

Cristiane Viana Guimarães Ladeira

**PERFIL GENOTÍPICO DE *Staphylococcus aureus* E VARIÁVEIS
ZOOTÉCNICAS E CLIMÁTICAS ASSOCIADAS À MASTITE EM VACAS
MESTIÇAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal da Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito parcial para obtenção do título de
Doutor em Ciência Animal

Área de concentração: Medicina Veterinária
Preventiva

Orientadora: Mônica Maria Oliveira Pinho
Cerqueira

Coorientadores: Alessandro de Sá Guimarães
Mônica de Oliveira Leite

Belo Horizonte
2017

L154p Ladeira, Cristiane Viana Guimarães, 1980-
Perfil genotípico de *Staphylococcus aureus* e variáveis zootécnicas e climáticas associadas à mastite em vacas mestiças / Cristiane Viana Guimarães Ladeira. – 2017. 63 p. : il.

Orientador: Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira
Co-orientadores: Alessandro de Sá Guimarães, Mônica de Oliveira Leite
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Vaca – Doenças – Teses. 2. Mastite – Controle – Teses. 3. Estafilococos áureos – Teses. I. Cerqueira, Mônica Maria Oliveira Pinho. II. Guimarães, Alessandro de Sá. III. Leite, Mônica de Oliveira. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 636.089 692

FOLHA DE APROVAÇÃO

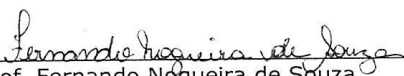
CRISTIANE VIANA GUIMARÃES LADEIRA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTORA em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA.


Aprovada em 24 de Fevereiro de 2017, pela banca constituída pelos membros:



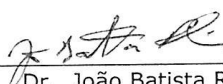
Profª. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira
Presidente - Orientador



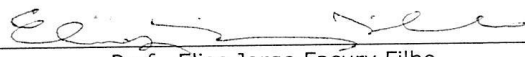
Prof. Fernando Nogueira de Souza
Universidade de São Paulo - USP



Profª. Claudia Freire de Andrade Moraes Penna
Escola de Veterinária - UFMG



Dr. João Batista Ribeiro
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA



Prof. Elias Jorge Facury Filho
Escola de Veterinária - UFMG

AGRADECIMENTOS

Durante o doutorado adquiri conhecimentos e experiências que levarei por toda a minha vida e muitas pessoas contribuíram para essa conquista.

Agradeço a Deus por trilhar meus caminhos e ajudar em minhas escolhas.

Aos meus pais e a minha irmã. Obrigada pelo apoio e incentivo constante para que eu pudesse alcançar os objetivos.

Ao Gu pelo amor, companheirismo, compreensão e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

Ao Guilherme, meu querido filho, obrigada pela compreensão, amor e alegria contagiante de todos os dias.

A toda minha família e a família do Gu pelo incentivo, apoio e carinho.

À Dina por ter me dado a paz necessária para que eu pudesse cursar o doutorado.

À Professora Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira por ser uma orientadora excepcional, um exemplo profissional e de pessoa. Obrigada pela oportunidade, confiança, apoio e ensinamentos.

Aos meus coorientadores Dr. Alessandro de Sá Guimarães e Profa. Mônica de Oliveira Leite muito obrigada pelos ensinamentos e por toda a troca de experiência profissional.

Ao Fernando Nogueira Souza, meu amigo e grande pesquisador, que esteve presente em todos os momentos sempre me ajudando apesar da distância. Não tenho palavras para te agradecer. Muito obrigada!!!

Aos pesquisadores Dra. Maria Aparecida Vasconcelos Paiva e Dr. João Batista Ribeiro, EMBRAPA - Gado de Leite, gratidão pela execução das análises laboratoriais e pelos ensinamentos.

À Denise de Freitas Ribeiro pela amizade construída e por estar sempre disposta a me ajudar.

À Renata De Paoli pela amizade e por todo o auxílio mesmo quando estávamos separadas pelo oceano.

À Leticia Caldas Mendonça por tudo que me ajudou durante o doutorado, pela companhia e hospedagem nas minhas idas a Juiz de Fora.

Ao Renison Teles Vargas pela amizade e ajuda em todos os momentos.

À Gabryella Russi, gratidão pelo auxílio na execução das análises de PFGE.

À Profa Claudia Freire de Andrade Morais Penna, Prof. Elias Jorge Facury Filho, Dr. João Batista Ribeiro, Dr. Fernando Nogueira de Souza, Dr. Adriano França da Cunha e Prof. Leorges Moraes da Fonseca pela participação na banca examinadora e grande contribuição para a melhoria deste trabalho.

À EPAMIG pelo constante apoio, especialmente as EPAMIGAS, aos amigos do Departamento de Pesquisa, ao pesquisador Dr. Daniel Sobreira Rodrigues e aos funcionários do Campo Experimental Santa Rita.

Aos funcionários e professores do Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da UFMG (LabUFMG), do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal (DTIPOA) e do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da EV-UFMG.

A todos os amigos do Laboratório do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal (DTIPOA) que me acompanharam nessa trajetória e que me ajudaram na execução do trabalho.

À Dra. Soraia Diniz e ao Prof. Marcos Xavier pela troca de experiência e apoio na realização das análises estatísticas.

Ao Prof. Marcos Bryan e à Luisa Moreno pela execução da análise dos géis no programa Bionumerics.

À FAPEMIG pela concessão da bolsa e pelo financiamento do projeto (CVZ APQ 03680/10).

Agradeço a todos que, de alguma forma, direta ou indiretamente, participaram desta história de crescimento pessoal e profissional.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	11
OBJETIVOS.....	12
CAPÍTULO 1. ASSOCIAÇÃO ENTRE DADOS CLIMÁTICOS E ZOOTÉCNICOS COM A PRESENÇA DE NOVAS INFECÇÕES INTRAMAMÁRIAS EM VACAS MESTIÇAS.....	13
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1 Descrição dos sistemas de produção.....	16
2.2 Coleta de amostras.....	17
2.3 Determinação da composição e CCS do leite.....	17
2.4 Análise microbiológica.....	17
2.5 Dados meteorológicos	18
2.6 Dados zootécnicos.....	18
2.7 Análise estatística.....	18
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
3.1 FATORES DE RISCO.....	21
3.1.1 COMUNS AOS SISTEMAS DE PRODUÇÃO A - SPA e B – SPB.....	21
3.1.2 FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO SPA – ½ HZ.....	22
3.2 FATORES DE PROTEÇÃO.....	23
3.2.1 FATORES DE PROTEÇÃO ASSOCIADOS AO SPA – ½ HZ.....	23
3.2.2 FATORES DE PROTEÇÃO ASSOCIADOS AO SPB – ¾ HZ.....	24
3.3 PATÓGENOS ISOLADOS NAS AMOSTRAS DE LEITE DO SPA E SPB.....	24
4. CONCLUSÕES	25
5. AGRADECIMENTOS.....	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
CAPÍTULO 2. DADOS CLIMÁTICOS E ZOOTÉCNICOS ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA E ETIOLOGIA DA MASTITE EM VACAS 1/2 HOLANDÊS-ZEBU.....	30
RESUMO	31
ABSTRACT	32
1. INTRODUÇÃO	33
2. MATERIAL E MÉTODOS	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4. CONCLUSÕES	40
5. AGRADECIMENTOS.....	40
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

CAPÍTULO 3. GENÓTIPOS DE <i>Staphylococcus aureus</i> ISOLADOS DE VACAS COM INFECÇÕES INTRAMAMÁRIAS SUBCLÍNICAS E CLÍNICAS TRANSIENTES E PERSISTENTES EM DOIS REBANHOS MISTIÇOS BRASILEIROS.....	46
RESUMO	47
ABSTRACT	48
1. INTRODUÇÃO	49
2. MATERIAL E MÉTODOS	49
2.1 Descrição dos rebanhos.....	49
2.2 Coleta de amostras.....	50
2.3 Determinação da CCS do leite.....	50
2.4 Análise microbiológica.....	50
2.5 Análise MALDI-TOF.....	51
2.6 Análise <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (PFGE).....	51
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4. CONCLUSÕES	57
5. AGRADECIMENTOS.....	57
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62

RESUMO

No presente estudo foram realizados três trabalhos em dois rebanhos de vacas mestiças ($\frac{1}{2}$ Holandês-Zebu e $\frac{3}{4}$ Holandês –Zebu) que foram divididos em capítulos intitulados: Associação entre dados climáticos e zootécnicos com presença de novas infecções intramamárias em vacas mestiças (Capítulo 1); Dados climáticos e zootécnicos associados à ocorrência e etiologia da mastite em vacas $\frac{1}{2}$ Holandês-Zebu (Capítulo 2); Genótipos de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com infecções intramamárias subclínicas transientes e persistentes e clínicas em dois rebanhos mestiços brasileiros (Capítulo 3). O objetivo do primeiro capítulo foi identificar variáveis zootécnicas e climáticas associadas com a presença de novas de infecções intramamárias em vacas mestiças $\frac{1}{2}$ HZ e $\frac{3}{4}$ HZ. As variáveis ordem de parto, relação gordura e proteína (G/P), temperatura máxima e umidade relativa do mês da coleta foram significativamente associadas à novas infecções intramamárias, enquanto produção de leite demonstrou ser fator de proteção no rebanho de vacas $\frac{1}{2}$ HZ. No rebanho de vacas $\frac{3}{4}$ HZ foi considerado como fator de risco, a variável relação G/P, diferentemente da variável ordem de parto que demonstrou ser um fator de proteção. Os patógenos mais frequentemente isolados nos dois rebanhos foram *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase-negativo e o *Corynebacterium* sp. No segundo capítulo foram identificadas as variáveis zootécnicas e climáticas associadas com a presença dos patógenos causadores de mastite e com a alta celularidade no leite de vacas mestiças $\frac{1}{2}$ HZ. O resultado deste estudo demonstrou que as variáveis ordem de parto, relação gordura e proteína, temperatura máxima e umidade relativa do mês da coleta são fatores de risco em relação à alta CCS, e as variáveis nitrogênio ureico do leite, produção de leite e precipitação do mês da coleta, fatores de proteção. Em relação à presença de patógenos, ordem de parto, temperatura máxima, índice temperatura e umidade e umidade relativa do mês foram considerados fatores de risco e temperatura mínima do mês foi fator de proteção. No terceiro capítulo, os genótipos de 124 amostras de *S. aureus* provenientes de vacas $\frac{1}{2}$ e $\frac{3}{4}$ HZ com mastite subclínica persistente e transiente, de vacas que apresentaram mastite subclínica e clínica por *S. aureus* e de vacas que apresentaram mastite subclínica causada por outros patógenos e clínica por *S. aureus* foram avaliados por meio da técnica de *Pulsed Field Gel Eletrophoresis* (PFGE). O resultado do estudo demonstrou que a maioria dos casos de mastite bovina nos rebanhos deve-se a ocorrência de cinco pulsotipos predominantes (A, G, I, K e B) e três subtipos A1, G2 e A9. A identificação dos fatores que favorecem a ocorrência da mastite, assim como a determinação epidemiológica de *S. aureus* permitem implementar medidas que sejam efetivas no controle da mastite.

Palavras-chave: infecção intramamária, clima, contagem de células somáticas, *Staphylococcus aureus*, pulsotipos

ABSTRACT

In the present study three studies in two dairy herds of crossbred cows (Holstein-Zebu $\frac{1}{2}$ and $\frac{3}{4}$ Holstein-Zebu) were performed and divided into chapters entitled: Association between climate and zootechnical data with the presence of new intramammary infections in crossbred cows (chapter 1); Climate and zootechnical data associated with the occurrence and etiology of mastitis in $\frac{1}{2}$ Holstein-Zebu cows (Chapter 2) and *Staphylococcus aureus* genotypes isolated from cows with transient and persistent subclinical and clinical intramammary infections in two Brazilian crossbred dairy herds (Chapter 3). The aim of the first chapter was to identify production and climatic variables associated with the presence of new intramammary infections in crossbred cows $\frac{1}{2}$ and $\frac{3}{4}$ HZ. The variables parity, the fat and protein (F/P), maximum temperature and relative humidity of the month of collection were significantly associated with new intramammary infections, while milk production was shown to be a protection factor in the herd of $\frac{1}{2}$ HZ cows. In the herd of cows $\frac{3}{4}$ HZ were considered a risk factor to the variable F/P ratio, unlike the variable parity that was shown to be a protective factor. The most frequent pathogens in both herds were *S. aureus*, coagulase-negative *Staphylococcus* and *Corynebacterium* sp. In the second chapter, production and climatic variables associated with the presence of pathogens causing mastitis and high cellularity in milk of crossbred cows ($\frac{1}{2}$ HZ) were identified. The result of this study showed that the variables parity, fat and protein ratio, maximum temperature and relative humidity at the month of sampling collection were risk factors in relation to high SCC. Variables such as milk urea nitrogen, milk production and rainfall at the of sampling were protective factors. Regarding the presence of pathogens, the variables parity, maximum temperature, index temperature and humidity and relative humidity of the month were considered as risk factors and as a protection factor the minimum temperature variable at the month of sampling. In the third chapter, we compare *Staphylococcus aureus* genotypes from transient and persistent subclinical and clinical intramammary infections in two crossbreed dairy herds. A total of 124 samples were evaluated using the technique of Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). The majority of bovine mastitis cases were related to five predominant pulse types (A, G, I, K e B) and to three subtypes A1, G2 e A9. The identification of the factors that improve the risks of mastitis and the epidemiological determination of *S. aureus* allow effective measures to control this disease.

Keywords: intramammary infection, climate, somatic cell count, *Staphylococcus aureus*, pulsotype

INTRODUÇÃO GERAL

A produção de leite é uma importante fonte de renda para a economia do país, pois gera milhões de empregos diretos em propriedades rurais que produzem e comercializam leite. A pecuária brasileira caracteriza-se por diversos sistemas de produção de leite que atendem à pluralidade de regiões e de raças, níveis de intensificação, uso de insumos e manejo.

Em Minas Gerais, ainda prevalecem sistemas produtivos tradicionais, sustentados principalmente em animais mestiços, originados do cruzamento de *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*. Os dois sistemas de produção avaliados neste estudo apresentam características comuns à maioria dos rebanhos do Estado. O rebanho do sistema de produção A é constituído por vacas ½ Holandês – Zebu (HZ) ordenhadas com a presença do bezerro ao pé e o sistema de produção B composto por vacas ¾ Holandês – Gir ordenhadas sem a presença do bezerro ao pé.

Independentemente das características do sistema de produção, inúmeros fatores podem interferir sobre a produção e a qualidade do leite em um rebanho, sendo a mastite uma das causas que desempenham maior influência negativa sobre a qualidade e quantidade do leite, resultando no aumento na contagem de células somáticas (CCS).

Vários fatores que favorecem a ocorrência da mastite bovina têm sido relatados na literatura, especialmente em rebanhos especializados. Estes fatores podem estar relacionados ao rebanho envolvendo práticas de manejo higiênico sanitário, principalmente manejo de ordenha, e relacionados ao animal individualmente (características anatômicas e fisiológicas, doenças), assim como a fatores ligados ao meio ambiente, envolvendo as condições climáticas (temperatura, precipitação, umidade do ar).

No Brasil, *Staphylococcus aureus* destaca-se como principal agente causador da mastite nos rebanhos. Devido à dificuldade de controle, a alta prevalência nos rebanhos, ao potencial de produzir toxinas no leite e à facilidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos, é o agente patogênico causador da mastite mais estudado e tem sido objeto de estudos epidemiológicos.

Para conhecer a complexidade etiológica das mastites causadas por *S. aureus* e compreender a disseminação dentro do rebanho, faz-se necessária a identificação fenotípica e caracterização genotípica das cepas envolvidas nos casos desta enfermidade.

Diversos trabalhos têm avaliado a mastite e sua influência na qualidade do leite em rebanhos leiteiros de alta produção, como bovinos da raça Holandesa. Até onde se sabe, não existem estudos que identificaram variáveis climáticas e zootécnicas que estejam associadas à alta CCS e presença de patógenos causadores de mastite em rebanhos de vacas mestiças ½ HZ e ¾ HZ, bem como não há dados comparando os genótipos dos *S. aureus* dos casos de mastite subclínica persistente e transiente e de mastite clínica em rebanhos de vacas mestiças ½ e ¾ Holandês - Zebu.

Diante da escassez de dados científicos publicados com o gado mestiço sobre estas informações, este estudo foi desenvolvido.

OBJETIVOS

- Identificar variáveis zootécnicas e climáticas associadas com a presença de novas infecções intramamárias em vacas mestiças $\frac{1}{2}$ HZ e $\frac{3}{4}$ HZ.
- Identificar variáveis zootécnicas e climáticas associadas com a detecção dos patógenos causadores de mastite e com alta celularidade no leite de vacas mestiças $\frac{1}{2}$ HZ.
- Identificar e comparar os genótipos dos *S. aureus* dos casos de mastite clínica e subclínica persistente e transiente em rebanhos de vacas mestiças $\frac{1}{2}$ HZ e $\frac{3}{4}$ HZ.

CAPÍTULO 1

ASSOCIAÇÃO ENTRE DADOS CLIMÁTICOS E ZOOTÉCNICOS COM A PRESENÇA DE NOVAS INFECÇÕES INTRAMAMÁRIAS EM VACAS MISTIÇAS

RESUMO

No presente estudo foi avaliado o efeito dos dados climáticos e de variáveis zootécnicas sobre a presença de novas infecções intramamárias em dois rebanhos constituídos por vacas mestiças $\frac{1}{2}$ HZ (sistema de produção A - SPA) e $\frac{3}{4}$ HZ (sistema de produção B - SPB). Durante o período de estudo (setembro de 2011 a julho de 2014), coletou-se mensalmente amostras compostas de leite das vacas em lactação dos dois sistemas de produção para realização da análise de qualidade composicional do leite (gordura e proteína) e de contagem automática de células somáticas (CCS), totalizando 2.757 e 2.078 amostras nos sistemas de produção A e B, respectivamente. Os dados climáticos, temperatura mínima, máxima e média, precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar foram registrados mensalmente e no dia da coleta. A análise estatística dos dados foi realizada por um modelo multivariado de regressão logística para cada sistema de produção. No sistema de produção A (vacas $\frac{1}{2}$ HZ), as variáveis ordem de parto, a proporção gordura e proteína (G/P), temperatura máxima e umidade relativa foram significativamente associadas a novos casos de infecções intramamárias, no entanto, a variável produção de leite demonstrou ser fator de proteção. No sistema de produção B (vacas $\frac{3}{4}$ HZ), a variável relação gordura e proteína foi considerada fator de risco à presença de novas infecções intramamárias, diferentemente da variável ordem de parto que demonstrou ser um fator de proteção. O aumento de uma ou mais destas variáveis favorece a ocorrência de novos casos de mastite subclínica em vacas mestiças em lactação. Os patógenos mais frequentes nas amostras dos dois sistemas de produção foram *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. coagulase negativo e *Corynebacterium* sp. Para que seja implementado um programa de prevenção e controle da mastite é fundamental o conhecimento dos fatores de risco e patógenos causadores da doença no rebanho.

Palavras-chave: clima, índice temperatura-umidade, contagem de células somáticas, patógeno, mastite bovina, vaca mestiça

ABSTRACT

The present study evaluated the effect of climatic and zootechnical data with the presence of new intramammary infections in crossbred cows. During the study period (September 2011 to July 2014), milk samples were collected monthly from lactating cows to perform compositional quality analysis of milk (fat and protein) and somatic cell counts, totaling in production system A and B 2.757 and 2.078 milk samples, respectively. The climatic data, minimum, maximum and average temperature, rainfall and relative humidity were recorded on the day of collection. Statistical analysis of the data was performed by a multivariate logistic regression model. In the production system A, the variables parity, the fat and protein (F/P), maximum temperature and relative humidity of the month of collection were significantly associated with new intramammary infections, while milk production was shown to be a protection factor in the herd of $\frac{1}{2}$ HZ cows. In the herd of cows $\frac{3}{4}$ HZ were considered a risk factor to the variable F/P ratio, unlike the variable parity that was shown to be a protective factor. The increase of one or more of these variables favor the the presence of new intramammary infections of lactating cows. The most frequent pathogens in the samples of the two production systems were *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. Coagulase negative and *Corynebacterium* sp. In order to implement a mastitis prevention and control program, knowledge of the risk factors and pathogens that cause the disease in the herd are fundamental.

Keywords: climate, index temperature and humidity, somatic cell count, pathogen, bovine mastitis, crossbreed cows

1. INTRODUÇÃO

A mastite é uma doença endêmica, de caráter multifatorial e responsável por prejuízos econômicos para atividade leiteira em todo o mundo. O desencadeamento desta enfermidade está vinculado à complexa tríade: animal, agente etiológico e/ou meio ambiente e, dessa forma, o clima pode influenciar indiretamente esta tríade de fatores (Green et al., 2006).

A mudança climática é uma das principais ameaças para a sobrevivência de várias espécies, ecossistemas e a sustentabilidade dos sistemas de produção de gado em todo o mundo, especialmente nos países tropicais e temperados (Gale et al., 2009). Nos últimos anos, o número de pesquisas buscando o bem-estar animal tem se intensificado na tentativa de minimizar perdas econômicas decorrentes dos efeitos do clima sobre a produção animal (Souza et al., 2010).

Dentre as variáveis climáticas, a elevada temperatura ambiental, a umidade do ar e a radiação solar direta são os principais responsáveis por causarem o desconforto fisiológico, denominado estresse térmico, o qual pode promover alterações no bem-estar, na eficiência produtiva e na saúde das vacas leiteiras, favorecendo a ocorrência da mastite (Renaudeau et al., 2012).

Os rebanhos em regiões subtropical, tropical e semiáridas estão sujeitos a alta temperatura do ambiente (T_a), umidade relativa do ar (UR) e radiação solar por extensos períodos. O Brasil é um país localizado na região tropical e destaca-se como um dos maiores produtores mundiais de leite. O rebanho nacional é composto predominantemente por animais mestiços, originados do cruzamento de *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*, que incorporaram rusticidade, eficiência na produção de leite e capacidade de adaptar às condições tropicais (Fonseca et al., 2009).

Embora vários estudos tenham investigado a influência do clima sobre a CCS (Green et al., 2006; Hammani et al., 2013; Lambertz et al., 2014), a maioria das conclusões científicas baseia-se em raças de bovinos leiteiros altamente especializadas como a raça holandesa. Portanto, até onde se sabe, até o momento não há estudos relatando o efeito dos dados climáticos e de variáveis zootécnicas sobre a ocorrência de novas infecções intramamárias por um longo período em rebanhos de vacas mestiças $\frac{1}{2}$ HZ e $\frac{3}{4}$ HZ. Portanto, o objetivo deste estudo foi identificar variáveis zootécnicas e climáticas associados com a presença de novas infecções intramamárias em vacas mestiças $\frac{1}{2}$ HZ e $\frac{3}{4}$ HZ.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em dois sistemas de produção localizados no município de Prudente de Moraes em Minas Gerais, Brasil, no período de setembro de 2011 a julho de 2014, com exceção do mês de dezembro de 2012 quando não foi possível a realização da coleta de amostras.

2.1 Descrição dos sistemas de produção

Os sistemas de produção são caracterizados como semi-intensivos, fechados, distintos e independentes. O sistema de produção A (SPA) localiza-se a 19°27'11.27" latitude Sul, 44°09'55.42" longitude Oeste e 732 m de altitude e é composto por vacas $\frac{1}{2}$ HZ com produção média de 9,1 litros/vaca/dia. O sistema de produção B (SPB) está localizado a 19°26'42.40" latitude Sul, 44°09'6.06" longitude Oeste e 732 m de altitude e o rebanho é constituído por vacas $\frac{3}{4}$ Holandês – Zebu com produção média de 10,1 litros/vaca/dia.

Nos dois sistemas de produção, as vacas foram avaliadas em diferentes estágios da lactação. As vacas eram ordenhadas duas vezes ao dia, em equipamento mecânico duplo seis/seis, sem mecanismo de extração automática de teteiras nos dois sistemas de produção. No SPA a ordenha era realizada com a presença de bezerro ao pé.

Por se tratar de um estudo longitudinal, ocorreu, ao longo do período, uma variação mensal no número de animais em lactação, sendo avaliadas 164 vacas no SPA e 115 no SPB.

2.2 Coleta de amostras

Durante o período de estudo, coletaram-se mensalmente, no dia da pesagem do leite, amostras compostas de leite das vacas em lactação, conforme descrito por Schreiner e Ruegg (2003) para realização da análise de qualidade composicional do leite (gordura e proteína) e de contagem de células somáticas (CCS), totalizando 2.757 amostras no SPA e 2.078 no SPB.

As amostras compostas de leite foram obtidas diretamente de medidores de leite acoplados ao equipamento de ordenha e acondicionadas em frascos contendo bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol). Imediatamente após a coleta, as amostras foram acondicionadas em caixas térmicas contendo gelo reciclável e transportadas para o laboratório onde foram submetidas às análises laboratoriais.

2.3 Determinação da composição e CCS do leite

As amostras de leite foram analisadas quanto aos teores de gordura, proteína e contagem de células somáticas no equipamento eletrônico CombiScope FTIR 400[®] (Delta Instruments; Drachten, Holanda) que combina o princípio de Transformada de Fourier no infravermelho médio e citometria de fluxo, respectivamente. As análises para determinação da composição do leite foram realizadas segundo IDF (2000) e a contagem de células somáticas segundo IDF (1995).

2.4 Análise microbiológica

Foram coletadas bimestralmente de todas as vacas em lactação, no período de abril de 2013 a julho 2014 (16 meses), amostras compostas de leite para isolamento e identificação de patógenos causadores de mastite subclínica. Foram submetidas à análise microbiológica, 610 e 513 amostras do SPA e SPB, respectivamente.

Para isolamento e identificação dos patógenos causadores da mastite subclínica foram coletadas amostras compostas dos quatro quartos mamários das vacas em lactação. Antes da coleta das amostras, foi realizado o descarte dos três primeiros jatos, com posterior desinfecção dos tetos com solução pré-dipping. No momento da coleta, foi realizada antisepsia do esfíncter do teto, utilizando-se algodão umedecido em álcool a 70%. Os jatos foram retirados de cada teto individualmente, formando amostras compostas de aproximadamente 50 mL. Elas foram acondicionadas em frascos estéreis, congeladas a -20°C e enviadas ao laboratório.

Os agentes causadores da mastite foram identificados semeando-se 0,01mL de cada amostra de leite, com alça calibrada descartável, em cada quadrante de uma placa de ágar-sangue preparado

com 5% de sangue desfibrinado de carneiro. As placas foram incubadas a 37°C por 24 a 48 horas, seguido de observação da morfologia das colônias, testes de coloração de Gram e de identificação (Oliver et al., 2004).

2.5 Dados meteorológicos

Os dados meteorológicos temperatura mínima, máxima e média, precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar (Figura 1, 2 e 3) foram obtidos no dia da coleta e mensalmente na Estação Meteorológica, localizada no município de Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil, latitude 19°29'07'', longitude 44°10'27'', altitude 732 m, pertencente ao Instituto Nacional de Meteorologia.

Valores do índice de temperatura e umidade (ITU), diários e mensais, foram determinados utilizando a equação, $ITU = 1,8 \times Ta - (1 - UR) \times (Ta - 14,3) / 32$, tal como descrito por Kibler (1964), em que Ta é a temperatura média do ambiente em °C e UR é a umidade relativa média como uma fração da unidade.

2.6 Dados zootécnicos

A produção de leite foi avaliada mensalmente nos dois sistemas de produção, durante as ordenhas da manhã e da tarde, sendo mensurada por meio de medidores de leite acoplados ao equipamento de ordenha, possibilitando, assim, a avaliação da produção diária individual dos animais.

Os dados de dias em lactação das vacas (DEL) e ordem de parto foram registrados no *software* zootécnico dos sistemas de produção (PRODAP Professional GP, Belo Horizonte, Brasil). Também foi estabelecida a proporção do percentual de gordura do leite em relação ao de proteína com o objetivo de avaliar o equilíbrio energético dos animais (Buttchereit et al., 2010).

2.7 Análise estatística

Os dados dos sistemas de produção A e B foram analisados separadamente. Para análise estatística, as vacas foram divididas em animais com alta e baixa celularidade do leite conforme valor de corte amplamente utilizado para CCS em vacas sadias de ≤ 200.000 células mL^{-1} (Dohoo e Leslie, 1991; Schukken et al., 2003). Identificaram-se também, os casos de novas infecções intramamárias de cada animal com base na CCS ao longo do período avaliado.

A análise estatística dos dados foi realizada com *software* estatístico STATA versão 12 (Stata Corp. College Station, Texas, EUA), utilizando um modelo de regressão logística para cada sistema de produção. As variáveis foram primeiramente analisadas individualmente, e em seguida, em combinação para avaliar o efeito das variáveis sobre todas as outras. Na primeira fase da análise, foi feito um modelo logístico para cada uma das variáveis relacionadas com os resultados de CCS. As variáveis com *P* valores $\leq 0,20$ foram consideradas e utilizadas na próxima fase da análise. No modelo final, variáveis selecionadas na primeira etapa foram usadas para desenvolver um modelo de logística multivariada em que variáveis com *P* $\leq 0,05$ foram mantidas no modelo final.

Equação da regressão

$$\text{Logit}(p_i) = \log(p_i / (1 - p_i)) = \alpha + \beta X_i$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No sistema de produção A (SPA), a maioria das amostras de leite coletadas (66,85 %, n = 1843) apresentou $\text{CCS} \leq 200.000$ células mL^{-1} , sendo, portanto, provenientes de vacas consideradas saudáveis. As amostras provenientes de vacas com mastite subclínica deste sistema representaram 33,25% (n = 915). No sistema de produção B, das 2.078 amostras compostas de leite analisadas quanto a CCS, 77,86% (n = 1618) apresentaram $\text{CCS} > 200.000$ células mL^{-1} , sendo consideradas vacas com infecção intramamária (Figura 1).

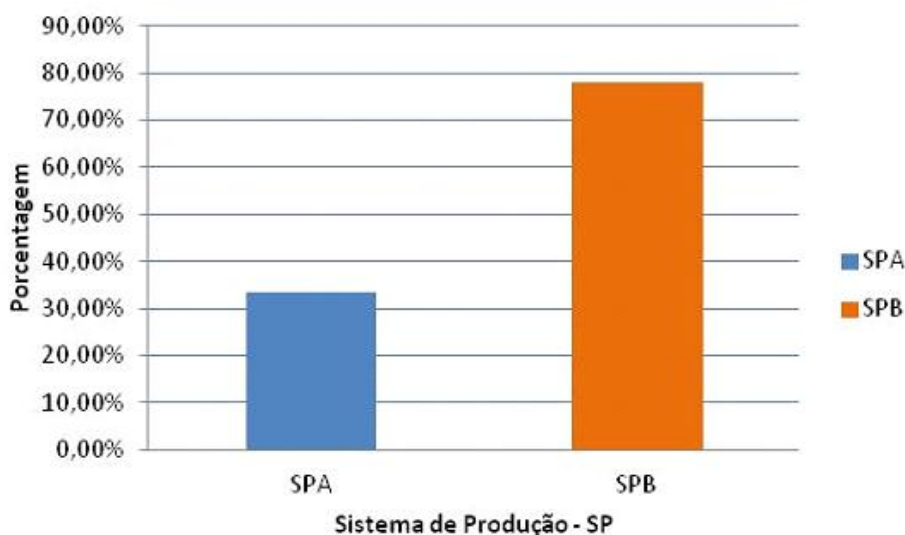


Figura 1 – Porcentagem de amostras de leite provenientes de vacas com mastite subclínica nos dois sistemas de produção (SPA e SPB).

O modelo multivariado de regressão logística demonstrou que as variáveis ordem de parto, relação gordura e proteína, temperatura máxima e umidade relativa do mês da coleta são fatores de risco em relação às novas infecções intramamárias em vacas $\frac{1}{2}$ HZ (SPA), diferentemente das variáveis produção de leite que demonstrou ser fator de proteção (Tabela 1).

Tabela 1. Modelo multivariado de regressão logística ($P \leq 0,05$) das variáveis associadas à novas infecções de vacas $\frac{1}{2}$ Holandês – Zebu (SPA)

Variáveis	Odds Ratio	P valor	95% de intervalo de confiança
Ordem de parto	1,07	0,0017	1,03 - 1,12
Razão Gordura / Proteína	2,67	$\leq 0,001$	1,84 - 3,86
Produção de leite	0,93	$\leq 0,001$	0,90 - 0,96
Temperatura máxima (mês)	1,04	0,0321	1,00 - 1,08
Umidade relativa (mês)	7,09	0,0050	1,81 - 27,85

Em relação ao sistema produção B (vacas $\frac{3}{4}$ HZ), o modelo de regressão logística demonstrou que a variável relação gordura/proteína foi considerada fator de risco às novas infecções intramamárias, diferentemente da variável ordem de parto que foi fator de proteção (Tabela 2).

Tabela 2. Modelo multivariado de regressão logística ($P \leq 0,05$) de variáveis associadas à novas infecções intramamárias em vacas $\frac{3}{4}$ Holandês – Zebu

Variáveis	Odds Ratio	P valor	95% de intervalo de confiança
Ordem de parto	0,84	$\leq 0,001$	0,91 - 19,50
Razão Gordura / Proteína	4,05	$\leq 0,001$	7,32 - 21,36

Gordura/Proteína: proporção entre o percentual de gordura e proteína do leite

As Figuras 2, 3 e 4 demonstram a variação dos dados climáticos e a média da CCS (log células / mL) no período de setembro de 2011 a julho de 2014 nos dois sistemas de produção avaliados.

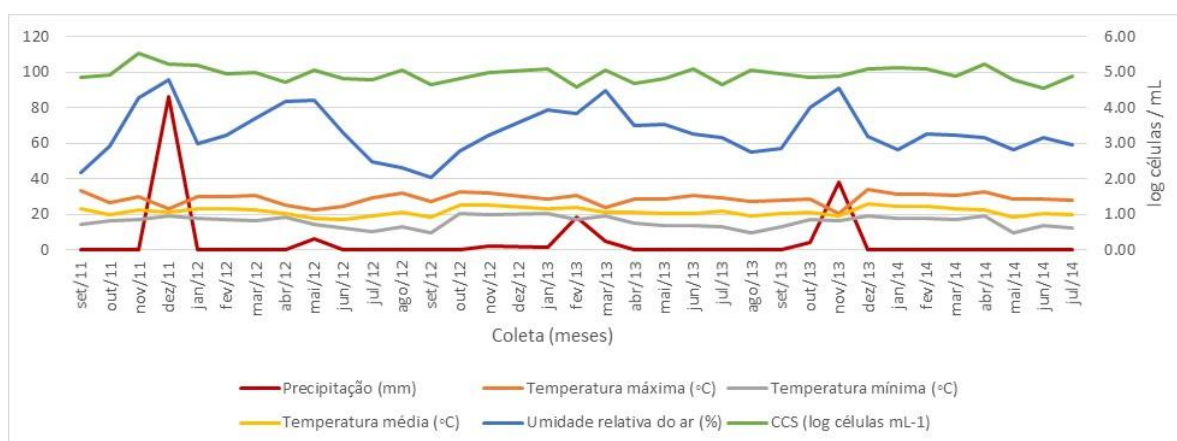


Figura 2 – Dados climáticos do dia da coleta e média mensal CCS (log células/mL) ao longo do período avaliado no sistema de produção A ($\frac{1}{2}$ HZ)

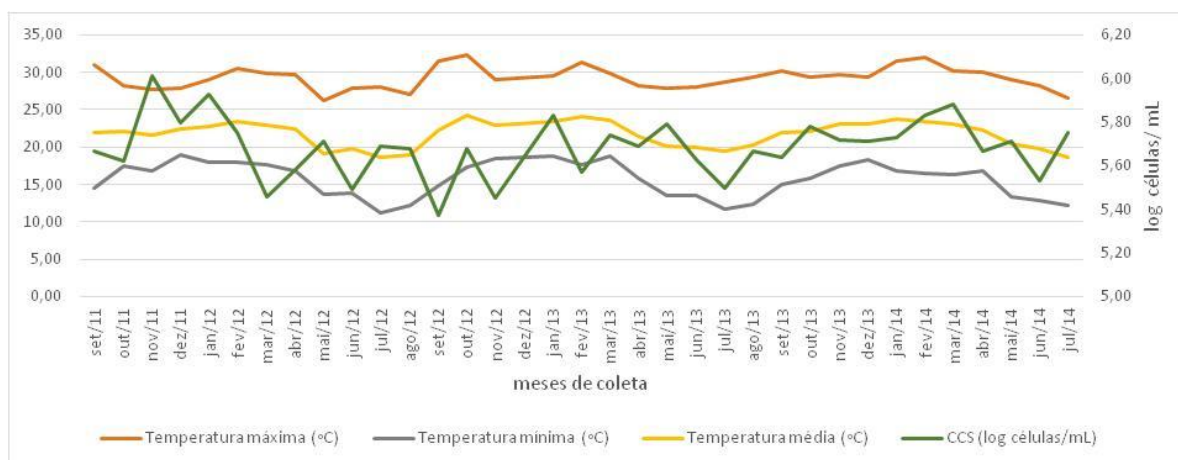


Figura 3. Sistema de produção B (¾ HZ) - dados das temperaturas máxima, média, mínima e média da CCS (log células / mL) no período de setembro de 2011 a julho de 2014.

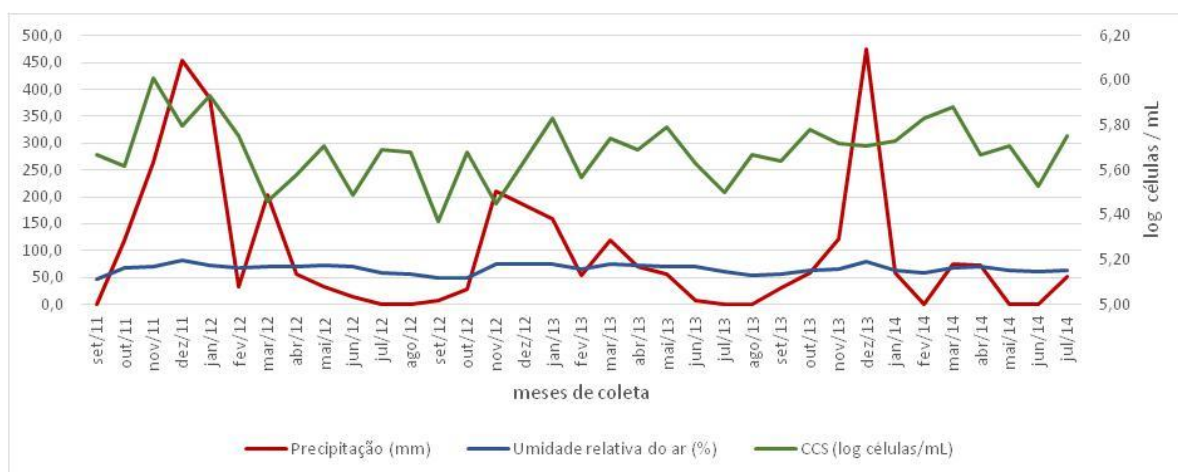


Figura 4. Sistema de produção B (¾ HZ) - dados da precipitação, umidade relativa do ar e média da CCS (log células / mL) no período de setembro de 2011 a julho de 2014.

3.1 FATORES DE RISCO

3.1.1 COMUNS AOS SISTEMAS DE PRODUÇÃO A - SPA e B - SPB

- **RELAÇÃO GORDURA E PROTEÍNA (G/P)**

A relação entre teores de gordura e proteína do leite é um parâmetro utilizado para avaliação nutricional de um rebanho e também para detecção de distúrbios metabólicos como, por exemplo, o balanço energético negativo (BEN) (Moyes et al., 2009; Buttchereit et al., 2010). O BEN é considerado um fenômeno fisiológico em vacas leiteiras, principalmente de alta

produção (Van Straten et al., 2009), e que também pode afetar as vacas mestiças. Desta forma, o presente estudo demonstrou que vacas mestiças podem apresentar BEN e aumento na relação G/P, assim como vacas leiteiras de raças especializadas, como as da raça holandesa.

Corroborando com os achados do nosso estudo, dados da literatura demonstram que o BEN compromete a função imunológica e predispõe as vacas a doenças infecciosas, como a mastite (Buttchereit et al., 2010). Segundo Lees e Lievaart (2013), o BEN aumenta as chances de mastite subclínica e tornam essas vacas com CCS alta mais propensas a mastite clínica, além de promover a diminuição da produção de leite, mudanças desfavoráveis na composição do leite e aumento das taxas de descarte.

No início da lactação, o BEN resulta no aumento na porcentagem de gordura e redução do teor de proteínas no leite. A diminuição do teor de proteínas ocorre em função da deficiência de aminoácidos provenientes da corrente sanguínea e energia para a síntese de proteína na glândula mamária. Já o aumento no teor de gordura do leite, ocorre devido ao déficit de energia que leva ao aumento da lipólise, aumento da absorção de ácidos graxos mobilizados a partir da gordura corporal (Buttchereit et al., 2010).

A maioria dos dados disponíveis na literatura que avaliam a relação entre o BEN e a ocorrência de mastite foram obtidos em rebanhos de vacas da raça holandesa (Buttchereit et al., 2010; Toni et al., 2011) e poucos trabalhos publicados abordam a relação entre o BEN e a mastite subclínica (Rezamand et al., 2007; Nyman et al., 2008).

Outra explicação em relação a G/P como fator de risco é o efeito de concentração da gordura do leite em vacas com mastite devido à redução da produção de leite, resultado dos danos causados às células secretoras de leite.

3.1.2 FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO SPA – 1/2 HZ

- **ORDEM DE PARTO**

O resultado desse estudo no sistema de produção A ratifica os dados apresentados na literatura, que constataram que o aumento da CCS está relacionado ao aumento da idade da vaca e conseqüentemente, à ordem de parto (Berry et al., 2007; Hagnestam-Nielsen et al., 2009; Souza et al., 2010; Hand et al., 2012; Syridion et al., 2012).

Com o aumento da ordem de parto, as vacas se tornam mais propensas à mastite devido a maior frequência de exposição à infecção e aos danos causados à glândula mamária por infecções anteriores (Coldebella et al., 2004; Olde Riekerink et al., 2007; Hagnestam-Nielsen et al., 2009). Por exemplo, Syridion et al. (2012) relataram que vacas com quatro ou mais lactações apresentam redução na produção de leite e são mais susceptíveis à infecções intramamárias em função das lesões da glândula e do esfíncter do teto ao longo da vida do animal.

Outro ponto favorável à ocorrência da mastite em animais mais velhos se deve, pelo menos em parte, à menor eficiência do mecanismo de resposta imune comparado aos animais jovens. Dessa forma, vacas multíparas têm maior susceptibilidade às infecções intramamárias crônicas (Syridion et al., 2012). Corroborando com esta teoria, Mehrzad et al. (2002) observaram que vacas multíparas sadias apresentam diminuição acentuada da atividade fagocítica e bactericida por neutrófilos, em comparação com as primíparas.

- **TEMPERATURA MÁXIMA E UMIDADE RELATIVA**

Inúmeros trabalhos abordam os efeitos negativos da alta temperatura do ar associada à elevada umidade relativa do ar sobre a produção e composição do leite, o consumo de alimentos, a reprodução, a susceptibilidade às doenças infecciosas, incluindo a mastite, e os prejuízos econômicos significativos à atividade pecuária (West et al., 2003; Bohmanova et al., 2007; Gantner et al., 2011; Tao et al., 2011; Hammami et al., 2013; Lambertz et al., 2014), corroborando com os achados do presente estudo em vacas mestiças ½ Holandês-Zebu.

Os dados da literatura relatam que as altas temperaturas facilitam a sobrevivência e multiplicação de patógenos causadores de mastite e de moscas transportadoras de microrganismos, o que pode resultar na maior incidência de mastite, consequentemente no aumento de novos casos de infecções intramamárias (Lopez-Benavides et al., 2005; Green et al., 2006; Olde Riekerink et al., 2007; Tao et al., 2011; Archer et al., 2013).

Fatores ambientais e climatológicos afetam a incidência da mastite em rebanhos leiteiros, que muitas vezes, apresenta padrão sazonal (Olde Riekerink et al., 2007). O resultado desse estudo está de acordo com diversos trabalhos que demonstraram que a ocorrência de mastite clínica e subclínica é maior no verão e menor no inverno. Durante este período, há aumento da temperatura, excesso de umidade e acúmulo de barro nas pastagens e imediações da sala de ordenha, que favorecem a proliferação e sobrevivência dos patógenos (Barkema et al., 1998; Osteras et al., 2006; Green et al., 2006; Olde Riekerink et al., 2007; Lievaart et al., 2007; Archer et al., 2013).

A condição de higiene do úbere está diretamente relacionada à quantidade e aos tipos de bactérias presentes na superfície da glândula mamária. A presença de sujidades nos tetos e úbere é considerada a principal fonte de microrganismos ambientais para a glândula mamária e para o leite (Schreiner e Ruegg, 2003; De Pinho Manzi et al., 2012).

Congruente aos resultados do presente estudo, Zhang et al. (2016) observaram maior frequência de isolamentos dos agentes causadores de mastite (81,04%) na primavera em comparação com o período do inverno (52,34%), e maior probabilidade de infecção por patógenos ambientais no verão. No presente estudo, a maior ocorrência de mastite foi associada à presença de patógenos contagiosos.

No entanto, Malek et al. (2011) ao avaliarem rebanhos de vacas Gir nos estados de São Paulo e Minas Gerais não encontraram diferença nos valores de CCS entre o período do verão (outubro a março, CCS média 123.000 / mL) e inverno (abril a setembro, CCS média 117.000 / mL).

3.2 FATORES DE PROTEÇÃO

3.2.1 FATORES DE PROTEÇÃO ASSOCIADOS AO SPA – 1/2 HZ

- **PRODUÇÃO DE LEITE**

A variável produção de leite foi considerada fator de proteção em relação à probabilidade de um animal apresentar uma nova infecção intramamária no sistema de produção A. Dados da literatura demonstram relação inversa entre a presença da mastite subclínica e produção de leite

em decorrência dos danos causados as células epiteliais secretoras e das alterações na permeabilidade vascular no alvéolo secretor durante a infecção (De Vliegher et al., 2005; Green et al., 2006).

À medida que reduz os casos de mastite subclínica, a produção de leite aumenta, em razão da menor incidência de lesões nos tecidos do úbere (Coldebella et al., 2004; Hand et al., 2012), fato que pode explicar, pelo menos em parte, porque a produção de leite está inversamente relacionada ao aumento da CCS.

3.2.2 FATORES DE PROTEÇÃO ASSOCIADOS AO SPB – ¾ HZ

- **ORDEM DE PARTO**

A variável ordem de parto no sistema de produção B foi considerada fator de proteção em relação à presença de novas infecções intramamárias. Este resultado difere dos dados da literatura, que demonstram que o aumento da CCS está relacionado com o aumento da ordem de parto (Berry et al., 2007; Hagnestam-Nielsen et al., 2009; Souza et al., 2010; Hand et al., 2012; Syridion et al., 2012). Neste rebanho, as novas infecções ocorreram principalmente em vacas primíparas, que diferentemente das vacas múltíparas, se infectaram possivelmente devido a problemas de manejo e alta taxa de patógenos contagiosos e permaneceram infectadas.

3.3 PATÓGENOS ISOLADOS NAS AMOSTRAS DE LEITE DO SPA E SPB

As tabelas 3 e 4 apresentam a análise descritiva das 610 e 513 amostras provenientes do SPA e SPB, respectivamente, quanto à presença de patógenos.

Tabela 3. Frequência de patógenos isolados em amostras de leite de vacas do sistema de produção A com as respectivas médias e amplitudes de CCS (log células/ml)

Patógenos identificados (SPA)	Nº amostras	Porcentagem %	CCS (log células/mL) média e amplitude
<i>Corynebacterium</i> sp.	110	18,03	4,84 (3,00 - 6,27)
<i>Staphylococcus aureus</i>	71	11,64	5,39 (3,00 - 6,45)
<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase negativo	59	9,67	5,01 (3,00 - 6,27)
<i>Streptococcus uberis</i>	10	1,64	5,78 (3,00 - 6,27)
<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Corynebacterium</i> sp.	9	1,48	5,04 (3,00 - 6,38)
<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase positivo	8	1,31	5,48 (4,67 - 5,15)
<i>Streptococcus</i> sp.	8	1,31	5,6 (4,74 - 6,20)
<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus</i> sp. coagulase negativo	5	0,82	5,27 (5,01 - 6,18)
<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase negativo e <i>Corynebacterium</i> sp.	4	0,66	5,15 (4,64 - 5,29)
<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase negativo e <i>Staphylococcus</i> sp. coagulase positivo	3	0,49	5,43 (5,31 - 5,49)
<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus</i> sp.	2	0,33	5,97 (5,31 - 6,25)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2	0,33	5,44 (4,68 - 6,20)
<i>Streptococcus</i> sp. e <i>Staphylococcus</i> sp. coagulase negativo	2	0,33	5,17 (4,88 - 5,47)
<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus equinus</i>	1	0,16	5,62
<i>Pseudomonas</i> sp.	1	0,16	3,00
<i>Streptococcus equinus</i> / <i>Corynebacterium</i> sp.	1	0,16	5,26
<i>Streptococcus equinus</i> / <i>Enterococcus</i> sp.	1	0,16	5,81
<i>Streptococcus</i> sp. / <i>Staphylococcus</i> sp. coagulase positivo	1	0,16	6,70
<i>Streptococcus uberis</i> / <i>Staphylococcus</i> sp. coagulase positivo	1	0,16	5,34
Não houve crescimento	302	49,52	
Amostras contaminadas	9	1,48	
Total	610		

Tabela 4. Frequência de patógenos isolados em amostras de leite de vacas do sistema de produção B com as respectivas médias e amplitudes de CCS (log células /ml)

Patógenos identificados (SPB)	n° amostras	Porcentagem (%)	CCS (log células/mL) média e amplitude
<i>Staphylococcus aureus</i>	121	23,59	5,84 (6,28 - 6,84)
<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase negativo	94	18,32	5,57 (3,00 - 6,82)
<i>Corynebacterium</i> sp.	57	11,11	5,70 (4,61 - 6,44)
<i>Corynebacterium</i> sp. e <i>Staphylococcus aureus</i>	15	2,92	5,82 (5,49 - 6,66)
<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus</i> sp. coagulase negativo	15	2,92	5,85 (5,11 - 6,70)
<i>Streptococcus uberis</i>	14	2,73	6,05 (5,53 - 6,68)
<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase negativo e <i>Streptococcus uberis</i>	10	1,95	5,91 (5,22 - 6,31)
<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus uberis</i>	9	1,76	6,12 (5,20 - 6,46)
<i>Streptococcus</i> sp.	8	1,56	6,00 (5,73 - 6,40)
<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase negativo e <i>Staphylococcus</i> sp. coagulase positivo	7	1,37	5,79 (4,73 - 6,53)
<i>Corynebacterium</i> sp. e <i>Staphylococcus</i> sp. coagulase positivo	5	0,98	5,45 (4,72 - 5,90)
<i>Corynebacterium</i> sp. e <i>Staphylococcus</i> sp. coagulase negativo	4	0,78	5,63 (5,25 - 6,11)
<i>S. aureus</i> e <i>Streptococcus</i> sp.	3	0,58	6,38 (6,24 - 6,72)
<i>Klebsiella</i> sp.	2	0,40	5,74 (5,71 - 5,76)
<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase negativo e <i>Streptococcus</i> sp.	2	0,40	6,06 (6,01 - 6,12)
<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase positivo	2	0,40	4,70 (4,69 - 4,71)
<i>Corynebacterium</i> sp. e <i>Streptococcus</i> sp.	1	0,19	6,03
<i>Pseudomonas</i> e <i>Streptococcus uberis</i>	1	0,19	6,29
<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i>	1	0,19	5,78
<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterococcus</i> sp.	1	0,19	5,93
<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Klebsiella</i> sp.	1	0,19	6,87
<i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>Streptococcus uberis</i>	1	0,19	6,05
Não houve crescimento	124	24,17	
Amostras contaminadas	15	2,92	
Total	513	100,0	

Esses resultados demonstram que os patógenos mais frequentes nas amostras tanto no SPA quanto no SPB foram *S. aureus*, *Staphylococcus* sp. coagulase negativo e *Corynebacterium* sp. (Tabelas 3 e 4).

A frequência desses patógenos demonstra que a mastite subclínica nos dois rebanhos é de origem contagiosa e que a contaminação ocorre possivelmente no momento da ordenha, de um animal para o outro, pelas mãos dos ordenhadores, equipamentos de ordenha e por meio de outros fômites de uso comum. Os patógenos se multiplicam sobre o revestimento externo do teto, no canal do teto e no interior da glândula mamária do animal infectado e são transmitidos de um animal para o outro (Botaro et al., 2015; Tomazi et al., 2015).

Os dados microbiológicos desse estudo demonstram a necessidade de melhoria, principalmente, das práticas do manejo de ordenha, abordando os procedimentos de pré-dipping, pós-dipping, bem como a higiene do ordenhador, descarte das vacas cronicamente infectadas e manutenção periódica do equipamento de ordenha (Langoni 2013).

4. CONCLUSÃO

No sistema de produção A, as variáveis ordem de parto, relação G/P, temperatura máxima e umidade relativa do mês foram significativamente associadas à novas infecções intramamárias, bem como a variável relação G/P, no sistema de produção B.

A identificação dos fatores climáticos e variáveis zootécnicas relacionados à ocorrência de novos casos de mastite subclínica em rebanhos ½ e ¾ Holandês-Zebu é importante para identificar os animais e períodos de maior suscetibilidade.

Os patógenos com maior frequência isolados nas amostras avaliadas foram *S. aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativo e *Corynebacterium* sp. O predomínio desses patógenos como causadores da mastite subclínica indica deficiência nas práticas de manejo de ordenha e que as propriedades devem atentar para o risco desses animais como portadores e fonte de infecção para o rebanho.

5. AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (CVZ APQ 03680/10), à Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG, ao Laboratório de Análise da Qualidade do Leite – LabUFMG e ao Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCHER, S.C.; COY, F. MC; WAPENAAR, W. et al. Association of season and herd size with somatic cell count for cows in Irish, English, and Welsh dairy herds. *Vet. J.*, v.196, n.3, p. 515-21, 2013.

BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; LAM, T. J. G. M. et al. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *J. Dairy Sci.*, v.81, p.411–419, 1998.

BERRY, D. P., LEE, J. M.; MACDONALD, K. A. et al. Associations among body condition score, body weight, somatic cell count, and clinical mastitis in seasonally calving dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v.90, p.637–648, 2007.

BOHMANOVA, J.; MISZTAL, I.; COLE, J. B. Temperature - Humidity Indices as Indicators of Milk Production Losses due to Heat Stress. *J. Dairy Sci.*, v.90, p.1947–1956, 2007.

BOTARO, B.G.; CORTINHAS, C.S.; DIBBERN, A.G. et al. *Staphylococcus aureus* intramammary infection affects milk yield and SCC of dairy cows. *Trop. Anim. Health Prod.*, v.47, n.1, p.61-66, 2015.

BUTTCHEREIT, N.; STAMER, E.; JUNGE, W. et al. Evaluation of five lactation curve models fitted for fat:protein ratio of milk and daily energy balance. *J. Dairy Sci.*, v.93, n.4, p. 1702-1712, 2010.

COLDEBELLA, A.; MACHADO, P.F.; DEMÉTRIO, C.G.B. et al. Contagem de Células Somáticas e Produção de Leite em Vacas Holandesas Confinadas. *Rev. Bras. Zootec.*, v.33, n.3, p. 23-634, 2004.

DE PINHO MANZI M.; NÓBREGA D.B.; FACCIOLI P.Y. et al. Relationship between teat-end condition, udder cleanliness and bovine subclinical mastitis. *Res. Vet. Sci.*, v.93, n.1, p.430-434, 2012.

- DE VliegHER, S., BARKEMA, H. W.; STRYHN, H. Impact of early lactation somatic cell count in heifers on milk yield over the first lactation. *J. Dairy Sci.*, v.88, p.938–947, 2005.
- DOHOO, I. R.; LESLIE, K. E. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. *Prev. Vet. Med.*, v.10, p.225–237, 1991.
- FONSECA, I.; SILVA, P. V.; LANGE, C. C. et al. Expression profile of genes associated with mastitis in dairy cattle. *Genet. Mol. Biol.*, v.32, p.776–781, 2009.
- GALE, P.; DREW, T.; PHIPPS, L.P. et al. The effect of climate change on the occurrence and prevalence of livestock diseases in Great Britain: a review. *J. Appl. Microbiol.*, v.106, p.1409–1423, 2009.
- GANTNER, V.; MIJIĆ, P.; KUTEROVAC, K. et al. Temperature-humidity index values and their significance on the daily production of dairy cattle. Daily production of dairy cattle, *Mljekarstvo*, v.61, n.1, p.56–63, 2011.
- GREEN, M. J.; BRADLEY, A. J.; NEWTON, H. et al. Seasonal variation of bulk milk somatic cell counts in UK dairy herds: Investigations of the summer rise. *Prev. Vet. Med.* v.74, p.293–308, 2006.
- HAGNESTAM-NIELSEN, C.; EMANUELSON U.; BERGLUND, B. et al. Relationship between somatic cell count and milk yield in different stages of lactation. *J. Dairy Sci.*, v.92, p. 3124–3133, 2009.
- HAMMAMI, H.; BORMANN, J.; M’HAMDI, N. et al. Evaluation of heat stress effects on production traits and somatic cell score of Holsteins in a temperate environment. *J. Dairy Sci.*, v.96, p.1844–1855, 2013.
- HAND, K. J.; GODKIN, A.; KELTON, D. F. et al. Milk production and somatic cell counts: A cow-level analysis. *J. Dairy Sci.*, v.95, p.1358–1362, 2012.
- IDF. International IDF Standard 148A:1995: Milk – Enumeration of somatic cell. Brussels, 1995, 8 f.
- IDF. International IDF Standard 141C:2000: Whole milk – determination of milk fat, protein and lactose content. Guidance on the operation of mid-infrared instruments. *Brussels*, 2000, 15 f.
- KIBLER, H.H. Environmental physiology and shelter engineering. LXVII. Thermal effects of various temperature-humidity combinations on Holstein cattle as measured by eight physiological responses. *Res. Bull. Missouri Agric. Exp. Station*. 1964, p. 862.
- LAMBERTZ, C.; ANKER, S.; GAULY, M. et al. Climatic effects on milk production traits and somatic cell score in lactating Holstein-Friesian cows in different housing systems. *J. Dairy Sci.*, v.97, p.319–329, 2014.

- LANGONI H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras.*, v.33, p.620-626, 2013.
- LEES, N.M.; LIEVAART, J.J. Expert opinion on ranking risk factors for subclinical mastitis using a modified delphi technique. *N. Z. Vet. J.*, v.61, n.3, p. 168-173, 2013.
- LIEVAART, J.J.; BARKEMA, H.W.; KREMER, W.D.J. Effect of herd characteristics, management practices, and season on different categories of the herd somatic cell count. *J. Dairy Sci.*, v. 90, p. 4137–4144, 2007.
- LOPEZ-BENAVIDES, M.G.; WILLIAMSON, J.H.; CURSONS, R.T. Associations between *Streptococcus uberis* populations on farm races and climatic changes during a twelve-month period. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.*, v.65, p. 153-156, 2005.
- MALEK DOS REIS, C.B.; BARREIRO, J. R.; MORENO, J. F. G. et al. Evaluation of somatic cell count thresholds to detect subclinical mastitis in Gyr cows. *J. Dairy Sci.*, v.94, n.9, p.4406-4412, 2011.
- MEHRZAD, J.; DUCHATEAU, L.; PYÖRÄLÄ, S. et al. Blood and milk neutrophil chemiluminescence and viability in primiparous and pluriparous dairy cows during late pregnancy, around parturition and early lactation. *J. Dairy Sci.*, v.85, p. 3268-3276, 2002.
- MOYES, K.M.; DRACKLEY, J.K.; SALAK-JOHNSON, J.L. et al. Dietary-induced negative energy balance has minimal effects on innate immunity during a *Streptococcus uberis* mastitis challenge in dairy cows during midlactation. *J. Dairy Sci.*, v.92, n.9, p.4301-16, 2009.
- NYMAN, A.-K.; EMANUELSON, U.; HOLTENIUS, K. et al. Metabolites and immune variables associated with somatic cell counts of primiparous dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.91, p.2996–3009, 2008.
- OLDE RIEKERINK, R.G.; BARKEMA, H.W.; STRYHN, H. et al. The effect of season on somatic cell count and the incidence of clinical mastitis. *J. Dairy Sci.*, v.90, n.4, p.1704-1715, 2007.
- OLIVER S. P.; GONZÁLEZ, R. N.; HOGAN, J. S.; JAYARAO, B. M.; OWENS, W. E. 2004. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality. Verona: National Mastitis Council.
- OSTERÅS, O.; SØLVERØD, L.; REKSEN, O. Milk culture results in a large Norwegian survey--effects of season, parity, days in milk, resistance, and clustering. *J. Dairy Sci.*, v.89, n.3, p.1010-1023, 2006.
- RENAUDEAU, D.; COLLIN, A.; YAHAV, S. et al. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. *Anim.*, v.6, p.707–728, 2012.
- REZAMAND, P., HOAGLAND, T. A.; MOYES, K. M. et al. Energy status, lipid-soluble vitamins, and acute phase proteins in periparturient Holstein and Jersey dairy cows with or without subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.*, v.90, p. 5097–5107, 2007.

SCHUKKEN, Y.H.; WILSON, D.J.; WELCOME, F. et al. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet. Res.*, v.34, p.579-596, 2003.

SCHREINER, D. A.; RUEGG, P. L. Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.*, v.86, p.3460–3465, 2003.

SYRIDION, D.; LAYEK, S.S.; BEHERA, K. et al. Effects of parity, season, stage of lactation, and milk yield on milk somatic cell count, pH and electrical conductivity in crossbred cows reared under subtropical climatic conditions. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, v.67, n.4, p.362-365, 2012.

SOUZA, R.; SANTOS, G. T.; VALLOTO, A. A. et al. Produção e qualidade do leite de vacas da raça Holandesa em função da estação do ano e ordem de parto. *Vet. Bras. Saúde Prod. Anim.*, v.11, n.2, p 484-495, 2010.

TAO, S.; BUBOLZ, J. W.; DO AMARAL, B. C. et al. Effect of heat stress during the dry period on mammary gland development. *J. Dairy Sci.*, v.94, p.5976–5986, 2011.

TOMAZI, T.; GONÇALVES, J. L.; BARREIRO, J. R. et al. Bovine subclinical intramammary infection caused by coagulase-negative Staphylococci increases somatic cell count but has no effect on milk yield or composition. *J. Dairy Sci.*, v.98, p.3071–3078, 2015.

TONI, F.; VINCENTI, F L.; GRIGOLETTO, L. et al. Early lactation ratio of fat and protein percentage in milk is associated with health, milk production, and survival. *J. Dairy Sci.*, 94: 1772–1783, 2011.

VAN STRATEN, M.; FRIGER, M.; SHPIGEL, N.Y. Events of elevated somatic cell counts in high-producing dairy cows are associated with daily body weight loss in early lactation. *J. Dairy Sci.*, v.92, n.9, p.4386-94, 2009.

WEST, J.W. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v.86, n.6, p. 2131–2144, 2003.

ZHANG, Z.; LI, X. P.; YANG, F. et al. Influences of season, parity, lactation, udder area, milk yield, and clinical symptoms on intramammary infection in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.99, p.6484–6493, 2016.

CAPÍTULO 2

DADOS CLIMÁTICOS E ZOOTÉCNICOS ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA E À ETIOLOGIA DA MASTITE EM VACAS ½ HOLANDÊS-ZEBU

RESUMO

Este estudo identificou as variáveis zootécnicas e climáticas associadas à detecção de patógenos causadores de mastite e à alta celularidade no leite ($CCS > 200.000$ células mL^{-1}) de vacas mestiças $\frac{1}{2}$ Holandês - Zebu. No período de abril de 2013 a julho de 2014 foram coletadas, mensalmente, 1240 amostras de leite para realização da análise de composição centesimal (gordura e proteína) e de contagem de células somáticas (CCS), e bimestralmente, 610 amostras compostas de leite dos quartos mamários das vacas em lactação para isolamento e identificação dos patógenos causadores de mastite subclínica. Os dados climáticos, temperatura mínima, máxima e média, precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar foram registrados mensalmente. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando modelo multivariado de regressão logística. O modelo de regressão logística apresentou como explicativas as seguintes variáveis ($P \leq 0,05$): ordem de parto, relação gordura e proteína (G/P), nitrogênio ureico, produção de leite, precipitação pluviométrica, temperatura máxima e umidade relativa do ar obtidas em cada mês de coleta associadas à alta contagem de células somáticas (> 200.000 células mL^{-1}). As variáveis ordem de parto, temperatura máxima, temperatura mínima, umidade relativa do ar e índice de temperatura e umidade (ITU) do mês foram associadas à presença de patógenos causadores de mastite. O resultado deste estudo demonstrou que as variáveis ordem de parto, relação gordura e proteína, temperatura máxima e umidade relativa do ar do mês da coleta são fatores de risco em relação à alta CCS, e as variáveis nitrogênio ureico, produção de leite e precipitação do mês da coleta são fatores de proteção. Em relação à presença de patógenos, o modelo demonstrou que a ordem de parto, temperatura máxima, umidade relativa do ar e ITU do mês da coleta são considerados fatores de risco e a temperatura mínima, fator protetor.

Palavras-chave: infecção intramamária, vaca mestiça, clima, índice temperatura-umidade, patógeno, contagem de células somáticas

ABSTRACT

This study identified the zootechnical and climatic variables associated with the presence of pathogens causing mastitis and with high cellularity in the milk of crossbred ½ Holstein- Zebu. In the period from April 2013 to July 2014, 1240 milk samples were collected monthly for milk composition analysis (fat and protein) and somatic cell count (SCC), and bimonthly 610 samples composed dairy cows for isolation and identification of pathogens causing subclinical mastitis. The climatic data, minimum, maximum and average temperature, rainfall and relative humidity were recorded monthly. Statistical analysis of the data was performed using a logistic regression model. The logistic regression model presented the following variables ($P \leq 0.05$): parity, fat and protein (G/P) ratio, urea nitrogen, milk production, rainfall, maximum temperature and relative humidity obtained monthly that was associated with high SCCs ($> 200,000 \text{ mL}^{-1}$ cells). The variables parity, maximum temperature, minimum temperature, relative humidity and temperature and humidity index (THI) were associated with the presence of pathogens causing mastitis. The results of this study showed that the variables parity, fat and protein ratio, maximum temperature and relative humidity are risk factors in relation to high SCC, and the variables urea nitrogen, milk production and precipitation as protective factors. Regarding the presence of pathogens, the model showed that the parity, maximum temperature, relative humidity and THI of the month of collection are considered risk factors and the minimum temperature, protective factor.

Keywords: Intramammary infection, crossbreed cows, climate, temperature-humidity index, pathogen, somatic cell count

1. INTRODUÇÃO

A produção leiteira é afetada por diversos fatores relacionados ao manejo e às doenças, sendo a mastite, a enfermidade mais prevalente e a principal causa de prejuízos nos rebanhos leiteiros (Huijps et al., 2008). É uma doença multifatorial, geralmente de natureza infecciosa, podendo ser causada por diferentes microrganismos. Sua ocorrência é determinada pelas interrelações entre hospedeiro, ambiente e agente infeccioso.

O Brasil é um país localizado na região tropical e o rebanho é composto predominantemente por animais mestiços, híbridos de raças europeias (*Bos taurus taurus*) e zebuínas (*Bos taurus indicus*), sujeitos a alta temperatura do ambiente (Ta), umidade relativa do ar (UR) e à radiação solar por extensos períodos (Fonseca et al., 2009).

A vaca 1/2 Holandês – Zebu (HZ) é o produto do cruzamento de animais da raça holandesa com raças zebuínas. Nesses cruzamentos, obtêm-se animais com as características de rusticidade e adaptação aos trópicos oriundas da fração zebuína, e as boas características de produção leiteira da fração holandesa, sendo que o maior diferencial desse genótipo é o 100% de grau de heterose (Chanvijit et al., 2005; Fraga et al., 2016).

Na literatura, há vários trabalhos que demonstram a influência do clima sobre a CCS e o isolamento de agentes etiológicos da mastite bovina de amostras de leite assepticamente coletadas (Green et al., 2006; Hammani et al., 2013; Lambertz et al., 2014). Porém, a maioria das publicações é feita avaliando raças puras especializadas de bovinos leiteiros. Até o momento, estudos que relatam o efeito dos dados climáticos sobre a CCS e sobre a presença de patógenos em rebanho de vacas mestiças ½ HZ são escassos ou inexistentes.

Portanto, o objetivo deste estudo foi identificar variáveis zootécnicas e climáticas associadas com a presença dos patógenos causadores de mastite e com a alta celularidade no leite de vacas mestiças ½ HZ.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no período de abril de 2013 a julho de 2014 (16 meses) em um rebanho constituído por vacas ½ HZ localizado no município de Prudente de Moraes em Minas Gerais. O sistema de produção, objeto deste estudo, foi o mesmo avaliado no capítulo 1. No entanto, nesse capítulo o período de tempo foi menor e englobou a variável nitrogênio ureico no leite, que não foi analisada nos meses anteriores.

Foram avaliadas vacas ½ HZ em diferentes estágios da lactação. As vacas eram ordenhadas duas vezes ao dia, com a presença do bezerro ao pé, em equipamento mecânico duplo seis/seis, sem mecanismo de extração automática de teteiras.

Por se tratar de um estudo longitudinal, ocorreu, ao longo do período, uma variação mensal no número dos animais em lactação, sendo avaliadas no total 149 vacas. Durante o período de estudo, coletaram-se 1.240 amostras compostas de leite das vacas em lactação para realização da análise de qualidade composicional do leite (gordura e proteína) e de contagem de células somáticas (CCS), e 610 amostras para realização do isolamento e identificação dos patógenos causadores da mastite subclínica.

Os dados meteorológicos temperatura mínima, máxima e média, precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar (Figura 1 e 2) foram obtidos mensalmente na Estação Meteorológica, localizada no município de Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil, latitude 19°29'07'', longitude 44°10'27'', altitude 732 m, pertencente ao Instituto Nacional de Meteorologia.

Valores de ITU mensais foram determinados utilizando a equação, $ITU = 1,8 \times Ta - (1 - UR) \times (Ta - 14,3) + 32$, tal como descrito por Kibler (1964), em que Ta é a temperatura média do ambiente em °C e UR é a umidade relativa do ar média como uma fração da unidade.

A coleta de amostras para realização da análise de qualidade composicional do leite (gordura e proteína) e de CCS, foi realizada mensalmente, no dia da pesagem do leite, após os procedimentos diários da ordenha. As amostras compostas de leite foram obtidas diretamente de medidores de leite acoplados ao equipamento de ordenha e acondicionadas em frascos contendo bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol). Imediatamente após a coleta, as amostras foram acondicionadas em caixas térmicas contendo gelo reciclável e transportadas para o laboratório para realização das análises laboratoriais.

As amostras de leite foram analisadas quanto aos teores de gordura, proteína, nitrogênio ureico e contagem de células somáticas no equipamento eletrônico CombiScope FTIR 400® (Delta Instruments; Drachten, Holanda) que combina o princípio de Transformada de Fourier no infravermelho médio e citometria de fluxo, respectivamente. As análises para determinação da composição do leite foram realizadas segundo IDF (2000) e a contagem de células somáticas segundo IDF (1995).

A produção de leite foi avaliada, mensalmente, durante as ordenhas da manhã e da tarde, sendo mensurada por meio de medidores de leite acoplados ao equipamento de ordenha, possibilitando, assim, a avaliação da produção diária individual dos animais.

Para isolamento e identificação dos patógenos causadores da mastite subclínica foram coletadas bimestralmente amostras compostas dos quartos mamários das vacas em lactação. Antes da coleta das amostras, foi realizado o descarte dos três primeiros jatos, com posterior desinfecção dos tetos com solução pré-dipping. No momento da coleta, foi realizada antisepsia do esfíncter do teto, utilizando-se algodão umedecido em álcool a 70%. Os jatos foram retirados de cada teto individualmente, formando amostras compostas de aproximadamente 50 mL, cada uma, que foram acondicionadas em frascos estéreis, congeladas a -20°C e enviadas ao laboratório.

Os agentes causadores da mastite foram identificados semeando-se 0,01mL de cada amostra de leite, com alça calibrada descartável, em cada quadrante de uma placa de ágar-sangue preparado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro. As placas foram incubadas a 37°C por 24 a 48 horas, seguido de observação da morfologia das colônias, testes de coloração de Gram e de identificação dos patógenos (Oliver et al., 2004).

Os dados de dias em lactação das vacas (DEL) e ordem de parto foram registrados no *software* zootécnico da propriedade (PRODAP Professional GP, Belo Horizonte, Brasil). Também foi estabelecida a proporção do percentual de gordura em relação ao de proteína com o objetivo de avaliar o equilíbrio energético dos animais (Buttchereit et al., 2010).

Para análise estatística, as vacas foram divididas em animais com alta e baixa celularidade do

leite conforme valor de corte amplamente utilizado para CCS em vacas sadias de ≤ 200.000 células mL^{-1} (Dohoo e Leslie, 1991; Schukken et al., 2003).

A análise estatística dos dados foi realizada com *software* estatístico STATA versão 12 (Stata Corp. College Station, Texas, EUA), utilizando o modelo de regressão logística. As variáveis foram primeiramente analisadas individualmente, e em seguida, em combinação para avaliar o efeito das variáveis sobre todas as outras. Na primeira fase da análise, foram feitos dois modelos logísticos, sendo um para cada uma das variáveis relacionadas com os resultados de CCS e outro para relacionar as variáveis com a presença ou ausência de patógenos. As variáveis com $P \leq 0,20$ foram consideradas e utilizadas na próxima fase da análise. As variáveis selecionadas na primeira etapa foram usadas para desenvolver dois modelos de logística multivariada em que as variáveis com $P \leq 0,05$ foram mantidas nos modelos finais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das amostras de leite analisadas ($n = 1.240$), 422 amostras (34,03%) apresentaram CCS > 200.000 células mL^{-1} , sendo, portanto, provenientes de vacas com mastite subclínica. A presença de um ou mais patógenos foi identificada em 49,51% das amostras submetidas a análise microbiológica.

Das 610 amostras analisadas quanto à presença de patógenos, não houve crescimento de microrganismos em 308 amostras (50,49%). Os agentes causadores de mastite mais frequentes foram o *Corynebacterium* sp., *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativo, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1. Frequência de patógenos isolados nas amostras analisadas com as respectivas médias e amplitudes de log CCS (células/ml)

Patógenos identificados (SPA)	Nº amostras	Porcentagem %	CCS (log células/mL) média e amplitude
<i>Corynebacterium</i> sp.	110	18,03	4,84 (3,00 - 6,27)
<i>Staphylococcus aureus</i>	71	11,64	5,39 (3,00 - 6,45)
<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase negativo	59	9,67	5,01 (3,00 - 6,27)
<i>Streptococcus uberis</i>	10	1,64	5,78 (3,00 - 6,27)
<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Corynebacterium</i> sp.	9	1,48	5,04 (3,00 - 6,38)
<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase positivo	8	1,31	5,48 (4,67 - 5,15)
<i>Streptococcus</i> sp.	8	1,31	5,6 (4,74 - 6,20)
<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus</i> sp. coagulase negativo	5	0,82	5,27 (5,01 - 6,18)
<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase negativo e <i>Corynebacterium</i> sp.	4	0,66	5,15 (4,64 - 5,29)
<i>Staphylococcus</i> sp. coagulase negativo e <i>Staphylococcus</i> sp. coagulase positivo	3	0,49	5,43 (5,31 - 5,49)
<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus</i> sp.	2	0,33	5,97 (5,31 - 6,25)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2	0,33	5,44 (4,68 - 6,20)
<i>Streptococcus</i> sp. e <i>Staphylococcus</i> sp. coagulase negativo	2	0,33	5,17 (4,88 - 5,47)
<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus equinus</i>	1	0,16	5,62
<i>Pseudomonas</i> sp.	1	0,16	3,00
<i>Streptococcus equinus</i> / <i>Corynebacterium</i> sp.	1	0,16	5,26
<i>Streptococcus equinus</i> / <i>Enterococcus</i> sp.	1	0,16	5,81
<i>Streptococcus</i> sp. / <i>Staphylococcus</i> sp. coagulase positivo	1	0,16	6,70
<i>Streptococcus uberis</i> / <i>Staphylococcus</i> sp. coagulase positivo	1	0,16	5,34
Não houve crescimento	302	49,52	
Amostras contaminadas	9	1,48	
Total	610		

As figuras 1 e 2 demonstram a variação dos dados climáticos em relação à CCS durante os 16 meses avaliados no sistema de produção de vacas ½ HZ.

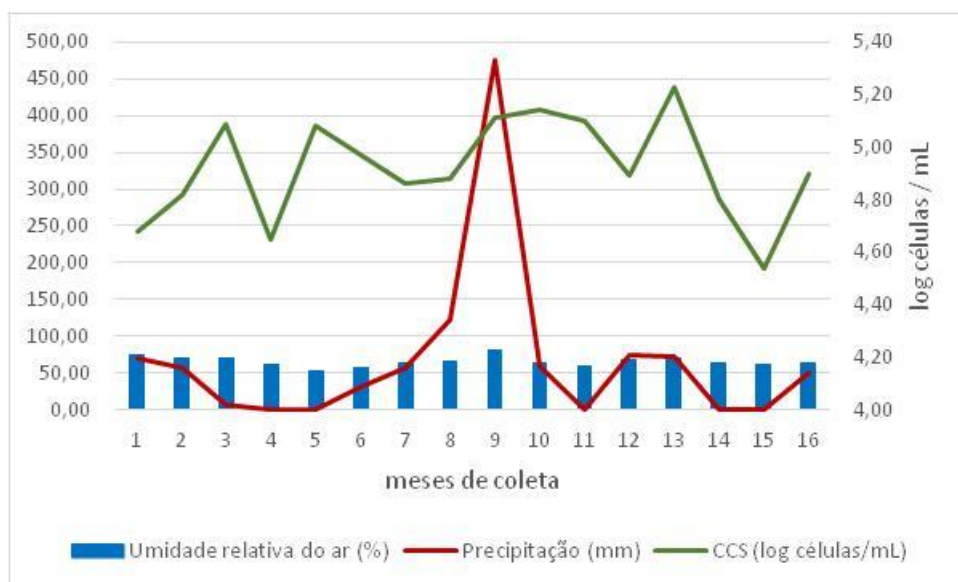


Figura 1 – Dados climáticos (umidade relativa do ar (%) e precipitação (mm)) e média mensal log CCS (células/mL) referente ao período de julho de 2013 a julho de 2014.

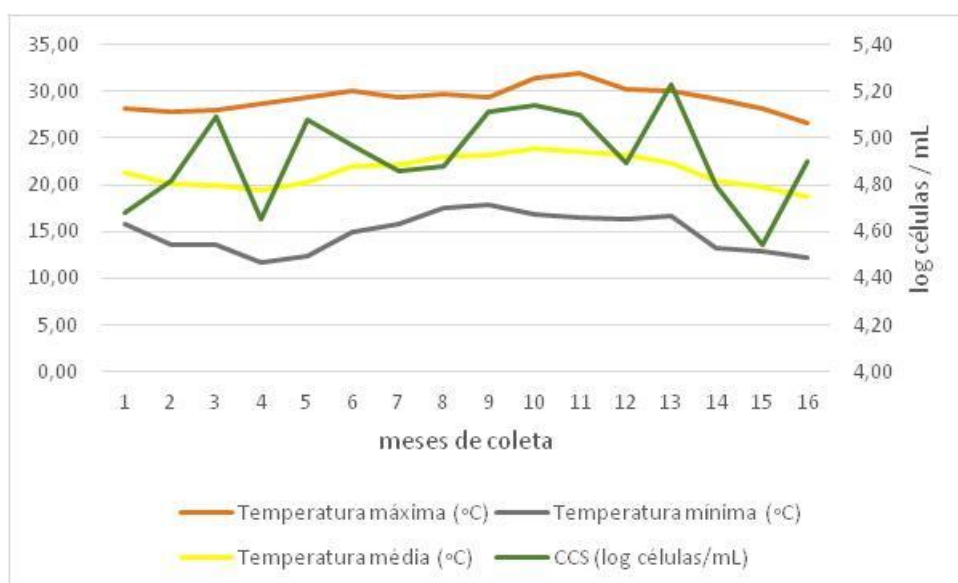


Figura 2 - Média log CCS (células/mL) das amostras de leite de vacas ½ HZ e média das variáveis climáticas (temperatura mínima, média e máxima (°C) referentes a cada mês de coleta.

Um modelo multivariado de regressão logística foi ajustado, tendo como explicativas as variáveis ($P \leq 0,05$): ordem de parto, relação gordura e proteína (G/P), nitrogênio ureico, produção de leite, precipitação, temperatura máxima e umidade relativa obtida em cada mês de coleta associadas à alta contagem de células somáticas (> 200.000 células mL^{-1}) (Tabela 2).

No segundo modelo, as variáveis ordem de parto, temperatura máxima, temperatura mínima, umidade relativa e ITU do mês (Tabela 3) foram associadas aos patógenos causadores de mastite.

Tabela 2. Modelo multivariado de regressão logística ($P \leq 0,05$) de variáveis associadas à alta contagem de células somáticas (> 200.000 células mL^{-1}) em vacas $\frac{1}{2}$ HZ

Variáveis	Odds Ratio	P valor	95% de intervalo de confiança
Ordem de parto	1,19	$\leq 0,001$	1,13 - 1,25
Razão Gordura/Proteína	4,57	$\leq 0,001$	2,87 - 7,27
Nitrogênio ureico	0,96	0,006	0,93 - 0,99
Produção de leite	0,90	$\leq 0,001$	0,86 - 0,93
Precipitação	0,99	0,010	0,99 - 1,00
Temperatura máxima (mês)	1,31	$\leq 0,001$	1,18 - 1,46
Umidade relativa (mês)	1676,38	$\leq 0,001$	61,78 - 45485,07

Tabela 3. Modelo multivariado de regressão logística ($P \leq 0,05$) das variáveis associadas a patógenos causadores de mastite em vacas $\frac{1}{2}$ HZ.

Variáveis	Odds Ratio	P valor	95% de intervalo de confiança
Ordem de parto	1,13	0,001	1,05 - 1,20
Temperatura máxima (mês)	1,03	0,03	1,00 - 1,05
Temperatura mínima (mês)	0,49	$\leq 0,001$	0,34 - 0,72
Umidade relativa (mês)	563,72	0,002	10,82 - 29361,97
ITU (mês)	1,65	$\leq 0,001$	1,28 - 2,12

O resultado desse estudo corrobora com o de outros autores que demonstraram que a idade, traduzida em número de partos, é um fator que altera o conteúdo celular do leite, aumentando a CCS e a frequência de identificação de patógenos causadores de mastite (Hagnestam-Nielsen et al., 2009; Van Straten et al., 2009; Souza et al., 2010; Madouasse et al., 2012; Syridion et al., 2012; Taponen et al., 2017).

Vacas múltiparas são consideradas mais vulneráveis à ocorrência da mastite do que primíparas, pois sofrem danos permanentes à glândula mamária em decorrência das infecções prévias, pela tendência a cronicidade da doença, e também devido às alterações do teto com o aumento da ordem de parto (Coldebella et al., 2004; Olde Riekerink et al., 2007; Hagnestam-Nielsen et al., 2009; Taponen et al., 2017).

Outra explicação para o aumento da CCS e identificação de patógenos em vacas múltiparas deve-se à efetividade da resposta imune desses animais em comparação com os animais jovens. A ineficiência bactericida dos leucócitos polimorfonucleares durante a fase inicial de invasão bacteriana aumenta a susceptibilidade das vacas pluríparas à mastite. Possivelmente os neutrófilos podem ser mais funcionais em vacas primíparas do que em vacas múltiparas (Burvenich et al., 1994).

A proporção de G/P é um parâmetro que pode indicar distúrbios metabólicos como o balanço energético negativo (BEN) (Moyes et al., 2009; Buttchereit et al., 2010). A variável proporção gordura e proteína (G/P) nesse estudo foi considerada fator de risco em relação à alta CCS (Tabela 2) e presença de patógenos causadores de mastite (Tabela 3). Após o parto, há uma assincronia entre a demanda e a disponibilidade de nutrientes e por isso, as vacas passam por um período de balanço energético negativo (Burvenich et al., 2007). Esse fenômeno fisiológico acomete principalmente vacas leiteiras de alta produção (Van Straten et al., 2009), e também pode afetar as vacas mestiças.

O resultado desse estudo corrobora com dados da literatura que demonstram que vacas no período de transição e em BEN apresentam aumento da CCS, maior ocorrência e agravamento dos casos de mastite (Jánosi et al., 2003; Nyman et al., 2008; Moyes et al., 2009; Van Straten et al., 2009).

Têm sido publicados relativamente poucos estudos sobre a relação entre o BEN e a saúde do úbere. A maioria das publicações apresenta dados obtidos a partir de rebanhos com vacas de raças especializadas (Holandês) e aborda a relação entre BEN e ocorrência da mastite clínica (Kremer et al., 1993; Jánosi et al., 2003; Berry et al., 2007; Toni et al., 2011). Além disso, existem poucos estudos abrangendo a relação entre o BEN e a CCS (Rezamand et al., 2007; Nyman et al., 2008).

O resultado deste estudo demonstra que vacas mestiças, mesmo não sendo especializadas para produção de leite, podem apresentar BEN e conseqüentemente, aumento na relação G/P.

Outra possível explicação para a variável G/P apresentar-se como fator de risco é o efeito de concentração dos componentes do leite (gordura) em vacas com mastite devido à redução na produção do leite em decorrência da doença.

Nesse estudo, variáveis climáticas como temperatura máxima e umidade relativa (Tabela 2) foram consideradas fatores de risco para alta CCS. Em relação à presença de patógenos, índice de temperatura e umidade (ITU), temperatura máxima e umidade relativa foram considerados fatores de risco (Tabela 3).

As variações climáticas causam grande impacto na produção animal em todo o mundo. Nas regiões onde ocorre elevada temperatura, alta umidade do ar e radiação solar, as vacas leiteiras estão mais predispostas a sofrer estresse pelo calor. A associação entre esses fatores climáticos provoca alterações fisiológicas e metabólicas que acabam reduzindo a produção de leite, comprometem a reprodução, a função imune e a lucratividade da atividade (Mader et al., 2010; Boonkum et al., 2011).

O resultado desse estudo corrobora com os inúmeros trabalhos que demonstram que altas temperaturas associadas à elevada umidade favorecem o crescimento e a proliferação dos agentes infecciosos causadores de mastite, o que pode culminar em maior desafio e ocorrência da mastite no rebanho, com conseqüente aumento da CCS (Kremer et al., 1993; Lopez-Benavides et al., 2005; Green et al., 2006; Olde Riekerink et al., 2007; Tao et al., 2011; Archer et al., 2013). Paape et al. (1973). No entanto, ao avaliarem vacas holandesas em condições de estresse térmico, demonstrou-se que em condições de altas temperaturas, não houve aumento da CCS do leite.

Por outro lado, nesse estudo a temperatura mínima mensal foi considerada fator de proteção, pois o aumento da temperatura mínima pode levar o aumento da insolação e redução da umidade relativa do ar, o que pode contribuir para diminuir a multiplicação dos patógenos.

A incidência da mastite em rebanhos leiteiros pode ser influenciada por fatores ambientais e climatológicos, como o índice pluviométrico, que muitas vezes apresenta padrão sazonal (Olde Riekerink et al., 2007). Na região onde a propriedade avaliada está localizada, o período de chuvas começa no final de setembro e início de outubro, atinge maior volume de chuva entre o final de novembro e final de fevereiro e decai, entre março e abril.

O resultado desse estudo, ao apresentar a precipitação pluviométrica como fator de proteção, difere da maioria dos trabalhos realizados em vacas especializadas que evidencia que no período do verão, em que há maior índice de precipitação pluviométrica e altas temperaturas, há aumento da frequência dos casos de mastite subclínica, comparado ao período de inverno (Green et al., 2006; Olde Riekerink et al., 2007; Archer et al., 2013). Uma explicação possível para este resultado é a ocorrência da baixa precipitação associada à alta umidade do ar e temperatura conforme demonstrado na figura 1. Essa situação de alta temperatura e alta umidade relativa do ar, mas com baixa precipitação pode minimizar a proliferação dos patógenos causadores de mastite.

O índice de temperatura e umidade (ITU) é um indicador utilizado mundialmente que auxilia na indicação de desconforto térmico a que os animais estão submetidos (Bohmanova et al., 2007; Vitali et al., 2009; Tao et al., 2011).

Valores desse índice que indicam conforto térmico variam entre diversos autores, mas há consenso em considerar que um ambiente de conforto adequado para as vacas de alta produção não deve ser superior a 72, que corresponde a 22°C a 100% de umidade (Martello et al., 2004).

Na literatura, no entanto, há poucas informações a respeito dos níveis críticos desse índice para vacas mestiças. A maioria dos estudos foi realizado em países de clima temperado e em rebanhos especializados (Bouraoui et al., 2002; Bohmanova et al., 2007; Gantner et al., 2011), mas poucos trabalhos foram feitos em regiões tropicais avaliando o limiar do indicador ITU em rebanhos mestiços envolvendo cruzamento com bovinos *Bos taurus indicus* (Azevedo et al., 2005; Boonkum et al., 2011).

De acordo com Hammami et al. (2013), o aumento da CCS em vacas submetidas ao estresse térmico, ITU em nível crítico, deve-se ao calor e umidade que elevam a carga de patógenos nas instalações e ambiente e/ou à depressão do sistema imune das vacas, por estresse oxidativo.

As variáveis produção de leite e nitrogênio ureico (NUL) foram consideradas nesse estudo fatores de proteção em relação à CCS (Tabela 1). Trabalhos científicos demonstraram que à medida que a CCS reduz, a produção de leite aumenta, em razão da menor incidência de lesões nos tecidos do úbere (Pereira et al., 2001; Coldebella et al., 2004; Hand et al., 2012).

A associação entre a CCS e o teor de nitrogênio ureico no leite pode ser proveniente da relação entre a nutrição e a resposta imune das vacas em lactação (Meyer et al., 2006). O resultado desse estudo indicou o NUL como fator de proteção em relação à CCS.

O teor de nitrogênio ureico no leite tem sido utilizado como ferramenta para avaliar a eficiência

da utilização das dietas das vacas leiteiras (Jonker et al., 1999; Godden et al., 2001; Jonker et al., 2002), por apresentar alta correlação com a concentração de nitrogênio uréico no plasma (NUP) ou no sangue (NUS) (Roseler et al., 1993; Lucci et al., 2006).

Poucos trabalhos científicos foram realizados abordando a relação entre a CCS e nitrogênio ureico no leite (NUL). Concordando com o resultado desse estudo, Arunvipas et al. (2002) observaram que, a cada aumento de uma unidade no escore linear de CCS, a concentração de NUL diminui em 0,4 mg/dL. Meyer et al. (2006) demonstraram que as concentrações de NUL diminuem em 0,29 mg/dL ao aumento de uma unidade de CCS. Park et al. (2007) demonstraram que à medida que aumenta a CCS, diminui o teor do NUL.

Diferentemente do resultado encontrado nesse estudo, Eicher et al. (1999) não observaram influência da CCS sobre as concentrações NUL.

4. CONCLUSÃO

As variáveis ordem de parto, relação gordura e proteína, temperatura máxima e umidade relativa do mês da coleta foram significativamente associadas à alta CCS e, portanto, relacionadas à mastite subclínica em vacas $\frac{1}{2}$ HZ. Em relação à presença de patógenos, as variáveis ordem de parto, temperatura máxima, umidade relativa e ITU do mês da coleta foram consideradas fatores de risco.

Para subsidiar a elaboração de programas de prevenção e controle da mastite, é importante conhecer os fatores de risco e de proteção associados à esta doença, para determinar os momentos em que medidas de controle e prevenção da mastite bovina devem ser cuidadosamente monitoradas, especialmente ao considerar a alta prevalência de patógenos contagiosos na etiologia da mastite bovina no rebanho.

5. AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (CVZ APQ 03680/10), à Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG, ao Laboratório de Análise da Qualidade do Leite – LabUFMG e ao Laboratório de Microbiologia da Embrapa Gado de Leite.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARCHER S.C.; COY, M.C.; WAPENAAR, F. et al. Association of season and herd size with somatic cell count for cows in Irish, English, and Welsh dairy herds. *Vet. J.*, v.196, n.3, p.515-21, 2013.
- ARUNVIPAS, P.; DOHOO, I.; VANLEEUEWEN, J. et al. The effect of non-nutritional factor on milk urea nitrogen level in Ayrshire dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.85, n.1, p.320-328, 2002.
- AZEVEDO, M.; PIRES, M. F. A.; SATURNINO, H. M. et al. Estimativa de níveis críticos superiores do índice de temperatura e umidade para vacas leiteiras 1/2, 3/4, 7/8 Holandês-Zebu em lactação. *Rev. Bras. Zootec.*, v.34, n.6, p.2000-2008, 2005.
- BERRY, D. P.; LEE, J. M.; MACDONALD, K. A. et al. Associations among body condition score, body weight, somatic cell count, and clinical mastitis in seasonally calving dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v.90, p.637-648, 2007.
- BOHMANOVA, J.; MISZTAL, I.; COLE, J. B. Temperature-Humidity Indices as Indicators of Milk Production Losses due to Heat Stress. *J. Dairy Sci.*, v.90, p.1947-1956, 2007.
- BOONKUM, W.; MISZTAL, I.; DUANGJINDA, M. et al. Genetic effects on heat stress on milk yield of Thai Holstein crossbreds. *J. Dairy Sci.*, v.94, p.487-492, 2011.
- BOURAOUI, R.; LAHMAR, M.; MAJDOUB, A. et al. The relationship of temperature-humidity index with milk production of dairy cows in a Mediterranean climate. *Anim. Res.*, v.51, p.479-491, 2002.
- BURVENICH, C.; PAAPE, M.J.; HILL, A.W. et al. Role of the neutrophil leucocyte in the local and systemic reactions during experimentally induced *E. coli* mastitis in cows immediately after calving. *Vet. Quart.*, v.16, n.1, p. 45-50, 1994.
- BURVENICH, C.; BANNERMAN, D. D.; LIPPOLIS, J. D. et al. Cumulative physiological events influence the inflammatory response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period. *J. Dairy Sci.*, v.90 (E Suppl.): E39-E54, 2007.
- BUTTCHEREIT, N.; STAMER, E.; JUNGE, W. et al. Evaluation of five lactation curve models fitted for fat:Protein ratio of milk and daily energy balance. *J. Dairy Sci.*, v.93, n.4, p. 1702-1712, 2010.
- CHANVIJIT, K.; DUANGJINDA, M.; PATTARAJINDA, V. et al. Model comparison for genetic evaluation of Milk yield in crossbred Holsteins in the tropics. *J. Appl. Genet.*, v.46, n.4, p.387-393, 2005.
- COLDEBELLA, A.; MACHADO, P.F.; DEMÉTRIO, C.G.B. et al. Contagem de Células Somáticas e Produção de Leite em Vacas Holandesas Confinadas. *Rev. Bras. Zootec.*, v.33, n.3, p.23-634, 2004.

DOHOO, I. R.; LESLIE, K. E. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. *Prev. Vet. Med.*, v.10, p.225–237, 1991.

EICHER, R.; BOUCHARD, E.; BIGRAS-POULINB, M. Factors affecting milk urea nitrogen and protein concentrations in Quebec dairy cows. *Prev. Vet. Med.*, v.39, p.53–63, 1999.

FONSECA, I.; SILVA, P. V.; LANGE, C. C. et al. Expression profile of genes associated with mastitis in dairy cattle. *Genet. Mol. Biol.*, v.32, p.776–781, 2009.

FRAGA, A.B.; SILVA, F.L.; HONGYU, K. et al. Multivariate analysis to evaluate genetic groups and production traits of crossbred Holstein × Zebu cows. *Trop. Anim. Health Prod.*, v.48, n.3, p.533–538, 2016.

GANTNER, V.; MIJÍĆ, P.; KUTEROVAC, K. et al. Temperature-humidity index values and their significance on the daily production of dairy cattle. *Mljekarstvo.*, v.61, n. 1, p.56–63, 2011.

GODDEN, S. M.; LISSEMORE, K. D.; KELTON, D. F. et al. Factors associated with milk urea concentrations in Ontario dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.84, n.1, p.107–114, 2001.

GREEN, M. J.; BRADLEY, A. J.; NEWTON, H. et al. Seasonal variation of bulk milk somatic cell counts in UK dairy herds: Investigations of the summer rise. *Prev. Vet. Med.*, v.74, p.293–308, 2006.

HAMMAMI, H.; BORMANN, J.; M'HAMDI, N. et al. Evaluation of heat stress effects on production traits and somatic cell score of Holsteins in a temperate environment. *J. Dairy Sci.*, v.96, p.1844–1855, 2013.

HAND, K. J.; GODKIN, A.; KELTON, D. F. Milk production and somatic cell counts: A cow-level analysis. *J. Dairy Sci.*, v.95, p.1358–1362, 2012.

HAGNESTAM-NIELSEN, C.; EMANUELSON U.; BERGLUND, B. et al. Relationship between somatic cell count and milk yield in different stages of lactation. *J. Dairy Sci.*, v.92, p.3124–3133, 2009.

HUIJPS, K.; LAM, T.J.; HOGVEEN, H. Costs of mastitis: facts and perception. *J. Dairy Res.*, v.75, n.1, p.113–120, 2008.

IDF. International IDF standard 148A:1995: Milk – Enumeration of somatic cell. Brussels, 1995, 8 f.

IDF. International IDF standard 141C:2000: Whole milk – determination of milk fat, protein and lactose content. Guidance on the operation of mid-infrared instruments. Brussels, 2000, 15 f.

JANOSI, S.; KULCASAR, M.; KORODI, P. et al. Energy imbalance related predisposition to mastitis in group-fed high-producing postpartum dairy cows. *Acta Vet. Hung.*, v.51, p.409–424, 2003.

JONKER, J. S.; KOHN, R. A.; ERDMAN, R. A. Milk urea nitrogen target concentrations for lactating dairy cows fed according to National Research Council recommendations. *J. Dairy Sci.*, v.82, p.1261–1273, 1999.

JONKER, J. S.; KOHN, R. A.; HIGH, J. Dairy herd management practices that impact nitrogen utilization efficiency. *J. Dairy Sci.*, v.85, p.1218–1226, 2002.

KIBLER H.H., Environmental physiology and shelter engineering. LXVII. Thermal effects of various temperature-humidity combinations on Holstein cattle as measured by eight physiological responses, Res. Bull. Missouri Agric. Exp. Station. 1964, p. 862.

KREMER, W. D. J.; NOORDHUIZEN-STASSEN, E. N.; GROMMERS, F. J. et al. Severity of experimental *Escherichia coli* mastitis in ketonemic and nonketonemic dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.76, p.3428–3436, 1993.

LAMBERTZ, C.; ANKER, S.; GAULY, M. et al. Climatic effects on milk production traits and somatic cell score in lactating Holstein-Friesian cows in different housing systems. *J. Dairy Sci.*, v.97, p.319–329, 2014.

LOPEZ-BENAVIDES, M.G.; WILLIAMSON, J.H.; CURSONS, R.T. Associations between *Streptococcus uberis* populations on farm races and climatic changes during a twelve-month period. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.*, v.65, p.153-156, 2005.

LUCCI, C.S.; VALVASORI, E.; PEIXOTO JUNIOR, K. Concentrações de nitrogênio na dieta, no sangue e no leite de vacas lactantes no período pós-parto. *Rev. Bras. Zootec.*, v.35, p.258-263, 2006.

MADER, T. L.; JOHNSON, L. J.; GAUGHAN, J. B. A comprehensive index for assessing environmental stress in animals. *J. Anim. Sci.*, v.88, p.2153- 2165, 2010.

MADOUASSE, W. J.; BROWNE, J. N.; HUXLEY, F. et al. Risk factors for a high somatic cell count at the first milk recording in a large sample of UK dairy herds. *J. Dairy Sci.*, v.95, n.4, p.1873-1884, 2012.

MARTELLO, L.S.; SAVASTANO JÚNIOR H.; SILVA, S.L. et al. Respostas fisiológicas e produtivas de vacas holandesas em lactação submetidas a diferentes ambientes. *Rev. Bras. Zootec.*, v.33, p.181-191, 2004.

MEYER, P.M.; MACHADO, P.F.; COLDEBELLA, A. et al. Fatores não-nutricionais e concentração de nitrogênio uréico no leite de vacas Holandesas. *Rev. Bras. Zootec.*, v.35, n.3, p.1114-1121, 2006.

MOYES, K.M.; DRACKLEY, J.K.; SALAK-JOHNSON, J.L. et al. Dietary-induced negative energy balance has minimal effects on innate immunity during a streptococcus uberis mastitis challenge in dairy cows during mid lactation. *J. Dairy Sci.*, v.92, n.9, p.4301-16, 2009.

NYMAN, A.-K.; EMAUELSON, U.; HOLTENIUS, K. et al. Metabolites and immune variables

associated with somatic cell counts of primiparous dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.91, p.2996–3009, 2008.

OLDE RIEKERINK, R.G.; BARKEMA, H.W.; STRYHN, H. The effect of season on somatic cell count and the incidence of clinical mastitis. *J. Dairy Sci.*, v.90, n.4, p.1704-1715, 2007.

OLIVER, S. P.; GONZÁLEZ, R. N.; HOGAN, J. S. et al. 2004. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality. Verona: National Mastitis Council.

PAAPE, M.J.; SCHULTZE, W.D.; MILLER, R.H. et al. Thermal stress and circulating erythrocytes, leukocytes, and milk somatic cells. *J. Dairy Sci.*, v.56, n.1, p.84-91, 1973.

PARK, Y. K.; KOO, H. C.; KIM, S. H. et al.. The Analysis of Milk Components and Pathogenic Bacteria Isolated from Bovine Raw Milk in Korea. *J. Dairy Sci.*, v.90, p.5405–5414, 2007.

PEREIRA, A.R.; MACHADO, P.F.; SARRÍES, G.A. Contagem de células somáticas e características produtivas de vacas da raça Holandesa em lactação. *Sci. Agric.*, v.58, n.4, p.649-654, 2001.

REZAMAND, P., HOAGLAND, T. A.; MOYES, K. M. et al. Energy status, lipid-soluble vitamins, and acute phase proteins in periparturient Holstein and Jersey dairy cows with or without subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.*, v.90, p. 5097–5107, 2007

ROSELER, D. K.; FERGUSON, J. D.; SNIFFEN, C. J. et al. Dietary protein degradability effects on plasma and milk urea nitrogen and milk non protein nitrogen in Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, v.76, n.2, p.525-534, 1993.

SCHUKKEN, Y.H.; WILSON, D.J.; WELCOME, F. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet. Res.*, v.34, p.579-596, 2003.

SOUZA, R.; SANTOS, G. T.; VALLOTO, A. A. et al. Produção e qualidade do leite de vacas da raça Holandesa em função da estação do ano e ordem de parto. *Rev. bras. Saúde Prod. Anim.* v.11, n.2, p.484-495, 2010.

SYRIDION, D.; LAYEK, S.S.; BEHERA, K. et al. Effects of parity, season, stage of lactation, and milk yield on milk somatic cell count, pH and electrical conductivity in crossbred cows reared under subtropical climatic conditions. *Milchwissenschaft-Milk Science International*, v.67, n.4, p.362-365, 2012.

TAO, S.; BUBOLZ, J. W.; DO AMARAL, B. C. et al. Effect of heat stress during the dry period on mammary gland development. *J. Dairy Sci.*, v.94, p.5976–5986, 2011.

TAPONEN, S.; LISKI, E.; HEIKKILA, A.M. et al. Factors associated with intramammary infection in dairy cows caused by coagulase-negative staphylococci, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis*, or *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.*, v.100, n.1, p.493–503, 2017.

TONI, F.; VINCENTI, F L.; GRIGOLETTO, L. et al. Early lactation ratio of fat and protein percentage in milk is associated with health, milk production, and survival. *J. Dairy Sci.*, v.94, p.1772–1783, 2011.

VAN STRATEN, M.; FRIGER, M.; SHPIGEL, N.Y. Events of elevated somatic cell counts in high-producing dairy cows are associated with daily body weight loss in early lactation. *J. Dairy Sci.*, v.92, n.9, p.4386-94, 2009.

VITALI, A.; SEGNALINI, M.; BERTOCCHI, L. et al. Seasonal pattern of mortality and relationships between mortality and temperature-humidity index in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.92, n.8, p.3781-3790, 2009.

CAPÍTULO 3

GENÓTIPOS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE VACAS COM INFECÇÕES INTRAMAMÁRIAS CLÍNICAS E SUBCLÍNICAS TRANSIENTES E PERSISTENTES EM DOIS REBANHOS MISTIÇOS BRASILEIROS

RESUMO

O objetivo do trabalho foi identificar e diferenciar genótipos de *Staphylococcus aureus* de casos de mastite clínica e subclínica persistente e transiente em dois rebanhos constituídos por vacas mestiças. No período de julho de 2013 a julho de 2014, amostras compostas de leite dos quartos mamários foram coletadas de vacas $\frac{1}{2}$ Holandês-Zebu e $\frac{3}{4}$ Holandês-Zebu, mensalmente, para análise de contagem de células somáticas (CCS), e bimestralmente, para isolamento e identificação dos patógenos causadores de mastite subclínica e clínica. A confirmação da identificação dos isolados de *S. aureus* das amostras de leite foi feita por meio da técnica de *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight* (MALDI-TOF). Para diferenciação de 124 amostras de *S. aureus* oriundas de vacas que apresentaram mastite subclínica em mais de três episódios durante o período estudado, de vacas que apresentaram mastite subclínica persistente e transiente, e de animais com mastite clínica utilizou-se a técnica de *Pulsed Field Gel Eletrophoresis* (PFGE). A tipagem molecular por PFGE evidenciou heterogeneidade entre os isolados, e índice discriminatório $D = 0,807$, sendo identificados 20 perfis genéticos distintos (Pulsotipos A a T) com uma grande diversidade clonal observada pelo número de subtipos em cada pulsotipo, em um total de 42 subtipos. Foram predominantes apenas cinco pulsotipos: A (36,29%), G (19,35%), I (10,48%), K (10,48%) e B (8,06%) e três subtipos: A1 (17,74%), G2 (15,32%) e A9 (8,06%). O resultado do estudo demonstrou predomínio de cepas de *S. aureus* causadoras da maioria dos casos de mastite bovina, o que reforça a necessidade de obter informações epidemiológicas dos rebanhos com intuito de auxiliar os técnicos na implementação de medidas preventivas e terapêuticas para o controle de infecções intramamárias causadas pelos diferentes pulsotipos de *S. aureus* em rebanhos mestiços.

Palavras-chave: mastite, *Staphylococcus aureus*, pulsotipo, vaca mestiça

ABSTRACT

The objective of this study was to identify and differentiate the *Staphylococcus aureus* genotypes from cases of persistent and transient subclinical and clinical mastitis in two herds of crossbreed cows. In the period from July 2013 to July 2014 ½ Holstein-Zebu cows and ¾ Holstein-Zebu milk samples were collected monthly for somatic cell count (SCC) analysis, and bimonthly composite samples for isolation and identification of pathogens causing subclinical and clinical mastitis. Confirmation of the samples as *S. aureus* was done using the Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight technique (MALDI-TOF). A total of 124 *S. aureus* samples were evaluated using Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) for differentiation of *S. aureus* strains from cows that presented subclinical mastitis in more than three episodes during the period of cows and that presented subclinical mastitis persistent and transient and clinic mastitis by *S. aureus*. The molecular typing by PFGE showed heterogeneity among the isolates, and a discriminant index $D = 0.807$. Twenty different genetic profiles (Pulsotipos A to T) were identified with a great clonal diversity observed by the number of subtypes in each pulsetype, total of 42 subtypes. Predominantly only five pulsetype A (36.29%), G (19.35%), I (10.48%), K (10.48%) and B (8.06%) and three A1 (17, 74%), G2 (15.32%) and A9 (8.06%). The results of the study showed that *S. aureus* strains predominate as the cause of most cases of bovine mastitis, which reinforces the need to obtain epidemiological information from the herds in order to assist the technicians in the implementation of preventive and therapeutic measures for the control of intramammary infections caused by the different *S. aureus* pulsotypes in the crossbreed herds.

Keywords: intramammary infection, *Staphylococcus aureus*, pulsotype, mastitis, crossbreed cows

1. INTRODUÇÃO

A mastite é a doença infecciosa mais importante e onipresente do gado leiteiro em todo o mundo. Destaca-se entre as enfermidades de grande importância mundial nos rebanhos leiteiros pelas perdas econômicas para o produtor de leite e para a indústria de laticínios, pela redução da quantidade e pela alteração da qualidade do leite produzido, ou até pela perda total da capacidade secretora da glândula mamária (Ruegg, 2003; Hogeveen et al., 2011; Jagielski et al., 2014).

A literatura descreve 137 espécies de microrganismos causadores da mastite e *Staphylococcus aureus* destaca-se como principal agente causador da doença nos rebanhos, frequentemente associado a infecções intramamárias persistentes (IIM) (Zafalon et al., 2008; Klein et al., 2012).

Inúmeros métodos são utilizados com o propósito de investigar a epidemiologia molecular de patógenos bacterianos, como *S. aureus*. A técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) é considerada “padrão ouro” para diferenciação de isolados, devido ao alto poder discriminatório e reprodutibilidade, perfil de restrição e de interpretação relativamente simples e representação de todo o genoma bacteriano (Anderson e Lyman, 2006; Dingwell et al., 2006). Possibilita apontar similaridades e distinções entre os isolados, identificar se os isolados são geneticamente relacionados e contribui para a caracterização molecular de *S. aureus* e para o maior conhecimento a respeito da patogenia e da epidemiologia da mastite causada por esse agente (Tenover et al., 1994; Lange et al., 1999; Çiftci et al., 2009).

Diversos trabalhos têm avaliado a mastite em rebanhos leiteiros de alta produção, como bovinos da raça Holandesa (Anderson e Lyman, 2006; Piepers et al., 2007; Dufour et al., 2012; Veh et al., 2014). No Brasil, os rebanhos leiteiros são caracterizados principalmente por utilização de animais mestiços, híbridos de *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* (Fonseca et al., 2009) com “grau de sangue” entre $\frac{1}{2}$ e $\frac{3}{4}$ europeu. Apesar da importância do gado mestiço nos diversos sistemas de produção, estudos comparando os genótipos dos isolados de *S. aureus* nestes rebanhos com intuito de conhecer a complexidade etiológica das mastites causadas por este patógeno em rebanhos mestiços não têm sido realizados.

O objetivo do trabalho foi identificar e diferenciar genótipos de *S. aureus* dos casos de mastite clínica e subclínica persistente e transiente em dois rebanhos constituídos por vacas mestiças.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Descrição dos rebanhos

O estudo foi realizado em dois rebanhos localizados no município de Prudente de Moraes em Minas Gerais, a 19°27'15'' latitude sul, 44°09'11'' longitude oeste e 732 m de altitude, no período de julho de 2013 a julho de 2014 (13 meses).

Os dois sistemas de produção de leite são semi-intensivos, independentes e com características tecnológicas distintas, conforme descrito nos capítulos 1 e 2.

Por se tratar de um estudo longitudinal, ocorreu, ao longo do período, uma variação mensal no número dos animais em lactação, sendo avaliadas amostras de leite de 149 e 96 vacas nos sistemas de produção A e B, respectivamente.

2.2 Coleta de amostras

Durante o período de estudo, coletaram-se mensalmente, no dia da pesagem do leite, amostras compostas de leite das vacas em lactação dos dois rebanhos, para realização da análise da contagem de células somáticas (CCS), totalizando 989 e 835 amostras no SPA e SPB, respectivamente.

O monitoramento da ocorrência de mastite subclínica foi realizado de forma individual, considerando portador, aqueles animais com CCS >200.000 células mL⁻¹ (Dohoo e Leslie, 1991; Schukken et al., 2003).

A coleta de amostras para realização da análise da CCS foi realizada após os procedimentos diários da ordenha do período da manhã e da tarde. As amostras compostas de leite foram obtidas diretamente de medidores de leite acoplados ao equipamento de ordenha e acondicionadas em frascos contendo bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol).

2.3 Determinação da CCS do leite

As amostras de leite foram analisadas quanto a contagem de células somáticas no equipamento eletrônico CombiScope FTIR 400® (Delta Instruments; Drachten, Holanda) pelo método de citometria de fluxo segundo IDF (1995).

2.4 Análise microbiológica

Para isolamento e identificação dos patógenos da mastite foram coletadas bimestralmente amostras compostas dos quatro quartos mamários das vacas em lactação e amostras de leite dos quartos mamários das vacas que apresentaram mastite clínica durante o período avaliado. Antes da coleta das amostras, foi realizado o descarte dos três primeiros jatos, com posterior desinfecção dos tetos com solução pré-dipping. No momento da coleta, foi realizada antisepsia do esfíncter do teto com algodão umedecido em álcool a 70%. Os jatos foram retirados de cada teto formando amostras compostas de aproximadamente 50 mL cada uma, as quais foram acondicionadas em frascos estéreis, congeladas a -20°C e enviadas ao laboratório.

Os agentes causadores da mastite foram identificados semeando-se 0,01mL de cada amostra de leite, com alça calibrada descartável, em cada quadrante de uma placa de ágar-sangue preparado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro. As placas foram incubadas a 37°C por 24 a 48 horas, seguido de observação da morfologia das colônias, testes de coloração de Gram e de identificação (Oliver et al., 2004).

As amostras identificadas como *S. aureus* foram congeladas a -20°C, e posteriormente reativadas em caldo BHI a 37° C por 20-24 horas e armazenadas congeladas em caldo BHI e glicerina para posterior utilização.

No total, foram coletadas 528 amostras no SPA e 451 no SPB para isolamento e identificação microbiológica. Patógenos foram identificados em 256 amostras do SPA e em 341 do SPB. Dessas amostras, 217 foram identificadas como *S. aureus* (72 amostras no rebanho A e 145 no rebanho B).

Para avaliação dos genótipos de *S. aureus*, utilizando a técnica de PFGE, foram selecionadas 124 amostras.

2.5 Análise MALDI-TOF (Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight)

A confirmação do diagnóstico microbiológico destas 124 amostras foi feita por meio da técnica de MALDI-TOF (Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight) de acordo com Dec et al. (2016). As medições foram realizadas no equipamento UltrafarXMtreme MALDI TOF (Bruker, Bremen, Alemanha).

2.6 Análise Pulsed Field Gel Eletrophoresis (PFGE)

Para identificar e avaliar os genótipos dos *S. aureus* de vacas com mastite subclínica persistente, foram analisadas 109 amostras provenientes de 29 vacas. As vacas que apresentaram CCS \geq 200.000 células/mL em mais de três coletas durante o período do estudo foram agrupadas da seguinte forma: Grupo 1 - vacas com mastite subclínica com CCS \geq 500.000 células/mL (47 amostras de 13 vacas); Grupo 2 - vacas com mastite subclínica com CCS $<$ 500.000 células/mL (16 amostras de 4 vacas) e Grupo 3 - vacas que apresentaram mastite subclínica com CCS cíclica (variação de CCS de baixa a alta) durante o período de coleta (46 amostras de 12 vacas). O ponto de corte de 500.000 células/mL foi definido segundo a distribuição da CCS de cada rebanho (Mollenhorts et al., 2010).

Consideraram-se casos de mastite subclínica persistente quando a IIM foi causada pelo mesmo pulstotipo durante o período estudado. Infecção recorrente foi considerada quando identificou-se a presença de pulstotipo diferente do episódio original (Abureema et al., 2014).

Para avaliação das vacas com mastite subclínica transiente, foram avaliadas três amostras provenientes de três vacas, sendo uma amostra de cada animal. Os casos de mastite subclínica transiente referem-se às vacas que apresentaram pelo menos três a seis episódios de IIM durante o período, porém apenas um episódio foi causado pelo *S. aureus*. Nos demais episódios anteriores e posteriores à identificação do *S. aureus*, não houve crescimento de patógenos ou a IIM foi causada por outro patógeno.

Também foram selecionadas para análise, três amostras provenientes de duas vacas que apresentaram casos isolados de mastite clínica por *S. aureus* e de mastite subclínica causada por outros patógenos; e nove amostras de sete vacas que apresentaram mastite subclínica persistente e mastite clínica causada por *S. aureus* durante o período de coleta.

A técnica de PFGE foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por McDougal et al. (2003). Os padrões de banda foram comparados visualmente e interpretados utilizando critérios definidos por Van Belkum et al. (2007). Isolados com perfis de restrição idênticos foram considerados como mesmo pulstotipo, e a estas, foi atribuída uma letra maiúscula. Padrões com até quatro bandas de diferença foram atribuídos a subtipos do mesmo pulstotipo, numerados com um sufixo numérico, e isolados com cinco ou mais bandas diferentes como pulstotipos distintos (Van Belkum et al., 2007).

A comparação do padrão de bandas foi realizada utilizando o programa Bionumerics (BioNumerics; Applied Maths, Inc., Austin, TX) para avaliar a reprodutibilidade dos padrões

entre os géis e para criar o dendrograma.

O poder discriminatório da tipagem foi determinado conforme o índice de discriminação D descrito por Hunter e Gaston (1988).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os rebanhos avaliados apresentaram uma frequência considerável de mastite subclínica causada por *S. aureus*, sendo 13,53% no rebanho A e 32,15% no rebanho B.

A figura 1 demonstra a porcentagem de amostras identificadas como *S. aureus* e a média mensal da CCS (log células/mL) de cada sistema de produção durante o período avaliado. O leite dos animais do sistema de produção B (SPB) apresentou estatisticamente maior média de CCS (log células/mL) e porcentagem de amostras de *S. aureus* em comparação com o sistema de produção A (SPA). Essa variação na CCS entre os dois rebanhos pode ser explicada pelo grau de sangue das vacas de cada sistema e também pelo manejo de ordenha, pois no SPA, as vacas ½ HZ são ordenhadas com bezerro ao pé diferentemente do SPB, em que as vacas ¾ HZ não são.

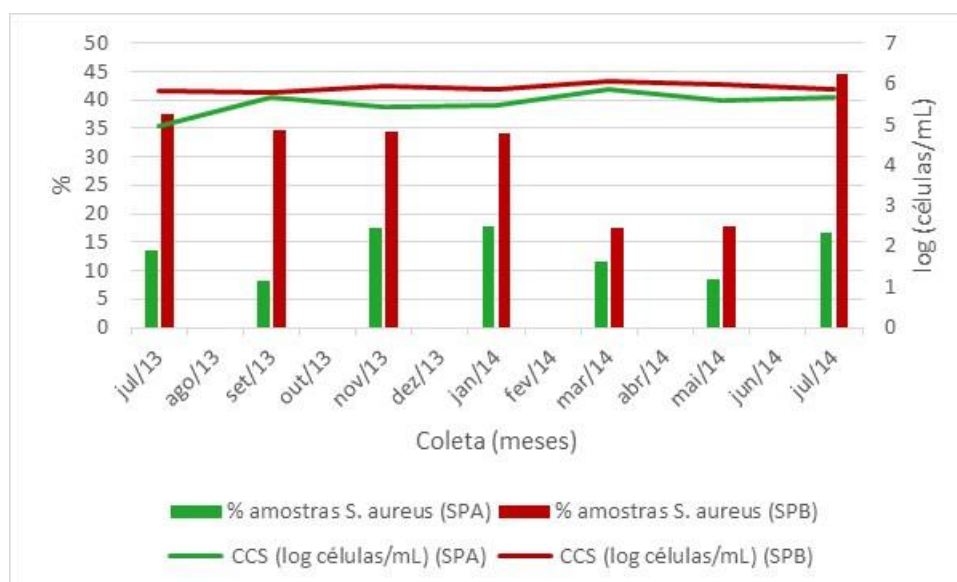


Figura 1 – Distribuição de *Staphylococcus aureus* isolado em amostras de leite de vacas dos sistemas de produção A (SPA) e B (SPB) e contagem de células somáticas (log células/mL).

No presente estudo, a tipagem molecular por PFGE evidenciou heterogeneidade entre os isolados, e índice discriminatório $D = 0,807$, o que demonstra que a escolha da técnica foi adequada para realização do estudo.

De acordo com os critérios descritos por Van Belkum et al. (2007), foram identificados 20 perfis genéticos distintos (pulsotipos A a T) com uma grande diversidade clonal observada pelo número de subtipos em cada pulsotipo, total de 42 subtipos, sendo predominantes apenas cinco pulsotipos: A (36,29%), G (19,35%), I (10,48%), K (10,48%) e B (8,06%) e três subtipos A1 (17,74%), G2 (15,32%) e A9 (8,06%) (Figura 2).

O dendrograma permitiu verificar a similaridade e a variabilidade genética entre os isolados de *S. aureus*. Nesse estudo, 89 isolados foram agrupados com 100 % de similaridade (Figura 2).

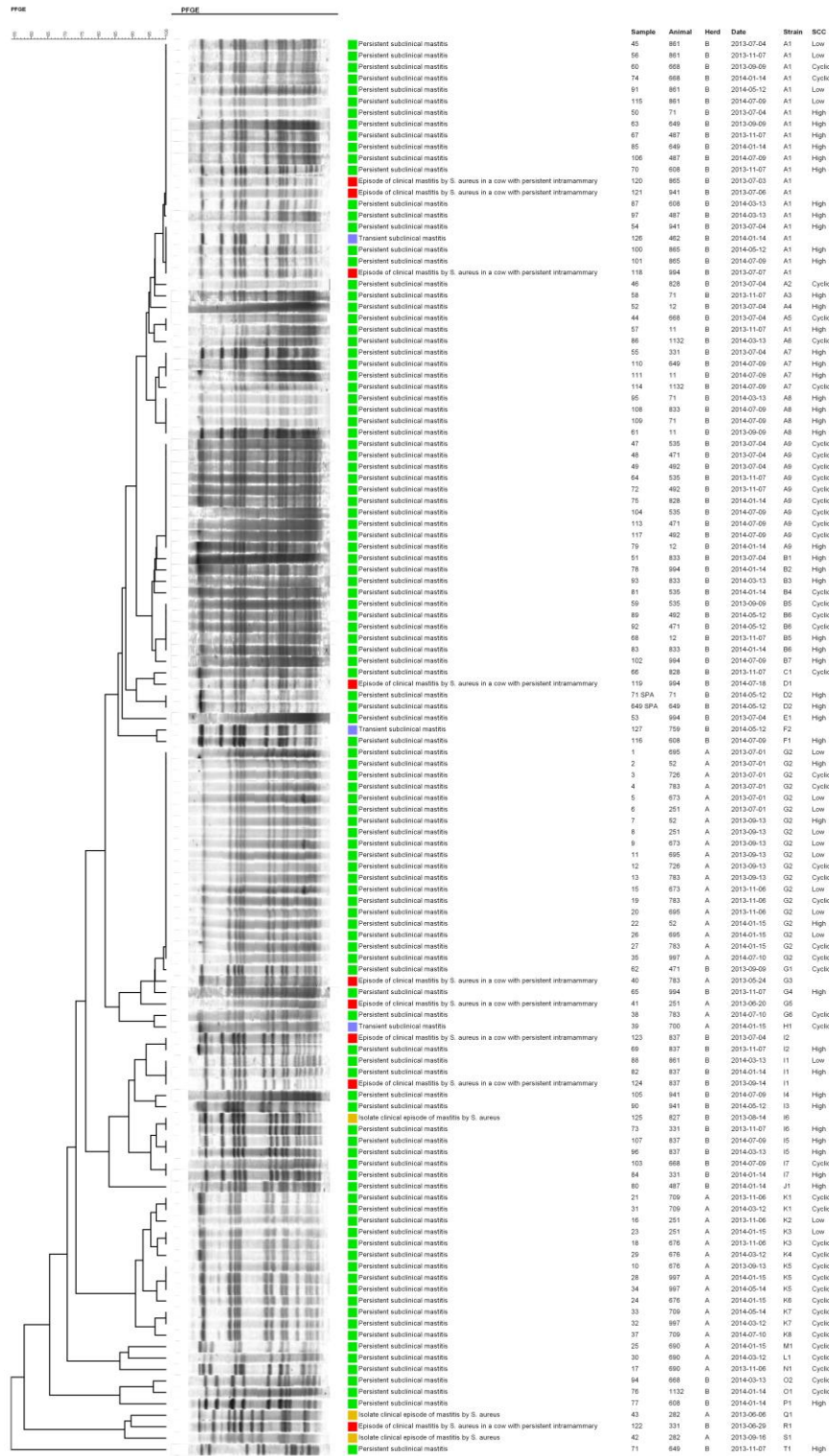


Figura 2 – Dendrograma: diversidade genotípica entre os isolados de *S. aureus*. Padrões gerados pelo PFGE após digestão com enzima de restrição SmaI.

Ao avaliar as amostras de *S. aureus* provenientes de vacas do SPA que apresentaram mastite subclínica, ao longo do período estudado, foram identificadas apenas seis pulsotipos dos isolados (pulsotipo G, H, K, L, M, N), sendo predominante o pulsotipo G (56,41% das amostras), subtipo G2 (48,72%). Já no SPB foram identificados a presença de 13 pulsotipos (A, B, C, D, E, F, G, I, J, O, P, R, T) com predomínio nas amostras do pulsotipo A (54,88%), subtipo A1 (26,83%).

Em relação às amostras coletadas de vacas com mastite clínica e que também apresentaram mastite subclínica durante o estudo (SPA, quatro amostras de três vacas e SPB, oito amostras de seis vacas) observaram-se três pulsotipos (G, Q e S) e dois subtipos (G1, G2) no SPA e no SPB, quatro pulsotipos (A, D, I, R) e cinco subtipos (A1, D1, I1, I2, I6).

Os resultados desse estudo corroboram com os diferentes estudos de tipificação molecular de *S. aureus*, com raras exceções (Joo et al., 2001), que sugerem que relativamente poucas cepas de *S. aureus* são responsáveis pelo desenvolvimento da maioria dos casos de mastite bovina dentro de um mesmo rebanho (Matthews et al., 1994; Kapur et al., 1995; Fitzgerald et al., 1997; Larsen et al., 2000; Zadoks et al., 2000; Buzzola et al., 2001; Middleton et al., 2002; Sommerhauser et al., 2003; Haveri et al., 2008; Mork et al., 2005; Çiftci et al., 2009; Dendani et al., 2010; Castelani et al., 2013).

A predominância de poucas cepas nos rebanhos demonstra que algumas linhagens possuem uma combinação de genes que confere à bactéria características patogênicas que permitem colonizar, infectar a glândula mamária, sobreviver e disseminar pelo ambiente e animais. Estas cepas predominantes também podem coexistir com várias outras cepas de *S. aureus* (Buzolla et al., 2001; Cabral et al., 2004; Smith et al., 2005).

Outra explicação para o predomínio de alguns pulsotipos no rebanho pode estar relacionada com a capacidade do *S. aureus* de resistir aos mecanismos de defesa do sistema imune do animal. Em um estudo realizado por Su et al. (1999), os genótipos predominantes foram considerados mais resistentes às atividades bactericidas dos neutrófilos do que os genótipos raros.

Em relação à identificação de subtipos das cepas é possível que fossem clones originalmente idênticos e que sofreram modificações ao longo da permanência na glândula mamária.

A identificação de uma linhagem diferente das que existiam naquela região ou rebanho refere-se, possivelmente, a uma cepa que apresenta maior patogenicidade e facilidade de transmissão dentro do rebanho (Smith et al., 1998). Isto demonstra a importância de determinar e acompanhar ao longo do tempo, as amostras de *S. aureus*.

Das 29 vacas avaliadas em relação à persistência da IIM, dez animais (34 amostras) foram considerados persistentemente infectados e 19 vacas, reinfetadas (75 amostras). Nas amostras provenientes das vacas que apresentaram mastite subclínica persistente foram identificados os pulsotipos A, G, I e K (Tabela 1).

Tabela 1 – Isolados de *S. aureus* provenientes de vacas com mastite subclínica persistente/reinfecção classificados de acordo com a CCS e a relação de pulsotipos (tipo e subtipo) identificados pela técnica de PFGE

Animal	Sistema de produção	Pulsotipo (tipo)	Pulsotipo (subtipo)	Perfil da mastite	CCS
52	A	G	G2	Mastite subclínica persistente	Alta*
673	A	G	G2	Mastite subclínica persistente	Baixa**
695	A	G	G2	Mastite subclínica persistente	Baixa**
726	A	G	G2	Mastite subclínica persistente	Cíclica***
783	A	G	G2	Mastite subclínica persistente	Cíclica***
676	A	K	K3 / K4/ K5/ K6	Mastite subclínica persistente	Cíclica***
709	A	K	K1 / K7 / K8	Mastite subclínica persistente	Cíclica***
11	B	A	A1 / A7 / A8	Mastite subclínica persistente	Alta*
837	B	I	I1 / I2 / I5 / I5	Mastite subclínica persistente	Alta*
865	B	A	A1	Mastite subclínica persistente	Alta*
251	A	G / K	G2 / G2 / K2 / K3	Mastite subclínica - Reinfecção	Baixa**
690	A	L / M / N	L / M / N	Mastite subclínica - Reinfecção	Cíclica***
997	A	K / G	K5 / K5 / K7 / G2	Mastite subclínica - Reinfecção	Cíclica***
12	B	A / B	A4 / A9 / B5	Mastite subclínica - Reinfecção	Alta*
71	B	A / D	A1 / A3 / A8 / A8 / D2	Mastite subclínica - Reinfecção	Alta*
331	B	A / I	A7 / I6 / I7	Mastite subclínica - Reinfecção	Alta*
471	B	A / B / G	A9 / A9 / B6 / G1	Mastite subclínica - Reinfecção	Cíclica***
487	B	A / J	A1 / A1 / A1 / J	Mastite subclínica - Reinfecção	Alta*
492	B	A / B	A9 / A9 / A9 / B6	Mastite subclínica - Reinfecção	Cíclica***
535	B	A / B	A9 / A9 / A9 / B4 / B5	Mastite subclínica - Reinfecção	Cíclica***
608	B	A / F / P	A1 / A1 / F1 / P	Mastite subclínica - Reinfecção	Alta*
649	B	A / D / T	A1 / A1 / A7 / D2 / T	Mastite subclínica - Reinfecção	Alta*
668	B	A / I / O	A1 / A1 / A5 / I7 / O	Mastite subclínica - Reinfecção	Cíclica***
828	B	A / C	A2 / A9 / C	Mastite subclínica - Reinfecção	Cíclica***
833	B	A / B	A8 / B1 / B3 / B6	Mastite subclínica - Reinfecção	Alta*
861	B	A / I	A1 / A1 / A1 / A1 / I	Mastite subclínica - Reinfecção	Baixa**
941	B	A / I	A1 / I3 / I4	Mastite subclínica - Reinfecção	Alta*
994	B	B / E / G	B2 / B7 / E / G4	Mastite subclínica - Reinfecção	Alta*
1132	B	A	A6 / A7 / O1	Mastite subclínica - Reinfecção	Cíclica***

* CCS alta ≥ 500.000 células/mL

** CCS < 500.000 células/mL

*** CCS cíclica - variação de CCS de baixa a alta

Conforme mostrado na tabela 1, a maioria dos episódios de mastite subclínica no SPA ocorreu devido a persistência de uma mesma cepa (69,44%) e alguns foram considerados reinfecções, diferentemente do SPB, em que 12,33% das amostras foram de vacas consideradas persistentemente infectadas.

O elevado percentual de amostras de vacas com mastite subclínica consideradas reinfecção pode estar relacionado com práticas inadequadas do manejo no SPB, que aumentam o desafio das vacas tornando-as propensas à infecção intramamária por uma nova cepa.

Os pulsotipos G (subtipos G2, G6) e K (subtipos K1, K3, K4, K5, K6, K7, K8) foram identificados em vacas consideradas persistentemente infectadas avaliadas no SPA (7 vacas – 25 amostras), com predomínio do subtipo G2 em 64% das amostras. No SPB foram identificados os pulsotipos A e I (subtipos A1, A7, A8, I1, I2, I5) em nove amostras coletadas de três vacas com mastite subclínica persistente. Esse resultado demonstra que os pulsotipos responsáveis

pela persistência da IIM encontrados nos isolados do rebanho A não foram identificados no rebanho B.

Nas três amostras provenientes de três vacas com mastite subclínica transiente foram identificados nos isolados de *S. aureus*, os pulsotipos, tipos (A, F, H) e subtipos (A1, F2) (Tabela 2).

Tabela 2 – Relação de amostras e pulsotipos (tipos e subtipos) de isolados das vacas que apresentaram mastite subclínica transiente, mastite clínica por *S. aureus* e mastite subclínica causada por outros patógenos, e mastite subclínica e clínica por *S. aureus*

Animal	Sistema de produção	Pulsotipo (tipo)	Pulsotipo (subtipo)	Perfil da mastite
700	A	H		Mastite subclínica transiente
462	B	A	A1	Mastite subclínica transiente
759	B	F	F2	Mastite subclínica transiente
282	A	Q		Mastite clínica por <i>S. aureus</i> e mastite subclínica por outros patógenos
282	A	S		Mastite clínica por <i>S. aureus</i> e mastite subclínica por outros patógenos
827	B	I	I6	Mastite clínica por <i>S. aureus</i> e mastite subclínica por outros patógenos
251	A	G	G5	Mastite subclínica e clínica por <i>S. aureus</i>
783	A	G	G3	Mastite subclínica e clínica por <i>S. aureus</i>
994	B	A	A1	Mastite subclínica e clínica por <i>S. aureus</i>
865	B	A	A1	Mastite subclínica e clínica por <i>S. aureus</i>
941	B	A	A1	Mastite subclínica e clínica por <i>S. aureus</i>
994	B	D	D1	Mastite subclínica e clínica por <i>S. aureus</i>
837	B	I	I1	Mastite subclínica e clínica por <i>S. aureus</i>
837	B	I	I2	Mastite subclínica e clínica por <i>S. aureus</i>
331	B	R		Mastite subclínica e clínica por <i>S. aureus</i>

Nas amostras (n=3) de duas vacas que apresentaram mastite clínica por *S. aureus* e casos de mastite subclínica causada por outros patógenos foram identificados os pulsotipos (Q, S, I) e um subtipo (I6) (Tabela 2).

Os pulsotipos H e F2, Q e S (Tabela 2) referem-se a cepas que foram encontradas apenas nos casos de mastite subclínica transiente e nas vacas que apresentaram mastite clínica por *S. aureus* e mastite subclínica por outros patógenos, respectivamente. Isto demonstra que esses pulsotipos não permaneceram nos rebanhos ao longo do período estudado.

Nas amostras coletadas das sete vacas que apresentaram mastite subclínica e mastite clínica causada por *S. aureus* durante o período de coleta (n = 9 amostras), foram identificados os pulsotipos A, D, I, G (subtipo G3 e G5), e R com predomínio do pulsotipo A (A1) (33,33%) (Tabela 2).

Os pulsotipos A1, I1 e I2 também foram identificados nos isolados dos animais que tiveram mastite subclínica persistente no SPB (Tabela 1), o que demonstra que esses três pulsotipos permaneceram no rebanho e foram capazes de causar mastite clínica. Esse resultado concorda com Haveri et al. (2005) que avaliaram a relação da patogenicidade com as cepas de *S. aureus* e identificaram pulsotipos que causaram sintomas clínicos que foram rapidamente eliminados, e outros pulsotipos que causaram mastite branda e crônica.

A presença das infecções intramamárias persistentes pode ser explicada pelo potencial de transmissão de uma vaca para a outra durante a ordenha e pela adaptação do patógeno ao hospedeiro. Alguns fatores, como alterações e lesões nos tetos, características anatômicas do teto e do canal do teto e mecanismos de defesa ineficiente da vaca podem explicar a recorrência das IIM causadas por diferentes cepas de *S. aureus* (Breen et al., 2009; Abureema et al., 2014).

Estas infecções persistentes são relevantes porque podem desempenhar um papel importante como reservatórios da infecção, mantendo a infecção por *S. aureus* dentro do rebanho (Phuektes et al., 2001; Bergonier et al., 2014). Dessa forma, a identificação das cepas é fundamental para classificar corretamente estes reservatórios dentro de um rebanho (Sommerhäuser et al., 2003). Uma medida que pode ser implantada para eliminar as cepas predominantes é o descarte ou separação destas vacas persistentemente infectadas.

Outra investigação relevante em relação às cepas encontradas no rebanho é a identificação de características específicas que favorecem a persistência da mastite e a gravidade da doença nesses animais, como fatores de patogenicidade dessas cepas. A distribuição dos fatores de patogenicidade pode ser diferente entre as diferentes cepas de *S. aureus* (Smith et al., 1998).

Até o momento não foram encontrados estudos científicos em que rebanhos mestiços Holandês x Zebu tenham sido avaliados em relação aos genótipos de *S. aureus* de IIM. Poucos estudos avaliaram a persistência de cepas de *S. aureus* dentro de um rebanho por um período prolongado e de forma sistemática, sendo que esses estudos foram realizados em gado especializado (Asrestrup et al., 1995; Larsen et al., 2000).

4. CONCLUSÕES

O estudo demonstrou predomínio de cepas de *S. aureus* como causadoras da maioria dos casos de mastite bovina nos rebanhos avaliados e responsáveis pela persistência das IIM.

Diferenças entre os pulsotipos e subtipos dos isolados de *S. aureus* foram identificadas segundo o perfil da infecção intramamária nos dois rebanhos.

A determinação epidemiológica de *S. aureus* é importante para uma melhor compreensão da disseminação dos genótipos de *S. aureus* dentro dos rebanhos, auxiliando os técnicos na elaboração de estratégias de prevenção e controle mais eficientes, tornando assim a atividade leiteira mais rentável.

5. AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (CVZ APQ 03680/10) pelo apoio financeiro, ao Laboratório de Análise da Qualidade do Leite – LabUFMG e ao Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUREEMA, S.; SMOOKER, P.; MALMO, J. et al. 2014. Molecular epidemiology of recurrent clinical mastitis due to *Streptococcus uberis*: Evidence of both an environmental source and recurring infection with the same strain. *J. Dairy Sci.*, v.97, p.285–290, 2014.
- AARESTRUP, F. M.; WEGENER, H. C.; ROSDAHL, V. T. A comparative study of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis during 1952–1956 and 1992. *Acta Vet. Scand.*, v.36, p.237–243, 1995.
- ANDERSON, K. L.; LYMAN, R. L. Long-Term Persistence of Specific Genetic Types of Mastitis-Causing *Staphylococcus aureus* on three dairies. *J. Dairy Sci.*, v.89, p.4551–4556, 2006.
- BERGONIER, D.; SOBRAL, D.; FEßLER, A.T. et al. *Staphylococcus aureus* from 152 cases of bovine, ovine and caprine mastitis investigated by Multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *Vet Res.* v.2, p.45:97, 2014.
- BREEN, J. E.; GREEN, M. J.; BRADLEY, A. J. Quarter and cow risk factors associated with the occurrence of clinical mastitis in dairy cows in the United Kingdom. *J. Dairy Sci.*, v.92, p.2551–2561, 2009.
- BUZZOLA, F. R.; QUELLE, L.; GOMEZ, M.I. et al. Genotypic analysis of *Staphylococcus aureus* from milk of dairy cows with mastitis in Argentina. *Epidemiol. Infect.*, v.126, p.445–452, 2001.
- CABRAL, K.G.; LÄMMLER, C.; ZSCHÖCK, M. et al. Pheno and genotyping of *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine milk samples from São Paulo State, Brazil. *Can. J. Microbiol.*, v.50, n.11, p. 901–909, 2004.
- CASTELANI, L.; SANTOS, A.F.S.; SANTOS, M.M. et al. Molecular Typing of mastitis-causing *Staphylococcus aureus* isolated from heifers and cows. *Int. J. Mole. Sci.*, v.14, p.4326–4333, 2013.
- CIFTCI, A.; ONUK, E.E.; FINDIK, A. et al. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* strains from ovine mastitis by pulsed-field gel electrophoresis and polymerase chain reaction based on coagulase and protein A gene polymorphisms. *J. Vet. Diag. Invest.*, v.21, p. 849-853, 2009.
- DEC, M.; PUCHALSKI, A.; URBAN, R. et al. 16S-ARDRA and MALDI-TOF mass spectrometry as tools for identification of *Lactobacillus* bacteria isolated from poultry. *BCM Microbiol.*, v.16, p. 105, 2016.
- DENDANI, Z.; ARCANGIOLI, M.A.; BEZILLE, P. et al. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from Bovine Clinical Mastitis by Pulse-Field Gel Electrophoresis (PFGE). *J. Anim. Vet. Adv.*, v.9, n,1, p.5-11, 2010.
- DINGWELL, R.T.; LESLIE, K. E.; LEPP, P.S.D. et al. Influence of the genotype of *Staphylococcus aureus*, determined by pulsed-field gel electrophoresis, on dry-period

elimination of subclinical mastitis in Canadian dairy herds. *Can. J. Vet. Res.*, v.70, n. 2, p.115-120, 2006.

DOHOO, I. R.; LESLIE, K. E. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. *Prev. Vet. Med.*, v.10, p.225–237, 1991.

DUFOUR, S.; DOHOO, I.R.; BARKEMA, H.W. et al. Manageable risk factors associated with the lactational incidence, elimination, and prevalence of *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.95, n.3, p. 1283–1300, 2012.

FITZGERALD, J. R.; MEANEY, W. J.; HARTIGAN, P. J. et al. 1997. Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiol. Infect.*, v.119, n.2, p.261–269, 1997.

FONSECA, I.; SILVA, P.V.; LANGE, C.C. et al. Expression profile of genes associated with mastitis in dairy cattle. *Genet. Mol. Biol.*, v.32, p.776–781, 2009.

HAVERI, M.; TAPONEN, S.; VUOPIO-VARKILA, J. et al. Bacterial genotype affects the manifestation and persistence of bovine *Staphylococcus aureus* intramammary infection. *J. Clin. Microbiol.*, v.43, p.959–961, 2005.

HAVERI, M.; HOVINEN, M.; ROSLOF, A. et al. Molecular types and genetic profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections and extramammary sites. *J. Clin. Microbiol.*, v.46, p.3728–3735, 2008.

HOGVEEN, H.; HUIJPS, K.; LAM, T. Economic aspects of mastitis: New developments. *N. Z. Vet. J.*, v.59, p.16–23, 2011.

HUNTER, P.R.; GASTON, M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.*, November; v.26, n.11, p. 2465-2466, 1988.

IDF. International IDF standard 148A:1995: Milk – Enumeration of somatic cell. Brussels, 1995, 8 f.

JAGIELSKI, T.; PUACZ, E.; LISOWSKI, A. et al. Short communication: Antimicrobial susceptibility profiling and genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Poland. *J. Dairy Sci.*, v.97, p.6122–6128, 2014.

JOO, Y.S.; FOX, L.K.; DAVIS, W.C. et al. *Staphylococcus aureus* associated with mammary glands of cows: genotyping to distinguish different strains among herds. *Vet. Microbiol.*, v.80, p.131-138, 2001.

KAPUR, V.; SISCHO, W. M.; GREER, R. S. et al. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *J. Clin. Microbiol.*, v.33, p.376–380, 1995.

KLEIN, R.C.; FABRES-KLEIN, M. H.; BRITO, M. A. et al. *Staphylococcus aureus* of bovine origin: Genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. *Vet.*

Microbiol., v.160, p.183–188, 2012.

LANGE, C.; CARDOSO, M.; SENCZEK, D. et al. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Vet. Microbiol.*, v.67, p.127-141, 1999.

LARSEN, H. D.; SLOTH, K. H.; ELSBERG, C. et al. The dynamics of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in nine Danish dairy herds. *Vet. Microbiol.*, v.71, p.89–101, 2000.

MATTHEWS, K. R.; KUMAR, S. J.; O'CONNOR, S. A. et al. Genomic fingerprints of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Epidemiol. Infect.*, v.112p.177– 186, 1994.

MCDUGAL, L.K.; STEWARD, C.D.; KILLGORE, G.E. et al. Pulsed field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: Establishing a national database. *J. Clin. Microbiol.*, v.41, p.5113-5120, 2003.

MIDDLETON, J. R.; FOX, L. K.; GAY, J. M. et al. Use of pulsed-field gel electrophoresis for detecting differences in *Staphylococcus aureus* strain populations between dairy herds with different cattle importation practices. *Epidemiol. Infect.*, v.129, p.387–395, 2002.

MOLLENHORST, H.; VAN DER TOL, P. P. J.; HOGVEEN, H. Somatic cell count assessment at the quarter or cow milking level. *J. Dairy Sci.* v.93, n.7, p. 3358-3364, 2010.

MØRK, T.; TOLLERSRUD, T.; KVITILE, B. et al. Comparison of *Staphylococcus aureus* genotypes recovered from cases of bovine, ovine, and caprine mastitis. *J. Clin. Microbiol.*, v.43, p.3979–3984, 2005.

OLIVER S. P., R. N. GONZÁLEZ, J. S. HOGAN, B. M. JAYARAO AND W. E. OWENS. 2004. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality. Verona: National Mastitis Council.

PIEPERS, S.; DE MEULEMEESTER, L.; DE KRUIF, A. et al. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. *J. Dairy Res.*, v.74, p.478–483, 2007.

PHUEKTES, P.; MANSELL, P. D.; DYSON, R. S. et al. Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* Isolates from dairy cows with mastitis. *J. Clin. Microbiol.*, v.39, p.1460–1466, 2001.

RUEGG, P.L. Investigation of mastitis problems on farms. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim Pract.*, v.19, n.1, p. 47-73, 2003.

SCHUKKEN Y.H.; WILSON, D.J.; WELCOME, F. et al. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet. Res.*, v.34, p.579-596, 2003.

SMITH, T. H.; FOX, L. K.; MIDDLETON, J. R. Outbreak of mastitis caused by one strain of *Staphylococcus aureus* in a closed dairy herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v.212, p.553–556, 1998.

SMITH, E.M.; GREEN, L.E.; MEDLEY, G.F. et al. Dowson. Multilocus sequence typing of

intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, v.43, p.4737–4743, 2005.

SOMMERHAUSER, J.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W. et al. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. *Vet. Microbiol.*, v.96, p.91–102, 2003.

SU, C.; HERBELIN, C.; FRIEZE, N. et al. Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cattle in different geographical areas. *Epidemiol. Infect.*, v.122, p.329–336, 1999.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.; ARCHER, G. et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, v.32, n.2, p. 407-415, 1994.

VAN BELKUM, A.; TASSIOS, P. T.; DIJKSHOORN, L. et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect.*, Suppl. 3, p. 1–46, 2007.

VEH, K.A.; KLEIN, R.C.; STER, C. et al. Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and non persistent subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period. *J. Dairy Sci.*, v.98, n.1, p. 155–168, 2015.

ZADOKS, R.; VAN LEEUWEN, W.; BARKEMA, H. et al. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol.*, v.38, n.5, p.1931–1939, 2000.

ZAFALON, L.F.; LANGONI, H.; BENVEBUTTO, F. et al. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. *Vet. Zootec.*, v.15, n.1, p. 55-56, 2008.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados do presente estudo, pode-se concluir que:

- ✓ No rebanho constituído por vacas ½ HZ as variáveis ordem de parto, a relação G/P, temperatura máxima e umidade relativa do mês da coleta foram significativamente associadas à presença de novas infecções intramamárias e a variável produção de leite demonstrou ser fator de proteção.
- ✓ No rebanho constituído por vacas ¾ HZ, a variável relação G/P foi considerada fator de risco à presença de novas infecções intramamárias e a variável ordem de parto, fator de proteção.
- ✓ Em ambos os rebanhos, os patógenos isolados com maior frequência foram *S. aureus*, estafilococos coagulase-negativos e *Corynebacterium* sp.
- ✓ O modelo estatístico em relação à presença de patógenos, no rebanho ½ HZ, demonstrou que as variáveis ordem de parto, temperatura máxima, umidade relativa e ITU são consideradas fatores de risco, bem como as variáveis ordem de parto, relação gordura e proteína, temperatura máxima e umidade relativa do mês da coleta fatores de risco em relação à alta celularidade no leite.
- ✓ O estudo dos genótipos dos isolados de *S. aureus* evidenciou predomínio de cepas causadoras da mastite, e demonstrou que há diferenças entre os pulsotipos e subtipos de acordo com o perfil da infecção intramamária.

Embora os rebanhos dos sistemas de produção A e B estejam alocados na mesma propriedade, submetidos às mesmas condições climáticas, os diferentes manejos e grau de sangue dos animais determinaram diferentes fatores de risco e dinâmica de infecção intramamária, com predomínio de pulsotipos e subtipos diferentes de *S. aureus*.

Os dois rebanhos apresentaram-se, ainda, infectados predominantemente por patógenos contagiosos de mastite, o que demonstra que ambos os sistemas apresentam falhas no manejo de ordenha. As vacas do SPB durante todo o período do estudo apresentaram alto percentual de amostras identificadas como *S. aureus* e CCS mais elevada do que os animais do SPA. No entanto, no SPA, poucas vacas foram responsáveis pelo aumento significativo da CCS no leite do tanque refrigerador.

A identificação dos genótipos de *S. aureus* revelou alto percentual de vacas com mastite subclínica persistente no SPA, diferentemente do SPB que apresentou maior percentual de vacas com mastite subclínica considerada como reinfecção. Esse resultado evidencia uma preocupação maior em relação ao controle da mastite no SPA devido à presença de animais portadores de isolados de *S. aureus* relacionados às infecções intramamárias persistentes que permanecem no rebanho e que são difíceis de serem eliminadas. Demonstra ainda que há uma visão equivocada sobre a resistência de animais ½ H/Z, uma vez que embora tenham apresentado menor CCS, apresentaram maior percentual de vacas com *S. aureus* persistente, que tende a cronicidade e manutenção da infecção no rebanho.

A determinação epidemiológica de *S. aureus* assim como a identificação dos fatores de risco e de proteção em relação à ocorrência da mastite são informações fundamentais para compreensão da doença e para elaboração de estratégias de prevenção e controle que sejam realmente efetivas para rebanhos submetidos a diferentes sistemas de produção.