RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese/dissertação será disponibilizado somente a partir de 14/07/2025

At the author's request, the full text of this thesis/dissertation will not be available online until July 14, 2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

DINÂMICA DA PREVALÊNCIA DE PATÓGENOS CAUSADORES DE MASTITE EM PROPRIEDADES LEITEIRAS BRASILEIRAS DE 2012 A 2020 E ASSOCIAÇÃO COM ANO E ESTAÇÃO DO ANO

LUCIANA SEKITO DE FREITAS ZAMBELLI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Zootecnia

BOTUCATU – SP
Setembro de 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

DINÂMICA DA PREVALÊNCIA DE PATÓGENOS CAUSADORES DE MASTITE EM PROPRIEDADES LEITEIRAS BRASILEIRAS DE 2012 A 2020 E ASSOCIAÇÃO COM ANO E ESTAÇÃO DO ANO

LUCIANA SEKITO DE FREITAS ZAMBELLI

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Portela Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia como parte das exigências para obtenção de título de Mestre em Zootecnia

BOTUCATU – SP
Setembro de 2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Zambelli, Luciana Sekito de Freitas.
Dinâmica da prevalência de patógenos causadores de mastite em propriedades leiteiras brasileiras de 2012 a 2020 e associação com ano e estação do ano / Luciana Sekito de Freitas Zambelli. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: José Eduardo Portela Santos
Capes: 50405004

1. Noxas. 2. Mastite. 3. Microorganismos. 4. Prevalência. 5. Leite - Microbiologia.

Palavras-chave: Ambiental; Contagiosa; Mastite; Microorganismos; Prevalência.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Luciana Sekito de Freitas Zambelli nascida em 15 de julho de 1979 no município de São Paulo, estado de São Paulo, filha de Libia Harumi Sekito de Freitas e Jordão de Oliveira Freitas, casada com Carlos Alexandre Zambelli desde 2008 e mãe da Sabrina Sekito Zambelli nascida em 2012 e Rebeca Sekito Zambelli nascida em 2015. Aos 11 anos, mudou-se com a família do Brasil para Lisboa, Portugal onde estudou até 1996. No Brasil, finalizou seus estudos do ensino médio e, em 1998, mudou-se para Botucatu para cursar Medicina Veterinária na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP. De 1998 a 2002, atuou intensamente em diversas atividades acadêmicas, sendo membro da empresa júnior de consultoria agropecuária Conapec Jr. atuando como Diretora Administrativa, participante e monitora de fazenda de gado leiteiro da região de Botucatu. Atuou também como Diretora Administrativa do Diretório Acadêmico da Medicina Veterinária Walter Maurício Corrêa, organizadora da XV Semana de Estudos Agropecuários e Florestais de Botucatu em 2001 do módulo "Empresa leiteira: Aspectos fundamentais de sanidade e produção animal", e participou de plantão clínico voluntário no Hospital Veterinário da FMVZ e campanha de vacinação antirrábica. Em 2000 e 2001, envolveu-se em pesquisa e desenvolvimento no Departamento de Moléstias Infecciosas (MI) da FMVZ desenvolvendo um projeto de Iniciação Científica em imunologia em búfalas sob orientação do Prof. Márcio Garcia Ribeiro. Em 2020, realizou estágio curricular obrigatório na University of Wisconsin (UW), nos EUA, no laboratório de Qualidade do Leite do Departamento de Dairy Sciences em projetos relacionados à qualidade do leite, mastite subclínica e características dos testes de diagnóstico, sob supervisão da Dra. Pamela L. Ruegg. Na sua carreira corporativa em multinacionais, trabalhou na Gerência de Produto e Assuntos Regulatórios na área de saúde e nutrição animal, coordenação e suporte a projetos regionais e globais de inovação para a área de biotecnologia na agricultura aplicada ao controle biológico de nematóides, tornando-se um dos inventores de patentes na área de nematicidas biológicos em diversos países como EUA, Alemanha, Brasil, México e países na Ásia. Em 2021, após anos dedicando-se ao mundo corporativo, à maternidade e à consultoria autônoma de Assuntos Regulatórios, ingressou no Mestrado do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da FMVZ, UNESP, campus de Botucatu para desenvolver pesquisa em agentes causadores de mastite em propriedades leiteiras brasileiras sob orientação do Prof. Dr. José Eduardo Portela Santos da University of Florida (UF). Em 2022, foi visitante escolar no Department of Animal Sciences da UF em Gainesville, FL, EUA

para análise estatística dos dados do projeto, escrita de artigo científico e colaboração nas atividades do laboratório do seu orientador.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos amores da minha vida Carlos, Sabrina e Rebeca e a todos que contribuem intensamente para a produção de leite de qualidade no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que são exemplos de dedicação, persistência e capricho em tudo que se propõem a fazer e por sempre acreditarem em mim; a meu pai pelo encorajamento de retomar a carreira profissional e suas habilidades de planejamento e execução, e a minha mãe, pelo devotamento à família e sua admirável disciplina.

À minha avó materna Setsuko (*in memoriam*) imigrante japonesa exemplo de mulher de garra, coragem e competência. Muito inteligente, fiel aos valores e princípios humanos e que me ensinou sobre a importância de buscar o conhecimento e evolução constantes.

Ao meu marido Carlos, e às minhas filhas, Sabrina e Rebeca, pelo apoio, paciência e superação das dificuldades decorrentes dos períodos da minha ausência para que fosse possível me dedicar ao Mestrado e escrita desta Dissertação.

Às minhas queridas amigas Prof. Lindsay Unno Gimenes, Yoko Endo, Andrea Karasawa Teles e Ana Carolina Oliveira Rodrigues pela amizade, apoio e conselhos.

Ao Laboratório Vidavet pelo financiamento e suporte na realização da pesquisa.

Aos amigos da University of Florida, aos professores do Mestrado, pelos ensinamentos, discussões e suporte.

Ao Professor Zequinha e Carla por terem aberto as portas para um novo caminho na minha vida profissional possibilitando conciliá-la com a maternidade.

Ao Professor José Eduardo Portela Santos, estimado orientador, por ter me aceitado como orientada à distância com todos os desafios inerentes à situação, pela oportunidade de trabalho, aprendizado, e fazer parte do time do seu laboratório na University of Florida, contribuindo com conteúdo e amizade.

Aos Professores Drs. José Carlos de Figueiredo Pantoja, José Luiz Moraes Vasconcelos e Hélio Langoni e à Dra. Carla G. C. Vasconcelos pela honra em tê-los em minha banca examinadora.

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

Muitíssimo obrigada!

“Pode ser difícil superar o vento, o frio e a falta de oxigênio, mas é muito mais difícil superar-se a si mesmo.”

(Waldemar Niclevicz)

RESUMO GERAL

Os objetivos foram determinar o perfil e a prevalência de patógenos contagiosos e ambientais causadores de mastite em amostras de leite de vacas com mastite clínica ou subclínica, ou de programas de monitoramento sanitário do úbere submetidas a um laboratório de diagnóstico comercial ao longo de 9 anos. Este estudo longitudinal observacional analisou o perfil microbiológico de 717.168 resultados microbiológicos de 3.793 fazendas leiteiras de 2012 a 2020. Análises subsequentes foram realizadas em um subconjunto de dados de 204.461 resultados microbiológicos de 12 fazendas que submeteram amostras em todos os 9 anos. Amostras de leite originaram-se de quartos individuais ou amostras compostas. Um resultado de crescimento foi definido quando 3 ou mais colônias de 1 a 3 microrganismos diferentes estavam presentes no meio de cultura, exceto para *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* em que uma colônia foi considerada crescimento. Um resultado contaminado foi definido quando uma ou mais colônias de 4 ou mais microorganismos diferentes estavam presentes no meio de cultura. Nas amostras das 3.793 fazendas, a prevalência de patógenos causadores de mastite contagiosa foi de 28,7% em 2012 e 26,6% em 2020, com o verão tendo a maior prevalência, 27,6%. A prevalência de patógenos ambientais causadores de mastite foi de aproximadamente 26,0% em 2012 e 2020, sendo o outono e a primavera os de maior prevalência, 27,5%. A prevalência de *Staphylococcus aureus* não diferiu entre 2012 e 2020, 10,9% e 10,3%, respectivamente, e a estação do ano esteve associada à prevalência. A prevalência de *Streptococcus agalactiae* diminuiu de 7,19% em 2012 para 3,54% em 2020, e o inverno teve a maior prevalência, 7,73%, em comparação com outono, primavera ou verão. Os patógenos causadores de mastite mais prevalentes foram estafilococos não-aureus (SNA), *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Corynebacterium bovis*, *Klebsiella* spp, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Pseudomonas* spp. As 12 fazendas que submeteram amostras de leite em todos os 9 anos mostraram uma diminuição na prevalência de patógenos causadores de mastite contagiosa de 15,1% em 2012 para 8,02% em 2020. De fato, a prevalência de *S. agalactiae* diminuiu de 5,66% em 2013 para 0,21% em 2020. Similarmente, a prevalência de patógenos ambientais causadores de mastite diminuiu de 38,2% em 2012 para 25,1% em 2020, com o verão apresentando a maior prevalência, 34,5%. No Brasil, foi observada uma pequena redução gradual na prevalência de patógenos contagiosos causadores de mastite, mas não foi observada uma mudança no perfil de patógenos contagiosos para patógenos ambientais nas 3.793 fazendas. Por outro lado, o subconjunto de fazendas comprometidas com a identificação de

patógenos causadores de mastite reduziu a prevalência de *S. agalactiae* e mostrou uma mudança no perfil de patógenos contagiosos em relação aos patógenos causadores de mastite ambientais. Produtores comprometidos com a identificação de patógenos causadores de mastite provavelmente implementarão medidas específicas de controle para reduzir a prevalência de bactérias contagiosas que causam mastite.

Palavras-chave:contagiosa, ambiental, mastite, microrganismos, prevalência

ABSTRACT

Objectives were to determine the profile and prevalence of contagious and environmental mastitis-causing pathogens in milk samples from cows experiencing clinical or subclinical mastitis, or from udder health monitoring programs submitted to a commercial diagnostic laboratory over a period of 9 years. This observational longitudinal study analyzed the microbiological profile from 717,168 milk samples from 3,793 dairy farms from 2012 to 2020. Further analyses were performed in a subset of 204,461 microbiological results of 12 farms that submitted samples in all 9 years. Milk samples originated from individual quarters or composite samples. A growth result was defined when 3 or more colonies from 1 to 3 different pathogens were present in culture media, except for *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* which 1 colony was defined as growth. A contaminated result was defined when 1 or more colonies from 4 or more microorganisms were present in culture media. In samples from the 3,793 farms, the prevalence of contagious mastitis-causing pathogens was 28.7% in 2012 and 26.6% in 2020, with summer having the greatest prevalence, 27.6%. The prevalence of environmental mastitis-causing pathogens was approximately 26.0% in 2012 and 2020, and fall and spring seasons had the greatest prevalence, 27.5%. The prevalence of *S. aureus* did not differ between 2012 and 2020, 10.9% and 10.3%, respectively, but season was associated with the prevalence. The prevalence of *S. agalactiae* decreased from 7.19% in 2012 to 3.54% in 2020, and winter had the greatest prevalence, 7.73%, compared with fall, spring, or summer. The most prevalent mastitis-causing pathogens were non-*aureus* staphylococci (NAS), *Staphylococcus chromogenes*, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, *Klebsiella* spp, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae*, and *Pseudomonas* spp. The 12 farms that submitted milk samples in all 9 years had a reduction in the prevalence of contagious mastitis-causing pathogens from 15.1% in 2012 to 8.02% in 2020. Indeed, the prevalence of *S. agalactiae* decreased from 5.66% in 2013 to 0.21% in 2020. Similarly, the prevalence of environmental mastitis-causing pathogens in milk samples decreased from 38.2% in 2012 to 25.1% in 2020, with summer presenting the greatest prevalence, 34.5%. A small gradual reduction in the prevalence of contagious mastitis-causing pathogens was observed in dairy farms in Brazil, but a change in the profile from contagious to environmental pathogens was not detected in the 3,793 farms. Conversely, the subset of farms committed to the identification of mastitis-causing pathogens had a reduction in the prevalence of *S. agalactiae* and experienced a change in the profile towards environmental mastitis-causing pathogens.

Producers committed to the identification of mastitis-causing pathogens are likely to implement specific control measures to reduce the prevalence of contagious bacteria that cause mastitis.
Key words: contagious, environmental, mastitis, microorganisms, prevalence

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2

Figure 1. Diagram of flow of data retrieved and used for analyses. Milk samples from cows experiencing mastitis or udder health monitoring in Brazilian dairy farms were submitted to a diagnostic laboratory from 2012 to 2020…… 73

Figure 2. Proportion of the 18,583 milk samples identified according to the type of mastitis from the 3,793 farms according to the year of submission (A). Proportion of 11,005 milk samples identified according to the type of mastitis from the subset of 12 farms according to the year of submission (B)…… 74

Figure 3. Prevalence of no growth, contaminated, and growth results in milk from the 3,793 farms according to the year of submission (A), and the prevalence of no growth (B), contaminated (C), and growth (D) according to season of submission. Panel A, effect of year ($P < 0.001$). Panel B, effect of season ($P < 0.001$). Panel C, effect of season ($P < 0.001$). Panel D, effect of season ($P = 0.10$). Error bars represent the standard error mean. [a,b,c] Within the panel, distinct superscripts denote difference after adjustment by the method of Tukey ($P \leq 0.05$)…… 75

Figure 4. Prevalence of contagious pathogens (*Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Corynebacterium bovis*) according to year (A) and season of submission (B), and prevalence of environmental pathogens (coliforms, environmental streptococci, environmental staphylococci, enterococci, lactococci and *Pseudomonas* spp) according to year (C) or season of submission (D) in milk samples from the 3,793 farms. Panel A, effect of year ($P < 0.001$). Panel B, effect of season ($P = 0.002$). Panel C, effect of year ($P < 0.001$). Panel D, effect of season ($P < 0.001$). Error bars represent the standard error of the mean. [a,b,c] Within a panel, distinct superscripts denote difference after adjustment by the method of Tukey ($P \leq 0.05$)…….... 76

Figure 5. Prevalence of the specified contagious pathogens (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae,* and *Corynebacterium bovis*) in milk samples from the 3,793 farms according to year of submission (A), or prevalence of *Staphylococcus aureus* (B), *Streptococcus agalactiae* (C), or *Corynebacterium bovis* (D) according to season of submission. Panel A, effect of year ($P < 0.001$). Panel B, effect of season ($P < 0.001$). Panel C, effect of season ($P < 0.001$). Panel D, effect of season ($P < 0.001$). Error bars represent the standard error of the mean. [a,b,c] Within a panel, distinct superscripts denote difference after adjustment by the method of Tukey ($P \leq 0.05$)…… 77

Figure 6. Prevalence of no growth, contaminated, and growth results in milk samples from the 12 farms according to the year of submission (A), and the prevalence of no growth (B), contaminated (C), and growth (D) according to season of submission. Panel A, effect of year ($P < 0.001$). Panel B, effect of season ($P < 0.001$). Panel C, effect of season ($P < 0.001$). Panel D effect of season ($P < 0.001$). Error bars represent the standard error of the mean. [a,b,c] Within a panel, distinct superscripts denote difference after adjustment by the method of Tukey ($P \leq 0.05$)..... 78

Figure 7. Prevalence of contagious pathogens (*Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Corynebacterium bovis*) in milk samples submitted by the 12 farms according to year (A) and season of submission (B), or prevalence of environmental pathogens (coliforms, environmental streptococci, environmental staphylococci, enterococci, lactococci, and *Pseudomonas spp*) according to year (C) or season (D) of submission. Panel A, effect of year ($P < 0.001$). Panel B, effect of season ($P < 0.001$). Panel C, effect of year ($P < 0.001$). Panel D, effect of season ($P < 0.001$). Error bars represent the standard error of the mean. [a,b,c] Within a panel, distinct superscripts denote difference after adjustment by the method of Tukey ($P \leq 0.05$)..... 79

Figure 8. Prevalence of specified contagious pathogens *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium bovis*, and *Streptococcus agalactiae* in milk samples from the 12 farms according to year (A) of submission, or prevalence of *Staphylococcus aureus* (B), *Streptococcus agalactiae* (C) or of *Corynebacterium bovis* (D) according to the season of submission. Panel A, effect of year for *S. aureus* ($P < 0.001$), *C. bovis* ($P < 0.001$) and *S. agalactiae* ($P < 0.001$). Panel B, effect of season ($P = 0.22$). Panel C, effect of season (P < 0.001). Panel D, effect of season ($P < 0.001$). Error bars represent the standard error of the mean. [a,b,c] Within a panel, distinct superscripts denote difference after adjustment by the method of Tukey ($P \leq 0.05$)..... 80

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Table 1. Proportion of the 3,793 farms with at least one positive microbiological result of the most prevalent microorganisms during the period of 2012 to July 2016, and from August 2016 to 2020……. 62

Tabela 2. The most prevalent microorganisms isolated from milk samples submitted by 3,793 dairy farms in Brazil and by the 12 farms that submitted samples all 9 years, and the distribution of samples according to type of mastitis……. 63

Table 3. Association between the type of mastitis and the pathogen isolated from milk samples submitted by 3,793 dairy farms in Brazil and by the 12 farms that submitted samples all 9 years (LSM ± SEM)[1]…… 65

Table 4. Results of microbiological culture of milk samples according to the year of submission from 3,793 dairy farms in Brazil (LSM ± SEM)[1]……. 67

Table 5. Results of microbiological culture of milk samples according to the year of submission from the 12 selected farms that submitted samples all 9 years (LSM ± SEM)[1]…. 70

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOR	"Adjusted odds ratio"
BTM	"Bulk tank milk"
cel	Célula
CMT	"California Mastitis Test"
CAMP	Christie, Atkins, Munch-Petersen
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCS	Contagem de células somáticas
CI	"Confidence interval"
CM	"Clinical mastitis"
d	Dia
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
EUA	Estados Unidos da América
FL	Flórida
IA	Inseminação artificial
kg	Quilograma
l	"Liter"
L	Litro
LSM	"Least-squares means"
MC	Mastite clínica
MI	Moléstias infecciosas
ml	"Milliliter"
mL	Mililitro
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MSC	Mastite subclínica
NAHMS	National Animal Health Monitoring System
NAS	"Non-aureus staphylococci"
NMC	National Mastitis Council
OR	"Odds ratio"
SCC	"Somatic cell count"
SCM	"Subclinical mastitis"

SEM	“Standard errors of the means”
SNA	Staphylococci não-aureus
STROBE	“The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology”
UF	University of Florida
UNESP	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
UW	University of Wisconsin

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 11
Considerações iniciais 12
1 Revisão de Literatura 13
1.1 Definição e importância econômica da mastite 13
1.2 Mastite e eficiência reprodutiva 14
1.3 Mastite clínica e subclínica 15
1.4 Mastite contagiosa 17
1.4.1 *Staphylococcus aureus* 17
1.4.2 *Streptococcus agalactiae* 18
1.4.3 *Corynebacterium bovis* 19
1.5 Mastite ambiental 20
1.6 Staphylococci não-aureus 21
1.7 Método laboratorial para diagnóstico de mastite 22
Referências 24
CAPÍTULO 2 32
Dynamics of the prevalence of mastitis-causing pathogens in Brazilian dairy farms from 2012 and 2020 and association with year and season 32
INTERPRETATIVE SUMMARY 33
ABSTRACT 34
INTRODUCTION 35
MATERIALS AND METHODS 36
Study Design 37
Milk Samples 37
Microbiological Culture 37
Definitions of Microbiological Results 38
Seasons of the Year 39
Preparation of the Database 39
Exclusion Criteria 40
Responses Analyzed 40
Statistical Analyses 40
RESULTS 41
Data from all 3,793 Farms 41
Completeness of the database 41
Descriptive analysis of the microbiological results 42
Results according to the type of mastitis 42

The most prevalent pathogens in milk samples 43
Microbiological prevalence and associations with year and season 43
Subset of 12 Farms 44
Completeness of the database 44
Descriptive analysis of the microbiological results 45
Results according to the type of mastitis 45
Microbiological prevalence and association with year and season 45
DISCUSSION 46
Data From the 3,793 Farms 47
Data From the 12 Farms 52
Limitations and Potential Biases 53
CONCLUSIONS 54
AUTHORS' CONTRIBUTIONS 55
CONFLICTS OF INTEREST 55
ACKNOWLEDGMENTS 55
REFERENCES 56
IMPLICAÇÕES 81

CAPÍTULO 1

Considerações iniciais

A mastite continua sendo uma das principais doenças em rebanhos leiteiros (NAHMS, 2021) associada a impactos negativos na produção de leite, reprodução e sobrevivência de vacas leiteiras (SCHRICK *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2004), gerando grande perda econômica para a indústria de laticínio, incluindo custos de tratamento e descarte de leite e vacas, aumento na mão-de-obra e diminuição da qualidade e composição do leite (BLOSSER, 1979; DOHOO e MEEK, 1982; DEGRAVES e FETROW, 1993). A perda econômica associada à mastite foi estimada, nos Estados Unidos da América (EUA), em 2 bilhões de dólares anuais (DEGRAVES e FETROW, 1993), e na Austrália, em 110 milhões de dólares por ano e em torno de 260 dólares por caso de mastite (DYSON *et al*., 2022).

A mastite tem diversidade etiológica, frequentemente, associada a patógenos (WATTS, 1988) dos quais alguns são altamente prevalentes com características microbiológicas específicas (SMITH *et al.*, 1985; FOX e GAY, 1993). Conhecer o agente causador da mastite permite a implementação de medidas de controle específicas relacionadas à sua terapia e prevenção (RUEGG, 2003 e DOHOO *et al*., 2011).

A mastite permanecerá relevante em futuras pesquisas mesmo com os avanços, desenvolvimento e implantação de programas de controle do último século, devido às mudanças na estrutura dos rebanhos e exigências de rigorosos padrões de qualidade e processos (RUEGG, 2017).

Países ou rebanhos no mundo que, consistentemente, adotaram estratégias de prevenção e terapia específica controlaram ou erradicaram os patógenos contagiosos causadores de mastite como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium bovis* dos rebanhos leiteiros, como observado nos EUA, em alguns países da Europa, Nova Zelândia e Austrália (MAKOVEC and RUEGG, 2003; KOIVULA *et al*., 2007; PIEPERS *et al*., 2007; DYSON *et al*., 2022). Rebanhos que dão ênfase a programas de controle de mastite costumam observar uma mudança na prevalência de agentes bacterianos da doença, com redução na proporção do isolamento de patógenos contagiosos e aumento na proporção de patógenos ambientais (DEGRAVES and FETROW, 1993; RUEGG, 2017).

No Brasil, estudos regionais estimaram a prevalência de *S. aureus* variando de 4,0% a 19,2%, *S. agalactiae* de 7,0% a 16,9% e *Corynebacteria* de 9,0% a 55,2% (BRITO *et al*., 1999; LANGONI *et al*., 2011; BARBOSA *et al*., 2017; TOMAZI *et al*., 2018, DALANEZI *et al*., 2019). Um estudo observacional com 517 rebanhos leiteiros que submeteram amostras de leite para contagem de células somáticas (CCS) entre os anos de 2011 e 2015, com 8.285 dias-teste das 5 regiões do Brasil, relatou uma prevalência de mastite subclínica, ou seja, amostras de leite com ≥ 200.000 células/mL, de 51,2% em 2015 (BUSANELLO *et al*., 2017). Sabe-se que

rebanhos com CCS de tanque de leite de média a alta, ou seja, entre 151.000 e 400.000 células/mL apresentam maior proporção de mastite subclínica causada por patógenos contagiosos do que rebanhos com menos de 150.000 células/mL (BARKEMA *et al*., 1998). Esses resultados sugerem que a mastite contagiosa não está erradicada ou controlada em rebanhos leiteiros de determinadas regiões do país.

Estudos epidemiológicos observacionais permitem uma avaliação inicial qualificável para diagnosticar a situação e implementar programas de controle e prevenção de patógenos causadores de mastite. Embora, a habilidade de realizar inferências gerais causais sobre uma população seja limitante, principalmente quando os estudos divergem nos resultados (RUEGG, 2017; DOLECHECK *et al*., 2019).

O presente estudo longitudinal abrange diversas áreas de produção de leite no Brasil, incluindo amostras das 5 regiões geográficas do país durante as 4 estações do ano, proporcionando assim a oportunidade de caracterizar a etiologia bacteriana da mastite bovina em rebanhos leiteiros brasileiros que representa o situação do rebanho leiteiro no país no período estudado.

A hipótese deste estudo é que a prevalência de patógenos de mastite contagiosa e ambiental em rebanhos leiteiros brasileiros permanece relevante e que a mudança do perfil de mastite contagiosa para ambiental ainda não ocorreu como observada em alguns países. Este estudo longitudinal teve como objetivo determinar, durante um período de 9 anos, a dinâmica da prevalência e o perfil de patógenos causadores de mastite isolados de amostras de leite de vacas com mastite ou de programas de monitoramento da saúde do úbere submetidos a um laboratório de diagnóstico comercial e sua associação com ano e estação de ano.

1 Revisão de Literatura

1.1 Definição e importância econômica da mastite

A mastite é definida como a inflamação do tecido da glândula mamária, geralmente causada por infecção por microrganismos presentes no ambiente em que a vaca vive ou na glândula mamária de animais infectados, tais como bactérias, fungos, leveduras e algas. De 137 microrganismos isolados da glândula mamária, no mínimo 84 podem causar mastite em vacas leiteiras (WATTS, 1988). Estes patógenos invadem, primariamente, a glândula mamária pelo canal do teto, se reproduzem e estimulam uma resposta inflamatória (SCHRICK *et al.*, 2001).

Devido à sua diversidade etiológica e alta prevalência nos rebanhos leiteiros, a mastite tem sido considerada uma das doenças mais relevantes na produção de leite associada a impactos

REFERENCES

Aghamohammadi, M., D. Haine, D. F. Kelton, H. W. Barkema, H. Hogeveen, G. P. Keefe, and S. Dufour. 2018. Herd-level mastitis associated costs on Canadian dairy farms. Front. Vet. Sci. 5:1-12. https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00100.

Barbosa, L. F. S. P., W. V. C. Oliveira, M. H. C. Pereira, M. B. Moreira, C. G. C. Vasconcelos, B. F. Silper, R. L. A. Cerri, and J. L. M. Vasconcelos. 2017. Somatic cell count and type of intramammary infection impacts fertility from *in vitro* produced embryo transfer. Theriogenology 108:291-296. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.12.025.

Bi, Y., Y. J. Wang, Y. Qin, R. G. Valldervú, J. M. García, W. Sun, S. Li, and Z. Cao. 2016. Prevalence of Bovine Mastitis Pathogens in Bulk Tank Milk in China. PLoS ONE 11:1-13. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155621.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brazil. 2013. Módulo 6: Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica. Accessed Dec. 30, 2022. https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/modulo-6-deteccao-e-identificacao-de-bacterias-de-importancia-medica/view.

Brito, M. A. V. P., J. R. F. Brito, M. T. Ribeiro, and V. M. O. Veiga. 1999. Dairy herds pattern of intramammary infection: evaluation of all mammary quarters of lactating cows. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 51:129-135. https://doi.org/10.1590/S010209351999000200001.

Chakkera, H. A., J. D. Schold, and B. Kaplan. 2016. P Value: significance is not all black and white. Transplantation 100:1607-1609. https://doi.org/10.1097/tp.0000000000001331.

Churakov, M., J. Katholm, S. Rogers, R. R. Kao, and R. N. Zadoks. 2021. Assessing potential routes of *Streptococcus agalactiae* transmission between dairy herds using national surveillance, animal movement data and molecular typing. Prev. Vet. Med. 197:105501-105511. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105501.

Condas, L. A. Z., J. De Buck, D. B. Nobrega, D. A. Carson, J. Roy, G. P. Keefe, T. J. DeVries, J. R. Middleton, S. Dufour, and H. W. Barkema. 2017. Distribution of non-*aureus* staphylococci species in udder quarters with low and high somatic cell count, and clinical mastitis. J. Dairy Sci. 100:1-15. https://doi.org/10.3168/jds.2016-12479.

Côte-Gravel, J., and F. Malouin. 2019. Symposium review: Features of *Staphylococcus aureus* mastitis pathogenesis that guide vaccine development strategies. J. Dairy Sci. 102:4727-4740. https://doi.org.10.3168/jds.2018-15272.

Crestani, C., T. L. Forde, S. J. Lycett, M. A. Holmes, C. Fasth, K. Persson-Waller, and R. N. Zudoks. 2021. The fall and rise of group b *Streptococcus* in dairy cattle: reintroduction due to human-to-cattle host jumps. Microb. Genom. 7:648-658. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000648.

Dalanezi, F. M., S. F. Joaquim, F. F. Guimarães, S. T. Guerra, B. C. Lopes, E. M. S. Schmidt, R. L. A. Cerri, and H. Langoni. 2020. Influence of pathogens causing clinical mastitis on reproductive variables of dairy cows. J. Dairy Sci. 103:3648-3655. https://doi.org/10.3168/jds.2019-16841.

De Buck, J., V. Ha, S. Naushad, D. B. Nobrega, C. Luby, J. R. Middleton, S. De Vliegher, and H. W. Barkema. 2021. Non-aureus staphylococci and bovine udder health: current understanding and knowledge gaps. Front. Vet. Sci. 8:1-16. https://doi.org/10.3389/fvets.2021.658031.

De Visscher, A., S. Piepers, F. Haesebrouck, and S. De Vliegher. 2016. Intramammary infection with coagulase-negative staphylococci at parturition: Species-specific prevalence, risk factors, and effect on udder health. J. Dairy Sci. 99:6457-6469. http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10458.

DeGraves, F. J., and J. Fetrow. 1993. Economics of mastitis and mastitis control. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 9:421–434. https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30611-3.

Dinsmore, R. P., P. B. English, R. N. Gonzalez, P. M. Sears, and H. F. Schulte. 1991. Evaluation of methods for the diagnosis of Streptococcus agalactiae intramammary infections in Dairy Cattle. J. Dairy Sci. 74:1521-1526. https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(91)78312-4.

Dohoo, I. R., J. Smith, S. Andersen, D. F. Kelton, S. Godden, and Mastitis Research Workers' Conference. 2011. Diagnosing intramammary infections: evaluation of definitions based on a single milk sample. J. Dairy Sci. 94:250-261. https://doi.org/10.3168/jds.2010-3559.

Dyson, R., N. Charman, A. Hodge, S. M. Rowe, and L. F. Taylor. 2022. A survey of mastitis pathogens including antimicrobial susceptibility in southeastern Australian dairy herds. J. Dairy Sci. 105:1504-1518. https://doi.org/10.3168/jds.2021-20955.

Ferguson, J. D., G. Azzaro, M. Gambina, and G. Licitra. 2007. Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. J. Dairy Sci. 90:5798-5813. https://doi.org/10.3168/jds.2006-903.

Foret, C. J., C. Corbellini, S. Young, and P. Janowicz. 2005. Efficacy of two iodine teat dips based on reduction of naturally occurring new intramammary infections. J. Dairy Sci. 88:426-432. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72704-1.

Fox, L. K., and J. M. Gay. 1993. Contagious mastitis. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 9:475-487. https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30615-0.

Gao J., H. W. Barkema, L. Zhang, G. Liu, Z. Deng, L. Cai, R. Shan, S. Zhang, J. Zou, J. P. Kastelic, and B. Han. 2017. Incidence of clinical mastitis and distribution of pathogens on large Chinese dairy farms. J. Dairy Sci. 100:4797-4806. https://doi.org/10.3168/jds.2016-12334.

Garrity, G. M., and J. G. Holt. 2001a. The road map to the manual. Pages 119-166 in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. D. R. Boone, R. W. Castenholz, ed. Springer Verlag, New York, USA.

Gonçalves, J. L., T. Tomazi, J. R. Barreiro, D. C. Beuron, M. A. Arcari, S. H. Lee, C. M. M. R. Martins, J. P. A. Júnior, and M. V. Santos. 2016. Effects of bovine subclinical mastitis caused by *Corynebacterium* spp on somatic cell count, milk yield and composition by comparing contralateral quarters. Vet. J. 209:87-92. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.08.009.

Hertl, J. A., Y. H. Schukken, F. L. Welcome, L. W. Tauer, and Y. T. Gröhn. 2014. Pathogen-specific effects on milk yield in repeated clinical mastitis episodes in Holstein dairy cows. J. Dairy Sci. 97:1465-1480. https://doi.org/10.3168/jds.2013-7266.

Hogan, J. S., R. N. González, R. J. Harmon, S. C. Nickerson, S. P. Oliver, J. W. Pankey, and K. L. Smith. 2005. *Streptococci* and related genera in Laboratory handbook on bovine mastitis. 3rd edition. ed. National Mastitis Council, Inc., New Prague, MN, USA.

Hogan, J. S., R. N. González, R. J. Harmon, S. C. Nickerson, S. P. Oliver, J. W. Pankey, and K. L. Smith. 2005. *Staphylococci* in Laboratory handbook on bovine mastitis. 3rd edition. ed. National Mastitis Council, Inc., New Prague, MN, USA.

Hogan, J. S., R. N. González, R. J. Harmon, S. C. Nickerson, S. P. Oliver, J. W. Pankey, and K. L. Smith. 2005. Gram-negative bacteria in Laboratory handbook on bovine mastitis. 3rd edition. ed. National Mastitis Council, Inc., New Prague, MN, USA.

Hogan, J. S., R. N. González, R. J. Harmon, S. C. Nickerson, S. P. Oliver, J. W. Pankey, and K. L. Smith. 2005. Miscellaneous organisms in Laboratory handbook on bovine mastitis. 3rd edition. ed. National Mastitis Council, Inc., New Prague, MN, USA.

Holt, J. G, N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams. 1994. Gram-negative aerobic/microaerophilic rods and cocci in Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology. 9th edition. William R. Hensyl, ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, USA.

Holt, J. G, Krieg N. R., P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams. 1994. Facultatively anaerobic gram-negative rods in Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology. 9th edition. William R. Hensyl, ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, USA.

Jenkins, S. N., E. Okello, P. V. Rossitto, T. W. Lehenbauer, J. Champagne, M. C. T. Penedo, A. G. Arruda, S. Godden, P. Rapnicki, P. J. Gorden, L. L. Timms, and S. S. Aly. 2019. Molecular epidemiology of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated at different lactation stages from dairy cattle in the United States. PeerJ. 6749:1-25. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31119068/.

Jørgensen, H. J., A. B. Nordstoga, S. Svilland, R. N. Zadoks, L. Sølverød, B. Kvitle, and T. Mørk. 2016. *Streptococcus agalactiae* in the environment of bovine dairy herds - rewriting the textbooks? Vet. Microbiol. 184:64-72. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.12.014.

Koivula, M., A. Pitkälä, S. Pyörälä, and E. A. Mäntysaari. 2007. Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new database for mastitis pathogens in Finland. Acta Agric. Scand. Sec. A. Anim Sci. 57:89-96. https://doi.org/10.1080/09064700701488941.

Langoni, H., D. S. Penachio, J. C. C. Citadella, F. Laurino, P. Y. Faccioli-Martins, S. B. Lucheis, B. D. Menozzi, and A. V. Silva. 2011. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. Pesq. Vet. Bras. 31:1059-1065. https://doi.org/10.1590/S010073 6X2011001200004.

Makovec, J. A., and P. L. Ruegg. 2003. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. J. Dairy Sci. 86:3466-3472. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73951-4.

NAHMS. 2021. Dairy 2014. Trends in Dairy Cattle Health and Management Practices in the United States, 1991-2014. Accessed Nov. 25, 2022. https://www.aphis.usda.gov/animalhealth/nahms/dairy/downloads/dairy-trends-hlth-ngmnt-1991-2014.pdf.

Oliveira, L., C. Hulland, and Ruegg, P. L. 2013. Characterization of clinical mastitis occurring in cows on 50 large dairy herds in Wisconsin. J. Dairy Sci. 96:7538-7549. https://doi.org/10.3168/jds.2012-6078.

Østerås, O., L. Sølverød, and O. Reksen. 2006. Milk culture results in a large Norwegian survey-effects of season, parity, days in milk, resistance, and clustering. J. Dairy Sci. 89:1010-1023. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72167-1.

Piepers, S., L. De Meulemeester, A. de Kruif, G. Opsomer, H. W. Barkema, and S. De Vliegher. 2007. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. J. Dairy Res. 74:478-483. https://doi.org/10.1017/S0022 029907002841.

Piessens, V., E. V. Coillie, B. Verbist, K. Supré, G. Braem, A. V. Nuffel, L. De Vuyst, M. Heyndrickx, and S. De Vliegher. 2011. Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. J. Dairy Sci. 94:2933-2944. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21605763/.

Pitkälä, A., M. Haveri, S. Pyörälä, V. Myllys, and T. Honkanen-Buzalski. 2004. Bovine mastitis in Finland 2001 - prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. J. Dairy Sci. 87:2433–2441. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73366-4.

Reyher, K. K., and I. R. Dohoo. 2011. Diagnosing intramammary infections: evaluation of composite milk samples to detect intramammary infections. J. Dairy Sci. 94:3387-3396. https://doi.org/103168/jds.2010-3907.

Rossitto P. V., L. Ruiz, Y. Kikuchi, K. Glenn, K. Luiz, J. L. Watts, and J. S. Cullor. 2002. Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococci isolated from bovine mastitis in central California dairies. J. Dairy Sci. 85:132-138. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74061-7.

Ruegg, P. L. 2017. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. J. Dairy Sci. 100:10381–10397. https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023.

Santos, J. E. P., R. L. A. Cerri, M. A. Ballou, G. E. Higginbotham, and J. H. Kirk. 2004. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. Anim. Reprod. Sci. 80:31-45. https://doi.org/10.1016/s0378-4320(03)00133-7.

Sargeant, J. M., and A. M. O'Connor. 2014. Issues of reporting in observational studies in veterinary medicine. Prev. Vet. Med. 113:323-330. https://doi.org/10.106/j.prevetmed.2013.09.004.

Schrick, F. N., M. E. Hockett, A. M. Saxton, M. J. Lewis, H. H. Dowlen, and S. P. Oliver. 2001. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. J. Dairy Sci. 84:1407-1412. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70172-5.

Schukken, Y. H., F. J. Grommers, J. A. Smit, D. Vandegeer, and A. Brand. 1989. Effect of freezing on bacteriological culturing of mastitis milk samples. J. Dairy Sci. 72:1900-1906. https:// doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(89)79309-7.

Schukken, Y. H., R. N. González, L. L. Tikofsky, H. F. Schulte, C. G. Santisteban, F. L. Welcome, G. J. Bennett, M. J. Zurakowski, and R. N. Zadocks. 2009. CNS mastitis: Nothing to worry about? Vet. Microb. 134:9-14. http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic. 2008.09.014.

Smith, K. L., D. A. Todhunter, and P. S. Schoenberger. 1985. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. J. Dairy Sci. 68:1531-1553. https://doi.org/10.3168/jds.S00220302(85)80993-0.

Tenhagen, B. A., G. Köster, J. Wallmann, and W. Heuwieser. 2006. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. J. Dairy Sci. 89:2542-2551. https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(06)72330-x.

Tomazi, T., G. C. Ferreira, A. M. Orsi, J. L. Gonçalves, P. A. Ospina, D. V. Nydam, P. Moroni, and M. V. dos Santos. 2018. Association of herd-level risk factors and incidence rate of clinical mastitis in 20 Brazilian dairy herds. Prev. Vet. Med. 161:9-18. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.10.007.

Watts, J. L. 1988. Etiological agents of bovine mastitis. Vet. Microbiol. 16:41-66. https://doi.org/10.1016/0378-1135(88)90126-5.

Zadocks, R. N., B. E. Gillespie, H. W. Barkema, O. C. Sampimon, S. P. Oliver, and Y. H. Schukken. 2003. Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. Epidemiol. Infect. 130:335-349. https://doi.org/10.1017/s0950268802008221.