem interferir na cura bacteriológica quando se utiliza a terapia com antibióticos, como o estágio da ocorrência da infecção, incapacidade de defesa das células mamárias e, inclusive,

presença de bactérias no interior de abscessos (Faria, 1995). Portanto, o diagnóstico preciso da presença de abscesso em quadros de mastite, quando esses não são perceptíveis à palpação e não possuem comunicação com meio externo através de fístulas, é de grande relevância, pois pode explicar a recorrência ou manutenção do quadro infeccioso em determinado animal.

A técnica elastográfica utilizada fornece imagens que demonstram a rigidez relativa dos tecidos dentro do campo de visão (FOV), não sendo capaz de mensurar a rigidez absoluta da área avaliada. Para tal, faz-se necessária a avaliação em comparação com o modo B para se obter informações clinicamente úteis (Barr et al., 2012; Barr, 2014). Em contrapartida, a ARFI oferece abordagem quantitativa por meio de impulso acústico enviado para uma região de interesse e a formação de ondas de pressão capazes de deformar os tecidos para elevar a velocidade da propagação de ondas (velocidade da tesoura) e fornecer um resultado que expressa rigidez absoluta do tecido avaliado (Comstock, 2011). Tal diferença de técnica pode explicar o resultado do estudo onde a elastografia não apresentou capacidade de diagnóstico da enfermidade visto que, na maioria dos casos, as lesões das glândulas mamárias decorrentes de mastite levam a acometimento generalizado dos tecidos. Essa hipótese pode ser reforçada a partir da glândula comprometida com abscesso, onde, nesse caso, a técnica se mostrou eficaz para confirmar a presença da lesão, visto que houve a possibilidade de comparação da alteração com tecidos adjacentes.

Outro ponto importante a ser levado em consideração é o fato de o software do método ARFI exigir maior desempenho dos equipamentos. Por isso, normalmente esta modalidade elastográfica só pode ser encontrada em aparelhos “fixos” e mais robustos, de difícil mobilidade. Já a elastografia por compressão pode ser prontamente encontrada em equipamentos portáteis, como o utilizado no presente estudo.

Não existem outros trabalhos que utilizam a técnica da elastografia por compressão em glândulas mamárias da espécie bovina o que eleva o grau de dificuldade decorrente do pioneirismo para o presente estudo, porém amplia, na mesma proporção, as possibilidades de exploração sobre o tema. A elastografia é um exame que, mesmo na Medicina Humana, ainda se encontra em fase de

estudos clínicos para rastrear sua eficiência no diagnóstico das mais diversas enfermidades, em comparação com métodos já consolidados por ampla literatura. Na Medicina Veterinária, os estudos são poucos e ainda há um vasto campo a ser pesquisado.

Por se tratar de um método de diagnóstico ultrassonográfico avançado, não invasivo, capaz de fornecer informação valiosa sobre elasticidade de tecidos, sugere-se novos estudos utilizando a técnica para avaliação, diagnóstico e, o mais aplicável, para o prognóstico da mastite em vacas leiteiras. A avaliação de animais induzidos experimentalmente, onde as características das lesões podem ser controladas pela padronização do agente etiológico, além de categorização dos animais induzidos por meio dos números de lactações, volume de leite produzido (baixa, média e alta produção), associação das técnicas elastográficas (sonoelastografia por compressão e ARFI), novos métodos de rastreio da glândula mamária, visto que, o presente estudo propôs a primeira metodologia utilizando imagens parasagittais dos quatro quartos mamários, e também avaliação de linfonodos mamários podem ser úteis para a padronização da técnica em pesquisas futuras, com resultados promissores no que se refere ao diagnóstico e prognóstico de lesões mamárias de fêmeas bovinas acometidas por mastite.

7. CONCLUSÃO

Devido à prevalência e impacto decorrente da mastite nos rebanhos leiteiros a prevenção, diagnóstico e prognóstico da enfermidade são de extrema relevância. A evolução dos métodos de diagnóstico contribui para que estratégias de controle e tratamento sejam assertivas. Pelo posto, o teste da caneca de fundo preto, CMT, CCS e cultura microbiológica, quanto utilizados em conjunto, são capazes de descartar ou diagnosticar adequadamente quadros clínicos ou subclínicos da mastite nas vacas leiteiras. A sonoelastografia por compressão, apesar de não detectar as alterações mais tênues no parênquima mamário decorrentes da mastite clínica ou subclínica no presente estudo, deve ser foco de estudos posteriores no que tangem a importância da técnica e perspectiva futura de sua aplicabilidade na detecção de fibroses, abscessos e demais lesões localizadas no parênquima mamário de vacas portadoras de mastite crônica. O

pioneirismo da técnica apresentado permite campo de exploração amplo e diversificada. Além disso, o presente estudo servirá de fundamento para desenvolvimento de novos delineamentos experimentais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akers RM, Nickerson SC (2011) Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia** 16:275-289.
- Aigner F, De Zordo T, Pallwein-prettner L, Junker D, Schäfer G, Pichler R, Leonhartsberger L, Pinggera G, Dogra VS, Frauscher, F (2012) Real-time sonoelastography for the evaluation of testicular lesions. **Radiology** 263:584-589.
- Araujo GD, De Souza KB, Dos Santos LA, Ribeiro RP (2012) Aspectos morfológicos e fisiológicos de glândulas mamárias de fêmeas bovinas–revisão de literatura. **PUBVET** 6:1478-1483.
- Arslan S, Oncü F, Eryilmaz MA, Durmaz MS, Altunkeser A, Unlü Y (2018) Advantages of b-mode ultrasound combined with strain elastography in differentiation of idiopathic granulomatous mastitis from malignant breast lesions. **Turkish Journal of Medical Sciences** 48:16-23.
- Bragulla H, König HE (2004). Glândula Mamária nos Animais Domésticos (Mamma). In: **Anatomia dos Animais Domésticos Vol.2 – Órgãos e Sistemas**. Porto Alegre: Artmed, p. 335-342.
- Barbosa CP, Benedetti E, de Almeida Ribeiro SC, Guimaraes EC (2002) Relação entre contagem de células somáticas (CCS) e os resultados do California Mastitis Test” (CMT), no diagnóstico de mastite bovina. **Bioscience Journal** 18: 93-102.
- Bar D, Gröhn YT, Bennett G, González RN, Hertl JA, Schulte HF, Tauer LW, Welcome FL, Schukken YD (2008) Effects of repeated episodes of generic clinical mastitis on mortality and culling in dairy cows. **Journal of Dairy Science** 91:2196-2204.
- Barr RG, Zhang Z (2015) Shear-wave elastography of the breast: value of a quality measure and comparison with strain elastography. **Radiology** 275:45-53.
- Barr RG (2014) Elastography in clinical practice. **Radiologic Clinics** 52:1145-1162.
- Barr RG, Destounis S, Lackey LB, Svensson WE, Balleyguier C, Smith C (2012) Evaluation of breast lesions using sonographic elasticity imaging: a multicenter trial. **Journal of Ultrasound in Medicine** 31:281-287.

Barr RG (2010) Real-time ultrasound elasticity of the breast: initial clinical results. **Ultrasound Quarterly** 26:61-66.

Barr RG (2020). Breast elastography. **Tissue Elasticity Imaging**, p. 21-46.

Benites NR, Guerra JL, Melville PA, da Costa EO (2002) Aetiology and histopathology of bovine mastitis of spontaneous occurrence. **Journal of Veterinary Medicine** 49:366-730.

Bergonier D, Berthelot X (2003). New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. **Livestock Production Science** 79:1–16.

Bian Y, lv Y, li Q (2014) Identification of diagnostic protein markers of subclinical mastitis in bovine whey using comparative proteomics. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy** 58:385-392.

Blond L, Buczinski S (2009) Basis of ultrasound imaging and the main artifacts in bovine medicine. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice** 25:553-565.

Blowey R, Edmondson E (Eds.) (2010) Mastitis Control in Dairy Herds. Cambridge: CAB International, 272p.

Da Silva BY (2021). Aspectos clínico-laboratoriais e sonográficos no diagnóstico complementar de lesões fibróticas em parênquima mamário de fêmeas ovinas. Dissertação (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Unesp Jaboticabal.

Bragulla H, König HE (2004) Glândula Mamária nos Animais Domésticos (Mamma). In: König HE, Liebich H Eds. **Anatomia dos Animais Domésticos Vol. 2 – Órgãos e Sistemas** Porto Alegre: Artmed, p. 335-342.

Coldebella A, Machado PF, Demétrio CGB, Ribeiro Júnior PJ, Meyer PM, Corassin CH, Cassoli LD (2004) Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas confinadas. **Revista Brasileira de Zootecnia** 33:623-634.

Cable CS, Peery K, Fubini SL (2004) Radical mastectomy in 20 ruminants. **Veterinary Surgery** 33:263-266.

Carvalho CF, Cintra TCF, Chammas MC (2015) Elastography: principles and considerations for clinical research in veterinary medicine. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Health** 7:99-110.

Contreras A, Sierra, D, Sánchez A, Corrales JC, Marco JC, Paape MJ, Gonzalo C (2007) Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research** 68:145–153.

Coldebella A, Machado PF, Demétrio CGB, Ribeiro Júnior PJ, Meyer PM, Corassin CH, Cassoli LD (2004). Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas confinadas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 33, 623-634.

Comstock C (2011) Ultrasound Elastography of Breast Lesions. **Ultrasound Clinics** 6:407-415.

Davidson AP, Stabenfeldt GH (2008). Glândula Mamária. In: CUNNIGHAM, J. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan p. 417-431.

Drakonaki EE, Allen GM, Wilson DJ (2012) Ultrasound elastography for musculoskeletal applications. **British Journal of Radiology** 85;1435–1445.

Della Libera AMMP, Souza FN, Blagitz MG, Batista CF (2011) Avaliação de indicadores inflamatórios no diagnóstico da mastite. **Arquivo do Instituto Biológico** 78:297-300.

De Sá JPN, de Figueiredo CHA, de Sousa Neto OL, de Alencar Roberto SB, Gadelha HS, de Alencar MCB (2018) Os principais microrganismos causadores da mastite bovina e suas consequências na cadeia produtiva de leite. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental** 12:01-13.

De Vlieghe S, Fox LK, Piepers S, McDougall S, Barkema HW (2012) Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **Journal of Dairy Science** 95:1025-1040.

Dudea SM, Giurgiu CR, Dumitriu D, Chiorean A, Ciurea A, Coman L (2011) Value of ultrasound elastography in the diagnosis and management of prostate carcinoma. **Medical Ultrasonography** 13:45-53.

Dufour S, Dohoo IR (2013) Monitoring herd incidence of intramammary infection in lactating cows using repeated longitudinal somatic cell count measurements. **Journal of Dairy Science** 96:1568-1580.

Faria, J. E (1995) **Prevenção e controle de infecção estafilocócica da glândula mamária pela vacinação e/ou antibioticoterapia associada ao dimetilsulfóxido (DMSO)**. 101 f. Dissertação (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Feitosa FLF (2008) Semiologia da Glândula Mamária de Éguas, Cadelas e Gatas. In: Feitosa FLF (Ed.). **Semiologia Veterinária: A Arte do Diagnóstico**. São Paulo: Roca p. 321-323.

Flöck M, Winter P (2006). Diagnostic ultrasonography in cattle with disease of the mammary gland. **The Veterinary Journal** 171: 314-321

Fonseca LFL, Santos MV (2000) **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, p.39-141.

Geishauser T, Querengasser K, Querengasser J (2005). Teat Endoscopy (Theloscopy) for Diagnosis and Therapy of Milk Flow Disorders in Dairy Cows. **Veterinary Clinic and Food Animal** 21:205-225.

Goddi A, Bonardi M, Alessi S (2012) Breast elastography: a literature review. **Journal of Ultrasound** 15:192-198.

Gonzalo C, Boixo JC, Carriedo JÁ, Primitivo FS (2004) Evaluation of Rapid Somatic Cell Counters Under Different Analytical Conditions in Ovine Milk. *Journal of Dairy Science*, 87:3623–3628.

Haddad, F (2012) **Mastite bovina: controle e prevenção**, 30 f. Trabalho de conclusão de Curso - Universidade Federal de Lavras - Campus de lavras para obtenção do título de Médico Veterinário.

Halasa T, Huijps K, Osteras O, Hogeveen H (2007) Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. **Veterinary Quarterly** 29:18-31.

Hall TJ, Zhu Y, Spalding CS (2003) In vivo real-time freehand palpation imaging. **Ultrasound in Medicine & Biology** 29:427-435.

Hillerton JE (1996) Controle da mastite bovina. In: WORKSHOP SOBRE PROGRAMA DE CONTROLE INTEGRADO DA MASTITE BOVINA. **Anais...** Juiz de Fora: Embrapa.

Hisira V, Klein R, Kadasi M, Posivak J (2019) Relationship between somatic cell count and occurrence of intramammary pathogens in dairy cows. **Біологія тварин**, 21:25-28.

Hoque MN, Das ZC, Talukder AK, Alam MS, Rahman ANMA (2015) Different screening tests and milk somatic cell count for the prevalence of subclinical bovine mastitis in Bangladesh. **Tropical Animal Health and Production** 47:79-86.

Hurley WL (2010) Lactation biology by University of Illinois, **Urbana-Champaign**, 213.

Hurley WL, Theil PK (2011) Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. **Nutrients** 3:442-474.

Itoh A, Bueno E, Tohno E, Kamma H, Takahashi H, Shiina T, Yamakawa M, Matsumura T (2006) Breast disease: clinical application of US elastography for diagnosis. **Radiology** 239:341-350.

Jaffer O, Lung PFC, Bosanac D, Shah A, Sidhu PS (2012). Is ultrasound elastography of the liver ready to replace biopsy? A critical review of the current techniques. **Ultrasound** 20:24-32.

LABORATORY HANDBOOK ON BOVINE MASTITIS (LHBM). Madison, WI: National Mastitis Council, 1999. p.171-173.

Leonard FC, Hartigan P, Markey P, Quinn PJ, Markey BK, Fanning S, Fitzpatrick ES (2011) **Veterinary Microbiology and Microbial Disease** 928p.

Lerner RM, Huang SR, Parker KJ (1990) “Sonoelasticity” images derived from ultrasound signals in mechanically vibrated tissues. **Ultrasound in Medicine and Biology** 16:231–39.

Lopes TS, Fussieger C, Rizzo FA, Silveira S, Lunge VR, Streck AF (2022) Species identification and antimicrobial susceptibility profile of bacteria associated with cow mastitis in southern Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 42.

Maiochi R, Rodrigues R, Wosiacki S (2019). Principais métodos de detecção de mastites clínicas e subclínicas de bovinos. **Enciclopédia Biosfera** 16:1237–1251.

Magalhães HR, El Faro L, Cardoso VL, Paz CCPD, Cassoli LD, Machado PF (2006). Influência de fatores de ambiente sobre a contagem de células somáticas e sua relação com perdas na produção de leite de vacas da raça Holandesa. **Revista Brasileira de Zootecnia** 35:415-421.

Manogna P, Dev B, Joseph LD, Ramakrishnan R (2020) Idiopathic granulomatous mastitis—our experience. **Egyptian Journal of Radiology and Nuclear Medicine** 51:1- 8.

Massote VP, Zanateli BM, Alves GV, Gonçalves ES, Guedes E (2019). Diagnóstico e controle de mastite bovina: uma revisão de literatura. **Revista Agroveterinária Do Sul de Minas** 1:41–54.

McDougall S, Arthur DG, Bryan MA, Vermunt JJ, Weir AM (2007) Clinical and bacteriological response to treatment of clinical mastitis with one of three intramammary antibiotics. **New Zealand Veterinary Journal** 55:161-1

Muhammad G, Athar M, Shakoar A, Khan MZ, Rehman F, Ahmad MT (1995) Surf Field Mastitis Test: an inexpensive new tool for evaluation of wholesomeness of fresh milk. **Pakistan Journal of Food Science** 5:91–93.

Nunes GR, Blagitz MG, Batista CF, Souza FN, Ricciardi M, Stricagnolo C.R, Sanches BGS, Azedo MR, Sucupira MCA, Della Libera AMMP (2008) Avaliação de indicadores inflamatórios no diagnóstico da mastite ovina. **Arquivo Instituto Biológico** 75:271-278.

O'Brien RT, Waller III KR, Matheson JS (2002). Ultrasonographic appearance of edema caused by injections in the mammary gland attachments of dairy cows. **Journal of American Veterinary Medicine Association** 221: 408–410.

Ophir J, Cespedes I, Ponnekanti H, Yazdi Y, Li X (1991). Elastography: a quantitative method for imaging the elasticity of biological tissues. **Ultrasonic imaging** 13:111-134.

Ophir J, Alam SK, Garra B, Kallel F, Konofagou E, Krouskop T, Varghese T (1999) Elastography: ultrasonic estimation and imaging of the elastic properties of tissues. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine** 213:203-233.

Orlacchio A, Bolacchi F, Antonicoli M, Coco I, Costanzo E, Tosti D, Francioso S, Angelico M, Simonetti G (2012) Liver elasticity in NASH patients evaluated with real-time elastography (RTE). **Ultrasound in medicine & biology** 38:537-544.

Peeler EJ, Green MJ, Fitzpatrick JL, Green IE (2002) Study of clinical mastitis in British dairy herds with bulk milk somatic cell counts less than 150,000 cells/ml. **Veterinary Record** 151:170-176.

Peek SF, Divers TJ (Eds.) (2018) **Diseases of Dairy Cattle**. St Louis: Elsevier, 849p.

Pereira NOA (2021). Nos casos onde a mastite origina uma fibrose, existe a possibilidade do úbere retornar ao seu estado original ou ele com certeza será perdido. Milk Point, 2011. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/empresas/novidades-parceiros/novartis-responde-noscasosonde-a-mastite-origina-uma-fibrose-existe-a-possibilidade-do-ubere-retornarao-seu-estadooriginal-70270n.aspx>.

Philpot WN, Nickerson SC (1991) **Mastitis: counter attack**. Naperville: Babson Bros, 150 p.

Pyörälä S. 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary Research* 34:565-578.

Radostits OT, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD (Eds.) (2007) **Veterinary Medicine: a text book of disease of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. Philadelphia: Saunders Elsevier 9391p.

Reece WO (2008) Lactação. In: **Anatomia Funcional e Fisiologia dos Animais Domésticos**. 3 ed.

Riekerink RO, Barkema HW, Kelton DF, Scholl DT (2008) Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. **Journal of Dairy science** 91:1366-1377.

Royster E, Wagner S (2015) Treatment of mastitis in cattle. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice** 31:17- 46.

Ruegg PL, Erskine RJ, Morin DE (2014) Mammary Gland Health. In: **Large Animal Internal Medicine**, 5th Edn. St Louis, MO: Mosby Elsevier, p. 1015–1043.

Ruegg PL, Reinemann DJ (2002) Milk quality and mastitis tests, **Bovine Practice** 36:41:54.

Ruegg PL (2003) Investigation of mastitis problems on farms. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice** 19:47-73.

Sargeant JM, Leslie KE, Shirley JE, Pulkrabek BJ, Lim GH (2001) Sensitivity and specificity of somatic cell count and California Mastitis Test for identifying intramammary infection in early lactation. **Journal of Dairy Science** 84:2018-2024.

Santos MC (2001) **Curso sobre manejo de ordenha e qualidade do leite**. Vila Velha: UVV, p. 57.

Santos JMA, Pereira ES, Silva AS, Silva AGCVM, Simplício KMMG, Campos AC, Campos RNS, Lima PRB. (2022) Contribuição do sistema de cultivo microbiológico na fazenda (OnFarm®) no uso racional de antimicrobianos para mastite: um relato na bacia leiteira de Nossa Senhora da Glória – Sergipe. **Brazilian Journal of Development** 8:29080-29099.

Schalm OW, Noorlander DO. (1957) Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of American Veterinary Medical Association** 130:199-204

Schmidt GH (Ed.) (1971) Mammary gland development. In: Schmidt GH (Ed.), **Biology of lactation**. WH Freeman & Co, San Francisco, CA.

Schukken YH, Wilson DJ, Welcome F, Garrison-Tikofsky L, Gonzalez RN (2003). Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. **Veterinary Research** 34:579-596.

Silva M, Nogueira LJ, Passos C, Ferreira A, Ambrósio CE (2010) A mastite interferindo no padrão de qualidade do leite: uma preocupação necessária. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária** 3:1-10.

Srinivasan S, Krouskop T, Ophir JA (2004) Quantitative comparison of modulus images obtained using nanoindentation with strain elastograms. **Ultrasound in Medicine & Biology** 30:899-918.

Sripathi S, Ayachit A, Bala A, Kadavigere R, Kumar S (2016) Idiopathic granulomatous mastitis: a diagnostic dilemma for the breast radiologist. **Insights into imaging** 7:523- 529.

Van den Borne BH, Van Schaik G, Lam TJ, Nielen M (2010) Variation in herd level mastitis indicators between primi-and multiparae in Dutch dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine** 96:49-55.

Viguier C, Arora S, Gilmartin N, Welbeck K, Okennedy R (2009) Mastitis detection: current trends and future perspectives. **Trends in Biotechnology** 27:486-493.

Tozetti DS, Bataier MBN, Almeida LRD (2008). Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas–revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária** v. 6:1-7.

Tripathy RK, Rath PK, Mishra BP, Panda SK, Jena B (2018) Clinico-Pathological and Compositional Changes in Milk of Mastitis Cows. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences** 7:1680-1687.

Zafalon, LF, Arcaro JRP, Nader FA, Veschi JLA (2010) Contagem de células somáticas no leite de vacas de diferentes raças em distintas lactações e condições climáticas. **Veterinária e Zootecnia** 17:378-385.