

Estudo e caracterização de microrganismos causadores de mastite bovina no DF e entorno, sua resistência aos antimicrobianos e os fatores de risco para a ocorrência da doença

Study and characterization of microorganisms that cause bovine mastitis in the Federal District and surrounding areas, their resistance to antimicrobials and the risk factors for the occurrence of the disease

DOI:10.34117/bjdv7n9-032

Recebimento dos originais: 02/08/2021

Aceitação para publicação: 02/09/2021

Aline Stephanie Silva Carvalho

Graduanda de Medicina Veterinária na Universidade de Brasília - DF, Brasil.

Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília-DF. CEP: 70910-900

E-mail: alinesscarvalho@outlook.com

Bruno Félix Mendes

Graduando de Medicina Veterinária na Universidade de Brasília - DF, Brasil.

Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília-DF. CEP: 70910-900

E-mail: 3209049@gmail.com

Rômulo Salignac Araújo de Faria

Graduando de Medicina Veterinária na Universidade de Brasília - DF, Brasil.

Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília-DF. CEP: 70910-900

E-mail: rsalignac.af@gmail.com

Simone Perecmanis

Doutora em Patologia Molecular

Professora da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília – FAV/UnB Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília-DF. CEP: 70910-900

E-mail: perecmaniss@unb.br

Ernane de Paiva Ferreira Novais

Doutorando no Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal da Universidade de Brasília – UnB

Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília-DF. CEP: 70910-900

E-mail: ernanedepaiva@gmail.com

Maurício Macedo Rodrigues

Mestre em Patologia Molecular – Universidade de Brasília – UnB
Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília-DF. CEP: 70910-900

E-mail: mauriciomacedo@unb.br

Cléia Nunes Malheiro de Oliveira

Mestranda em Gestão Pública – Universidade de Brasília - UnB
Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília-DF. CEP: 70910-900

E-mail: cleianunesm@gmail.com

RESUMO

A mastite é uma inflamação no úbere ou glândulas mamárias, de etiologia complexa, infecciosa ou não infecciosa, e multifatorial, resultante da interação entre o animal, ambiente e agentes etiológicos. Essa é classificada de acordo com as manifestações clínicas, ou seja, caso os sinais de inflamação sejam evidentes, é chamada de ‘mastite clínica’, em contrapartida, quando os sinais não são evidentes, é denominada de ‘mastite subclínica’. É uma doença responsável por um grande impacto econômico na pecuária leiteira, resultado da diminuição da produção de leite e da sua qualidade, além de gastos com a terapêutica, serviço médico veterinário, descarte de animais e sanções devido a um nível elevado de células somáticas no leite. Foram utilizados dados relativos às amostras de mastite recebidas e processadas no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da FAV/UnB, provenientes de diferentes rebanhos do DF e Entorno, referentes aos anos de 2008 e 2009, 2013 a 2015 e 2017 a 2019, totalizando oito anos de análise. Foram isolados 218 microrganismos, classificados como: *Staphylococcus* sp. Coagulase Negativos (SCN) (67/218), *Escherichia coli* (32/218), *Streptococcus* sp. (24/218), *Staphylococcus aureus* (20/218) and *Corynebacterium* sp (20/218), *Bacillus* sp - (17/218), *Klebsiella* sp (10/218), *Enterobacter* sp. (6/2018), *Proteus* sp. (5/218), *Staphylococcus gallinarum* (3/218), *Hafnia alvei* (2/218), *Pseudomonas* sp (2/218), *Staphylococcus lentus* (2/218), *Bordetella* sp (1/218), *Flavobacterium* sp. (1/218), *Pasteurella* sp. (1/218), *Salmonella* sp. (1/218), *Serratia* sp. (1/218), *Streptococcus bovis* (1/218), *Micrococcus* sp. (1/218), *Staphylococcus epidermidis* (1/218).

Os testes de susceptibilidades demonstraram altas taxas de resistência para antibacterianos bastante utilizados na rotina clínica, como exemplo a taxa de 40% à Gentamicina e de 72,73% à sulfametoxazol e trimetoprim que sabidamente apresentavam valores abaixo de 5%. Com isso, é importante ter o conhecimento do perfil de resistência do caso de mastite para melhor tratamento clínico da afecção. Os dados demonstram que por serem amplamente utilizados no tratamento clínico, podem ter induzido resistência ao longo do tempo. Além da Gentamicina, os antibacterianos sulfametoxazol e trimetoprim (SUT) e Ampicilina e Sulbactam (ASB) obtiveram taxas de resistência elevada ao passar dos anos sendo as maiores testadas pelo método de Kirby-Bauer, baseado em difusão em Ágar. o perfil de resistência do *Staphylococcus* sp. Coagulase Negativos, tiveram resposta satisfatória de sensibilidade à Cefalexina (94,44%), Oxacilina (94,44%), Ampicilina +. Sulbactam (54,55%), Cloranfenicol (100%), Amoxicilina (83,33%), Gentamicina (60%), Doxiciclina (77,78%) e Ceftriaxona (52,94%). Poucas amostras apresentaram resultados relevantes, entre elas se destaca a resistência ao Sulfametoxazol e trimetoprim totalizando 72,73%, Ampicilina +. Sulbactam (45,45%) e Gentamicina (40%) Para Ceftriaxona, foi encontrado 47,06% de amostras intermediárias. As *Escherichia coli* isoladas obtiveram o percentual de resistência à tetraciclina de 100%, para os anos de 2008, 2009 e 2013, e 80% para as amostras de 2010. Em relação a Neomicina, foi observado um percentual de resistência, nos anos de 2008, 2010 e 2013, respectivamente, igual a 50%, 86,6% e 100%. A Amoxicilina associada ao Clavulanato apresentou resultados de resistência iguais a: 0%, 50%, 31,25%, 0% e 100%, referentes aos anos de 2008, 2009, 2010, 2013 e 2015. Denota-se resultado alarmante, também em *Streptococcus* spp testados para Gentamicina, expondo 100% de resistência em 2009 e 61,91 em 2010, bem como para Tetraciclina em 2009 e 2010, sendo 100% e 49,99% respectivamente. Em relação à cefalexina, os resultados foram: 100%, 0% e 36,3%, relativos aos anos de 2008, 2009 e 2010, respectivamente. O *Corynebacterium* sp. obteve os seguintes percentuais de resistência ao Enrofloxacino: 0%, 45,46%. 50%, 100%, referentes aos anos de 2008, 2009, 2010 e 2015, respectivamente. Em relação a Gentamicina, os resultados foram: 0%, 63,64% e 83,84%, referentes aos anos de 2008, 2009 e 2010, respectivamente. No tocante a

Neomicina, os resultados obtidos são: 0%, 100% e 83,34%, relativos aos anos de 2008, 2009 e 2010.

A prevenção é definitivamente a forma mais eficaz de combater a presença da doença nos rebanhos, principalmente quando se considera os custos que a mastite pode trazer para uma propriedade e o aspecto da saúde pública. É importante manter altos níveis de higiene nos animais, no ambiente e nos trabalhadores da propriedade, proibir o contato entre espécies (cachorro e gatos, por exemplo), controle dos níveis de mosca no ambiente. Além disso, o uso de estratégias como a terapia da vaca seca são valiosas. Um dos objetivos deste estudo foi elaborar um questionário que pudesse ser aplicado no Distrito Federal e Entorno para avaliar os fatores de risco baseado na literatura pesquisada.

Palavras-Chave: Mastite, Bovina, Microrganismos, Identificação, Fatores de Risco, Prevenção, Resistência, Antibiótico, Distrito Federal.

ABSTRACT

Mastitis is an inflammation of the udder or mammary glands, of complex etiology, infectious or non-infectious, and multifactorial, resulting from the interaction among the animal, environment and etiological agents. It is classified according to its clinical manifestations, that is, if the signs of inflammation are evident, it is called "clinical mastitis", on the other hand, when the signs are not evident, it is called "subclinical mastitis". It is a disease responsible for a great economical impact in dairy cattle breeding, resulting in the decrease of milk production and quality, besides the expenses with therapy, veterinary medical service, culling of animals and sanctions due to a high level of somatic cells in milk. Data regarding mastitis samples received and processed in the Veterinary Medical Microbiology Laboratory of FAV/UnB, from different herds of the DF and surroundings, referring to the years 2008 and 2009, 2013 to 2015 and 2017 to 2019, totaling eight years of analysis, were used. A total of 218 microorganisms were isolated, classified as: Coagulase Negative Staphylococcus sp. (67/218), Escherichia coli (32/218), Streptococcus sp. (24/218), Staphylococcus aureus(20/218) and Corynebacterium sp (20/218), Bacillus sp - (17/218), Klebsiella sp (10/218), Enterobacter sp. (6/2018), Proteus sp. (5/218), Staphylococcus gallinarum (3/218), Hafnia alvei (2/218), Pseudomonas sp (2/218), Staphylococcus lentus (2/218), Bordetella sp (1/218), Flavobacterium sp. (1/218), Pasteurella sp. (1/218), Salmonella sp. (1/218), Serratia sp. (1/218), Streptococcus bovis (1/218), Micrococcus sp. (1/218), Staphylococcus epidermidis (1/218).

Susceptibility tests showed high rates of resistance to antibacterials widely used in clinical routine, for example, the rate of 40% to Gentamicin and 72.73% to sulfamethoxazole and trimethoprim, which were known to be below 5%. Thus, it is important to have the knowledge of the resistance profile of the mastitis case for a better clinical treatment of the disease. The data show that because they are widely used in clinical treatment, they may have induced resistance over time. Besides Gentamycin, sulfamethoxazole and trimethoprim (SUT) and Ampicillin and Sulbactam (ASB) antibacterials had high resistance rates over the years, the highest ones being tested by the Kirby-Bauer method, based on agar diffusion. The resistance profile of Coagulase Negative Staphylococcus sp. had satisfactory sensitivity response to Cephalexin (94.44%), Oxacillin (94.44%), Ampicillin +. Sulbactam (54.55%), Chloramphenicol (100%), Amoxicillin (83.33%), Gentamicin (60%), Doxycycline (77.78%) and Ceftriaxone (52.94%). Few samples showed relevant results, among them stands out the resistance to Sulfamethoxazole and trimethoprim totaling 72.73%, Ampicillin +. Sulbactam (45.45%) and Gentamicin (40%) For Ceftriaxone, 47.06% of intermediate samples were found. The Escherichia coli

isolates obtained the percentage of resistance to tetracycline of 100%, for the years 2008, 2009 and 2013, and 80% for the samples of 2010. Regarding Neomycin, a percentage of resistance was observed in the years 2008, 2010, and 2013, respectively, equal to 50%, 86.6%, and 100%. Amoxicillin associated with Clavulanate showed resistance results equal to: 0%, 50%, 31.25%, 0% and 100%, referring to the years 2008, 2009, 2010, 2013 and 2015. There were also alarming results in *Streptococcus* spp tested for Gentamicin, showing 100% resistance in 2009 and 61.91 in 2010, as well as for Tetracycline in 2009 and 2010, being 100% and 49.99% respectively. Regarding cephalexin, the results were 100%, 0% and 36.3% for 2008, 2009 and 2010, respectively. The *Corynebacterium* sp. obtained the following percentages of resistance to Enrofloxacin: 0%, 45.46%, 50%, 100%, referring to the years 2008, 2009, 2010 and 2015, respectively. Regarding Gentamicin, the results were: 0%, 63.64% and 83.84% for the years 2008, 2009 and 2010, respectively. Regarding Neomycin, the results obtained are: 0%, 100% and 83.34% for the years 2008, 2009 and 2010.

Prevention is definitely the most effective way to combat the presence of the disease in herds, especially when considering the costs that mastitis can bring to a property and the public health aspect. It is important to maintain high levels of hygiene for the animals, the environment, and the workers on the property, prohibit contact between species (dogs and cats, for example), control fly levels in the environment. In addition, the use of strategies such as dry cow therapy are valuable. One of the objectives of this study was to develop a questionnaire that could be applied in the Federal District and surrounding area to assess the risk factors based on the literature researched.

Keywords: Mastitis, Bovine, Microorganisms, Identification, Risk Factors, Prevention, Resistance, Antibiotic, Federal District.

1 INTRODUÇÃO

O leite tem sua importância cultural e nutricional, mas nas últimas décadas observou-se um crescente debate sobre seus possíveis malefícios, como a alta proporção de ácidos graxos saturados e a baixa proporção de ácidos graxos poli-insaturados e o papel que esses ácidos graxos, isômeros de ácido linoleico conjugado (CLA), entre outros, afetariam a saúde (Gurr 1999; Chilliard & Ferlay 2004). Apesar das muitas incertezas em relação aos benefícios e malefícios do leite no corpo humano, alguns estudos epidemiológicos associam o leite com prevalência reduzida de doenças cardíacas, derrame e câncer – este último sendo associado com o CLA (Gurr 1999; Chilliard & Ferlay 2004), além da estimulação de fatores de crescimento como IGF-1 – cujo aumento foi observado como benéfico para a saúde óssea –, é uma boa fonte proteica e possui vitaminas, além de ajudar no crescimento infantil por conta da energia por ele provida, resultando em efeitos mínimos no peso corporal do indivíduo (Heaney et al. 1999; Dror & Allen 2011).

A pecuária bovina é uma base muito importante do agronegócio brasileiro, contribuindo fortemente para a economia nacional (Brasil 2014). Com a mastite sendo a doença mais onerosa da indústria de laticínios (Pyörälä 2002), é caracterizada por perdas drásticas quando a porcentagem de animais infectados é expressiva, além do prejuízo com descarte desses animais (da Costa 1998). Segundo o Anuário do Leite (2019), as mastites subclínicas representam 70% do total de perdas. Os prejuízos econômicos estão relacionados à diminuição da quantidade de leite produzido e de sua qualidade, afetando também o rendimento dos derivados do leite, como queijos e iogurtes. Além disso, incluem-se os custos da mão de obra, tratamento, descarte prematuro de animais, descarte de leite devido ao período de carência dos medicamentos, secagem prematura, perda de quartos mamários e morte. Segundo Demeu et al. (2011), o impacto econômico da mastite por vaca em lactação variou de R\$1.559,97 a R\$1.649,67. Dessa forma, é uma das principais causas do descarte de vacas leiteiras, onde, de acordo com Lemos et. al (1996), englobou 18,8% dos descartes, só sendo inferior à taxa de descarte por problemas reprodutivos, que representou 27,1% do total.

Além disso, a cadeia produtiva de leite e derivados apresenta um impacto significativo na economia nacional. Segundo os dados do Anuário do Leite (2019), produzido pela Embrapa Gado de Leite, o Brasil ocupava o terceiro lugar de produção de leite de vaca em 2016 e 2017, produzindo, respectivamente 33,7 e 33,5 milhões de toneladas de leite. Além disso, a cadeia produtiva leiteira conta com um faturamento de 67 bilhões (relativos ao ano de 2016), e agrega 1,3 milhões de produtores de leite, quatro milhões de trabalhadores, 11 mil transportadores e cerca de duas mil indústrias laticinistas legalizadas. Somado a isso, é evidente a importância desse setor para desenvolvimento socioeconômico regional, estadual e local. Segundo o Censo Agropecuário de 2017, realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção brasileira de leite bovino foi de 30 bilhões de litros, enquanto a produção de leite do Distrito Federal correspondeu a 20 milhões de litros. De acordo com artigo escrito por Maia et al. (2013), e publicado pelo Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES), as pequenas e médias propriedades apresentam uma importância muito grande para a produtividade brasileira. Dentre elas, a produção familiar foi responsável por 58% da produção total de leite.

A doença é classificada em três tipos de acordo com a forma de apresentação (severidade da inflamação) e seu grau depende de inúmeros fatores, como: raça, idade, estado imunológico e fase de lactação do animal (Srivastava & Kumaresan 2015; de Sá

et al. 2018). Portanto, a mastite pode ser: **subclínica** (ausência de inflamação bruta no tecido mamário de forma macroscópica em conjunto com mudanças na composição do leite e diminuição da produção, ocasionada por danos na capacidade funcional da glândula), **clínica** (se apresenta na glândula mamária com sinais clássicos de uma inflamação – dor, edema, endurecimento, elevação da temperatura – e anormalidades no leite, como grumos visíveis e pus) e **crônica** (caracterizada por um processo inflamatório persistente, podendo perdurar por anos, podendo continuar de uma lactação para outra e com características físicas que variam de atrofia, fibrose nos quartos mamários que foram acometidos, entre outros) (Ribeiro et al. 2003; Benedette et al. 2008; Coser et al. 2012 apud Dias 2007; Kibebew 2017; de Sá et al. 2018). A evolução da lesão para mastite gangrenosa se dá por conta das toxinas secretadas pelas bactérias no tecido, onde o mesmo macroscopicamente apresenta coloração alterada (em tons frios como o azul), com falta de sensibilidade e com a temperatura diminuída em relação ao corpo do animal (Coser et al. 2012; Zachary & McGavin 2012).

Segundo Hawari e Al-dabbas (2008) mais de 135 microrganismos distintos foram isolados de infecções intramamárias em bovinos. De acordo com Blowey & Edmondson (1995), os microrganismos causadores de mastite podem ser classificados como “ambientais” e “contagiosos (ou infecciosos)”, de acordo com a fonte de infecção e sua disseminação. Os microrganismos classificados como contagiosos (ou infecciosos) são adaptados para sobreviver no interior da glândula mamária e podem ser encontrados, também, na superfície dos tetos. Nesse caso, a principal fonte de infecção para o rebanho é o úbere, de modo que a disseminação da mastite pode ocorrer de um quarto mamário infectado para o outro ou de vaca para vaca, por exemplo, durante a ordenha. Os microrganismos contagiosos mais descritos são: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, algumas espécies de *Mycoplasma* sp. e *Corynebacterium bovis* (Jeong et al., 2012., Acosta et al., 2016). Os microrganismos classificados como “ambientais” são oportunistas e a principal fonte de infecção são elementos presentes no ambiente, como o solo, fezes, urina, água contaminada e afins. Esses microrganismos encontram condições adequadas para o seu desenvolvimento nas glândulas mamárias, se multiplicando e causando a infecção. Os microrganismos ambientais mais descritos são: *Staphylococcus coagulase-negativo* (CNS), *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, algumas espécies de *Streptococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia asteroides*, *Prototheca* spp, *Candida* spp. (Jeong et al., 2012., Acosta et al., 2016).

A contagem de células somáticas é um parâmetro muito importante para a prevenção e controle da mastite, onde o limite a partir do qual pode-se considerar uma provável infecção por patógeno são valores de $> 200 \times 10^3$ células/mL, quando avaliando vacas leiteiras, de acordo com Sheldrake et al. (1983). Avalia-se, assim, o risco de uma possível mastite, quando apresenta valores muito baixos – que de acordo com Schukken et al. (1999), valores baixos de CCS tiveram associação com riscos maiores de infecção em seu estudo – ou muito altos – Barkema et al. (1997) relata uma associação entre valores altos de CCS e infecções intramamárias. Além disso, valores de CCS são úteis para diagnosticar focos da mastite subclínica, sendo um indicador importante para avaliar também a possibilidade de transmissão entre animais, seja por intermédio do contato manual do ordenhador ou pela disposição da linha de ordenha em si (Barbosa et al. 2009). Além do CCS, outra forma conhecida de avaliar a saúde do úbere é por meio do “California Mastitis Test”, que é realizado a campo e tem como objetivo a avaliação da quantidade de células somáticas presentes no leite por meio do rompimento da membrana celular pelo detergente aniônico, fazendo com que o ácido nucleico e a membrana das células somáticas dêem uma viscosidade ao leite comparável à de gel, sendo esse resultado associado com a incidência de patógenos que mediam a mastite (Ribeiro Júnior et al. 2008; Srivastava & Kumaresan 2015). Em um estudo conduzido por Steeneveld et al. (2008), foi observado que uma forma de melhorar o diagnóstico da mastite é quantificar as células somáticas mensalmente. Já foi relatada na literatura a correlação positiva entre os valores de CCS e o teste CMT, sendo bastante úteis também no período inicial da lactação pela identificação de grandes patógenos causadores da mastite nos quartos mamários, com finalmente o CMT sendo descrito como um teste útil para o diagnóstico da mastite subclínica nos rebanhos (Sargeant et al. 2001; Barbosa et al. 2002; de Sá et al. 2018).

Sabe-se que antibióticos do grupo dos beta-lactâmicos, são usados muitas vezes como primeira escolha no tratamento da mastite, assim sendo importante ressaltar que o uso como primeira escolha de cefalosporinas de terceira ou quarta geração e outros tipos de medicamentos de amplo espectro deve ser evitada, com a recomendação do uso de antibióticos de baixo espectro, principalmente dos que tiverem uma boa capacidade de difusão pelo tecido mamário (Srivastava & Kumaresan 2015; Ali et al. 2016). Os autores Srivastava & Kumaresan (2015) também citam que o uso de antibióticos de pequeno espectro são os mais indicados, associados com melhor difusão no tecido mamário, além da atenção à via de administração escolhida, tendo como opções a parenteral, infusão

intramamária, entre outras. Além disso, é preciso bastante cuidado no momento da inserção da cânula na administração de antibióticos intramamários, porque a inserção total pode contribuir para a entrada de bactérias adicionais na cisterna da glândula mamária por conta do aumento do canal do lúmen (Coentrão 2008). Em um estudo sobre a qualidade do leite no Distrito Federal (DF) foi relatada a ausência de resíduos de antimicrobianos no leite analisado, apesar de não ser possível afirmar que o resultado obtido não foi por conta de um efeito de diluição, tornando os resíduos não detectáveis (Portz 2011).

O período de secagem das vacas tem como característica a maior suscetibilidade a infecções intramamárias, fato que tornou comum a prática da terapia da vaca seca das propriedades, diminuindo-se assim as chances de os animais desenvolverem mastite na lactação seguinte pela inserção no canal do teto de medicamentos antibióticos, popularmente feita em todos os quartos mamários, havendo relatos de que tal prática ajuda a evitar a infecção dos quartos mamários não afetados de uma vaca que possui a infecção em outros quartos (Browning et al. 1990; Webster 2020). Como consequência de tal prática, pode-se apontar a resistência bacteriana da microbiota desses animais, tornando-se uma preocupação a nível de saúde pública, já que esses patógenos podem chegar aos seres humanos consumidores de produtos de origem animal (Berry & Hillerton 2002). Além do uso de antimicrobianos isolados, a literatura elucida que o uso da infusão de antibióticos na terapia da vaca seca em conjunto com o uso de selantes intramamários traz benefícios quando se trata de animais com mastite clínica apresentando altos valores de CCS, adicionalmente havendo a recomendação do uso dos selantes com antibióticos a base de água ao invés dos à base de óleo, para evitar a perda do selante (Bradley et al. 2010). Baseado no risco de resistência antimicrobiana, houve um crescimento na popularidade da terapia da vaca seca seletiva, que se baseia em colocar apenas o selante em vacas com CCS abaixo de 200×10^3 , e em vacas com CCS acima desse valor recebem o selante e a infusão de antibióticos, entretanto, essa técnica ainda necessita de mais estudos para que se possa afirmar com certeza sua superioridade em relação à forma tradicional (Webster 2020). Apesar disso, a terapia da vaca seca seletiva é um método que deve ser levado em conta no quesito da redução do uso de antimicrobianos nos animais (Lipkens et al. 2019).

A resistência aos antimicrobianos (AMR, sigla referente a expressão em inglês, antimicrobial resistance) é uma problemática emergente e que permeia os debates e diretrizes de saúde pública no mundo. A AMR ocorre quando microrganismos, como

bactérias, vírus e fungos, sofrem alterações ao longo do tempo e as medicações que antes exerciam efeito terapêutico sobre eles tornam-se ineficazes (WHO, 2021). O uso de antibióticos é um fator preocupante para a saúde pública, considerando os riscos de resíduos no leite acabarem alcançando os consumidores e a seleção de bactérias resistentes aos antibióticos que podem acabar entrando em contato com os humanos, como já foi relatado anteriormente por Fey et al. (2000). Tendo isso em mente, uma forma de controlar os casos de mastite sem fazer o uso de antibióticos se faz por meio da prevenção da infecção, que é composta por vários fatores como aumentar a resistência do hospedeiro, diminuir as oportunidades de contato e a quantidade de bactéria sendo disseminada (Klaas & Zadoks 2018). No Brasil, há relatos de alta frequência de *Staphylococcus* spp multirresistentes. Nos estados da Bahia e Pernambuco, foram evidenciados que 65% dos *Staphylococcus* spp isolados foram resistentes a três ou mais antibacterianos e no Goiás, 100% das amostras apresentaram resistência a oxacilina, penicilina e ampicilina (Acosta et al, 2016). O antibacteriano atua como agente de seleção dos microrganismos resistentes à exposição a tal classe do fármaco (Trabulsi; Alterthum, 2004). A bactéria desenvolve resistência a partir do surgimento ou aquisição de um gene que confere alteração no mecanismo de ação de determinados antibacterianos. As aquisições desses genes são advindas de processos conhecidos por conjugação, transdução, transformação ou transposição. Na conjugação a transferência é por intermédio do pilus sexual, sendo o DNA plasmidial geralmente transferido. Quando há a presença de um bacteriófago, o mecanismo recebe o nome de transdução. Na transposição a aquisição de resistência é desenvolvida pelos elementos transponíveis (transposons), que são elementos móveis do genoma bacterianos. A bactéria pode também captar matéria genética do meio, pelo processo de transformação (Quinn et al, 2005).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Plano de Trabalho. Foram utilizados dados relativos às amostras de mastite recebidas e processadas no Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da FAV/UnB, provenientes de diferentes rebanhos do DF e Entorno, referentes aos anos de 2008 e 2009, 2013 a 2015 e 2017 a 2019, totalizando oito anos de análise. Devido às restrições de circulação nas dependências do laboratório e respeito às medidas de isolamento social, não foi possível concluir as análises dos anos não citados.

Somado a isso, foi realizada uma revisão bibliográfica a fim de reunir informações suficientes para o entendimento dos fatores de risco associados à doença e que permitam a elaboração de um modelo de questionário que poderá ser utilizado em propriedades, como instrumento acessório à prevenção da doença..

Coleta de amostras. Segundo o procedimento operacional padrão do laboratório, todas as amostras foram coletadas após exame clínico do úbere pela inspeção das glândulas mamárias e exame dos três primeiros jatos de leite em caneca de fundo negro, para detecção de mastite clínica, bem como o California Mastitis Test[®] (CMT) e o para a detecção de mastite subclínica. Nos casos de positividade entre 2 e 3 cruces no teste CMT e nos casos de mastite clínica, foram colhidas amostras de 10mL em tubos estéreis devidamente identificados, após a lavagem prévia das glândulas com água e sabão, secagem com papel toalha e desinfecção do óstio do teto com álcool etílico a 70° GL. Após acondicionamento sob temperatura de refrigeração, foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da FAV/UnB.

Análises microbiológicas. As amostras sofreram incubação dos tubos contendo as amostras de leite à 37°C overnight, e após o período acima citado, as amostras foram semeadas em Ágar sangue (MERCK[®]) contendo 7% de sangue de carneiro e incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período, as amostras de leite foram inoculadas em placas contendo Agar sangue, que foram em seguida incubadas em aerobiose a 37°C por 24 a 48 horas.

Após o crescimento de colônias, as características de crescimento das mesmas, como produção de hemólise, pigmento e características morfo-tintoriais com a metodologia Gram foram relacionadas para o processo de identificação dos microorganismos, bem como foi procedida a identificação bioquímica das amostras de acordo com Quinn et al. (2005).

O laboratório de Microbiologia Médica Veterinária dispunha de todo o aparato para o cultivo, isolamento e identificação bioquímica, como meios de cultura enriquecidos, meios de diagnóstico presuntivo e meios de diagnóstico bioquímico, estufas, autoclaves, bicos de Bunsen, vidrarias, potenciômetros, bem como reagentes e outros utensílios para o alcance dos objetivos enunciados.

Antibiograma: Os antibiogramas foram realizados por meio da técnica de difusão disco-ágar (método de Kirby-Bauer), no qual os discos impregnados com antimicrobianos são posicionados em uma placa de petri contendo o meio de cultura Ágar Mueller-Hinton, previamente inoculado com as bactérias identificadas. A escolha dos antimicrobianos foi

realizada de acordo com a identificação bacteriana, disponibilidade de discos de antibiótico e critério clínico dos médicos-veterinários responsáveis por cada caso.

Revisão bibliográfica. A seleção das publicações utilizadas foi feita visando trabalhos que abordassem tópicos, no tema geral da mastite bovina, que envolvessem definições da doença de uma forma geral, seus graus de severidade, etiologia, informações gerais sobre a importância do leite, cadeia e importância econômica entre outros, além de fatores epidemiológicos específicos da mastite bovina – higiene das tetas, do equipamento utilizado na cadeia de produção e do ambiente em que os animais estão inseridos, o uso de testes diagnósticos como CMT, o uso de linha de ordenha, assistência técnica, etc., que é o foco do atual trabalho. A partir disso, os pontos mais importantes foram adicionados ao questionário.

A pesquisa das publicações foi feita por meio da plataforma Google Scholar (<https://scholar.google.com.br/>), SciELO (<https://scielo.org/>) e PubMed Central (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). As palavras-chave utilizadas na pesquisa, tanto em conjunto como individuais, em português foram: bovinos, mastite bovina, bovinos de leite, vacas leiteiras, bovinocultura, mastite subclínica bovina, mastite clínica bovina, mastite em novilhas, ordenhadeira, ordenha, glândula mamária, úbere, mamite, etiologia, células somáticas, contagem bacteriana, fatores de risco, epidemiologia, CMT, resistência antimicrobiana, antibiograma, tipos de ordenha, qualidade higiênica do leite, embrapa, diagnóstico, controle, prevenção, desinfetantes, produção leiteira, bezerro, oxitocina, etiologia. A pesquisa feita em inglês utilizou os mesmos termos.

Análise de dados. Os dados coletados a partir dos registros oficiais do laboratório de Microbiologia Médica-Veterinária e tabulados e analisados utilizando o software Microsoft Office Excel 2016[®]. A análise descritiva dos resultados se encontra na **tabela 1 e gráfico 1**.

3 RESULTADOS

Identificação dos microrganismos

Dentro do período de análise, foram cultivados, isolados e identificados um total de 218 microrganismos oriundos de amostras de leite coletadas de animais com mastite clínica e subclínica de diversos rebanhos do Distrito Federal e entorno. Na **tabela 1** são apresentados os resultados obtidos a partir da análise do banco de dados referente às amostras processadas no período citado. Os microrganismos isolados foram identificados em nível de gênero ou espécie, quantificados e classificados como patógenos

“ambientais” ou “contagiosos”, de acordo com as características das bactérias e a fonte de infecção. Somado a isso, os microrganismos foram divididos quanto a estação no qual as amostras foram coletadas, a saber, estação seca e chuvosa, de acordo com caracterização das estações proposta na publicação online O Cerrado (2012), produzido pela Embrapa Cerrados. Os microrganismos mais isolados foram: Staphylococcus sp. Coagulase Negativos (SCN) (67/218), Escherichia coli (32/218), Streptococcus sp. (24/218), Staphylococcus aureus (20/218) and Corynebacterium sp (20/218), Bacillus sp - (17/218).

Tabela 1. Frequência absoluta de microrganismo isolados a partir de amostras de leite de animais com mastite, coletadas na estação chuvosa e seca, no Distrito Federal e Entorno.

Microrganismos isolados	Frequência Absoluta		Total
	Estação Seca (Maio a Setembro)*	Estação Chuvosa (Outubro a Abril)*	
Bacillus sp.	16	1	17
Bordetella sp.	0	1	1
Enterobacter sp.	6	0	6
Escherichia coli	16	16	32
Flavobacterium sp.	1	0	1
Hafnia alvei	2	0	2
Ambientais Klebsiella sp.	5	5	10
Pasteurella sp.	1	0	1
Proteus sp.	2	3	5
Pseudomonas sp.	1	1	2
Salmonella sp.	1	0	1
Serratia sp.	0	1	1
Streptococcus bovis	1	0	1
Sub-total	52	28	80
Corynebacterium sp.	13	7	20
Micrococcus sp.	0	1	1
Staphylococcus sp. (SCN)	33	34	67
Contagiosos Staphylococcus aureus	8	12	20
Staphylococcus lentus	2	0	2
Staphylococcus epidermidis	1	0	1
Staphylococcus gallinarum	3	0	3
Streptococcus sp.	8	16	24
Sub-total	68	70	138
Total	120	98	218

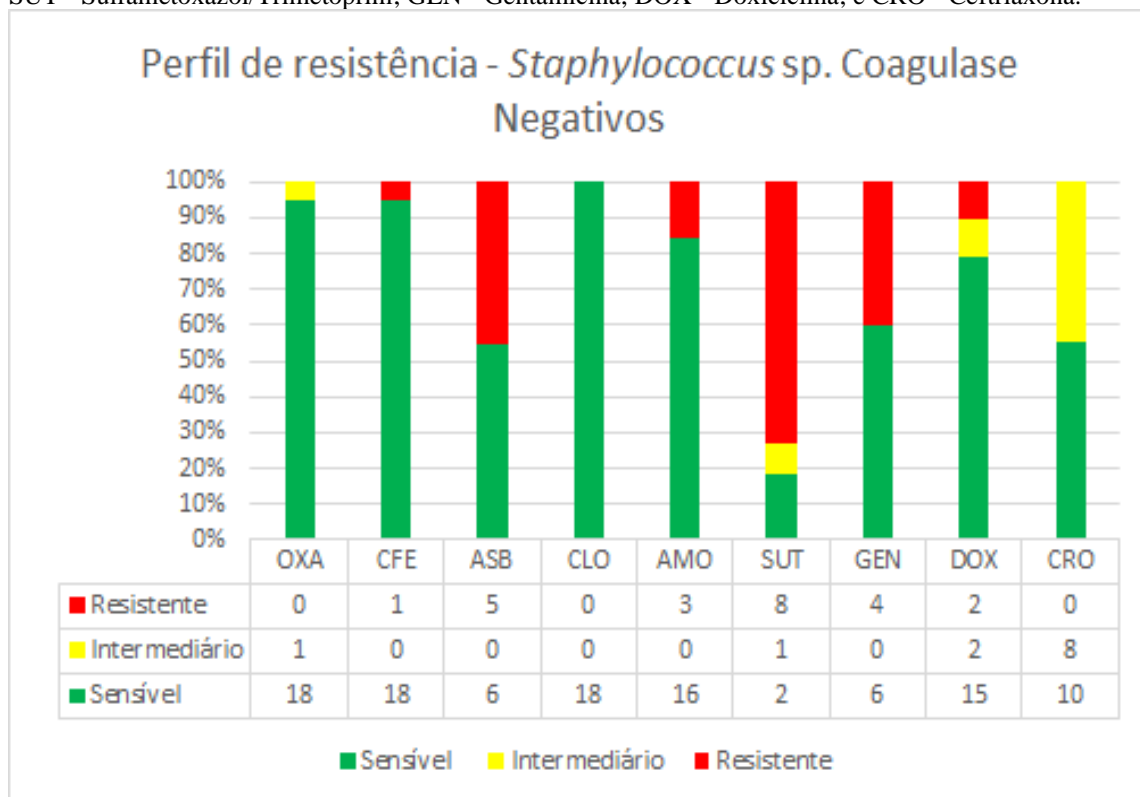
Elaboração do questionário para avaliação dos fatores de risco.

A partir das observações feitas em relação a epidemiologia da mastite, foi desenvolvido um questionário a ser usado em propriedades de rebanho leiteiro para avaliar os fatores de risco presentes nas mesmas em relação à doença estudada. O mesmo se encontra no **Anexo**.

Resistência aos antimicrobianos

Como exposto no gráfico a seguir, o perfil de resistência do *Staphylococcus sp. Coagulase Negativos*, tiveram resposta satisfatória de sensibilidade à Cefalexina (94,44%), Oxacilina (94,44%), Ampicilina + Sulbactam (54,55%), Cloranfenicol (100%), Amoxicilina (83,33%), Gentamicina (60%), Doxiciclina (77,78%) e Ceftriaxona (52,94%). Poucas amostras apresentaram resultados relevantes, entre elas se destaca a resistência ao Sulfametoxazol e trimetoprim totalizando 72,73%, Ampicilina + Sulbactam (45,45%) e Gentamicina (40%) Para Ceftriaxona, foi encontrado 47,06% de amostras intermediárias.

Gráfico 1 - Perfil de resistência dos *Staphylococcus sp. Coagulase Negativo*. Abreviações: OXA - Oxacilina; CFE - Cefalexina; ASB - Ampicilina + Sulbactam; CLO - Cloranfenicol; AMO - Amoxicilina; SUT - Sulfametoxazol/Trimetoprim; GEN - Gentamicina; DOX - Doxiciclina; e CRO - Ceftriaxona.



As *Escherichia coli* isoladas obtiveram o percentual de resistência à tetraciclina de 100%, para os anos de 2008, 2009 e 2013, e 80% para as amostras de 2010. Em relação

a Neomicina, foi observado um percentual de resistência, nos anos de 2008, 2010 e 2013, respectivamente, igual a 50%, 86,6% e 100%. A Amoxicilina associada ao Clavulanato apresentou resultados de resistência iguais a: 0%, 50%, 31,25%, 0% e 100%, referentes aos anos de 2008, 2009, 2010, 2013 e 2015. Denota-se resultado alarmante, também em *Streptococcus* spp testados para Gentamicina, expondo 100% de resistência em 2009 e 61,91 em 2010, bem como para Tetraciclina em 2009 e 2010, sendo 100% e 49,99% respectivamente. Em relação à cefalexina, os resultados foram: 100%, 0% e 36,3%, relativos aos anos de 2008, 2009 e 2010, respectivamente. O *Corynebacterium* sp. obteve os seguintes percentuais de resistência ao Enrofloxacino: 0%, 45,46%. 50%, 100%, referentes aos anos de 2008, 2009, 2010 e 2015, respectivamente. Em relação a Gentamicina, os resultados foram: 0%, 63,64% e 83,84%, referentes aos anos de 2008, 2009 e 2010, respectivamente. No tocante a Neomicina, os resultados obtidos são: 0%, 100% e 83,34%, relativos aos anos de 2008, 2009 e 2010.

4 DISCUSSÃO

Microrganismos isolados

No estudo realizado por Pardo et al. (1999), em Arapongas (PR), foram isolados e identificados 177 microrganismos, dos quais 95 (53,67%) foram identificados como *Staphylococcus* spp. Dentre os estafilococos, 85 foram classificados como coagulase negativos (CNS), representando 48,02% do total de microrganismos. De modo semelhante, na análise realizada por Felippsen et al. (1999), no norte do Paraná, os *Staphylococcus* spp. coagulase negativos representaram 31,97% dos microrganismos identificados, presentes em 211 amostras. Nos resultados obtidos por Laffranchi et al. (2001), no norte do Paraná, foram isolados 316 (69,14%) do total de microrganismos isolados) *Staphylococcus* spp. coagulase negativos. Desse modo, pode-se observar que o número de CNS isolados nos estudos supracitados variou de 31,97% a 69,14% dos microrganismos isolados nas amostras, números superiores aos 30,73% identificados neste estudo. Desse modo, esses resultados indicam uma prevalência elevada de mastites causadas pelos SCN, demonstrando a emergência desse grupo de microrganismos que antes eram considerados patógenos de menor importância, como exposto por Taponen et al. (2006), Pyorala e Taponen (2009), e Thorberg et al. (2009).

Tradicionalmente, quando comparados com outros microrganismos causadores de mastite bovina, tais como o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp e enterobactérias, os *Staphylococcus* coagulase negativos (CNS) eram considerados como patógenos de

menor significado clínico. Isso ocorre, pois, em geral, as mastites causadas por esses são subclínicas ou levemente clínicas. Em contrapartida, essas infecções causam prejuízos econômicos devido à redução da produção de leite e aumento da contagem de células somáticas (CCS), acarretando em multas, devido a diminuição da qualidade do leite (Pyorala e Taponen (2009)).

No trabalho de Fontana et al. (2010), citado por Acosta (2016), realizado na região do Centro-Oeste, a frequência de *Streptococcus* sp e *Corynebacterium* sp foram superiores aos relatados no presente estudo, respectivamente, 19,7% e 35,6%. Desse modo, de acordo com Pardo et al. (1999), a frequência de isolados de *Corynebacterium* sp. (12,06%), considerando os casos de mastite clínica e subclínica, foi ligeiramente superior aos nossos resultados. Em contrapartida, os resultados obtidos por Cunha et al. (2016), a frequência de isolados de *E. coli* foi ligeiramente menor e a frequência de *Corynebacterium* sp foi quase duas vezes menor, se comparado aos nossos resultados, enquanto a prevalência de *Staphylococcus aureus* foi consideravelmente superior.

As mastites causadas por bactérias gram-negativas como *E. coli*, *Proteus* sp., *Pasteurella* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp, *Pseudomonas* sp. e *Serratia* sp. geralmente apresentam um curso clínico, com possibilidade de se agravar e representar um potencial risco à vida dos animais infectados. A infecção causada por esses microrganismos tende a ser mais grave devido às endotoxinas presentes na membrana celular dessas bactérias. Devido a resposta imune do hospedeiro, há destruição da membrana celular externa e conseqüentemente liberação das endotoxinas. O *Staphylococcus aureus* é um dos patógenos causadores de mastite mais prevalentes e é o agente causador da mastite gangrenosa, que apresenta uma alta taxa de mortalidade. O *Corynebacterium* sp. são microrganismos comensais considerados patógenos de menor importância como causadores de mastite e as infecções podem ser clínicas e subclínicas (Contreras; Rodríguez, 2011).

No presente estudo, 120 microrganismos do total de 218 foram isolados a partir de amostras coletadas na estação seca, representando 55,04% do total de microrganismos, dos quais 52 são classificados como patógenos ambientais e 68 como patógenos contagiosos. Em comparação com os isolados provenientes de amostras da estação chuvosa, com um total de 98 (45,95%) microrganismos isolados, dos quais 28 são microrganismos ambientais e 70 são microrganismos contagiosos. Nota-se uma diminuição considerável no número de microrganismos ambientais isolados na estação chuvosa, em comparação com a estação seca, entretanto não é possível concluir a causa

dessa variação, devido ao número limitado de informações disponíveis a respeito dos casos.

Nesse estudo, o perfil de resistência do *Staphylococcus* sp. Coagulase Negativos, tiveram resposta satisfatória de sensibilidade à Cefalexina (94,44%), Oxacilina (94,44%), Ampicilina + Sulbactam (54,55%), Cloranfenicol (100%), Amoxicilina (83,33%), Gentamicina (60%), Doxiciclina (77,78%) e Ceftriaxona (52,94%). Segundo Santos et al. (2011), o perfil de sensibilidade das cepas SCN demonstrou resistência de 28% à penicilina, 21% à estreptomicina, 18% à ampicilina e 14% à tetraciclina. Para cefalosporinas, gentamicina, novobiocina, cloranfenicol, nitrofurantoína, polimixina B, sulfametoxazol + trimetoprim e de neomicina + bacitracina + tetraciclina foi identificado índices de resistências abaixo de 5%. O Sulfametoxazol e trimetoprim foi o antibacteriano que obteve maior resistência, totalizando 72,73% das amostras testadas para tal fármaco, porém a Ampicilina + Sulbactam (45,45%) e Gentamicina (40%) também apresentaram resultados alarmantes. Poucas amostras apresentaram resultados intermediários relevantes, apenas para Ceftriaxona, que apresentou resultado relativamente alto de 47,06% de amostras intermediárias.

Analisando os dados do Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária do HVET-UnB, foi traçado o perfil de resistência aos antibacterianos de 2008, 2009, 2013, 2014, 2015, 2017 e 2019. O *S. aureus* obteve resultados resistentes para Oxacilina, Penicilina e Ampicilina no estado de Minas Gerais (MG – Brasil) em um estudo realizado por Lima et al., (2018). No mesmo estudo, para *E. coli*, foram resistentes 25% para Ampicilina, 30,8% para Cefalosporinas, 23% para Tetraciclinas e 7,7% para Sulfadiazina+Trimetoprim. Os resultados para a associação de Ampicilina+Sulbactam bem como Sulfametoxazol + Trimetoprim, encontrados por Soares et al. (2012), foram os antibacterianos mais efetivos. Santos et al., (2016) relatou que a maior resistência a penicilina foi observada em *S. aureus* e SCN ou há algum β -lactâmico utilizado amplamente em infusão intramamária no tratamento de mastite. Um tratamento bastante efetivo utilizado por vários clínicos é a infusão de 150mg de Sulfato de Gentamicina durante 3 dias. Portanto, esses resultados corroboram a hipótese de substituição desse princípio ativo no tratamento clínico de vacas com mastite. A Gentamicina apresentou resultados variáveis para *Staphylococcus* spp nos anos subsequentes à 2008. Assim, levantando a hipótese de utilizar outro princípio ativo para o tratamento de mastite. A resistência dos SCN foi mais crescente em comparação com o *S. aureus*, apresentando

18,7% de resistência há 3 ou mais antibacterianos. Dentre os resultados da pesquisa de Santos et al. (2016), 37% apresentaram resistência há pelo menos um antibiótico.

Fatores de risco

Acerca do questionário elaborado para avaliação dos fatores de risco da mastite, ressalta-se que vacas mais velhas (cerca de > 10 anos) têm maior probabilidade de serem afetadas pela mastite – especificamente a subclínica, além das características físicas desses animais nessa faixa etária, como elasticidade e maior diâmetro dos tetos (Rathore & Sheldrake 1977; Erb et al. 1985; Biffa et al. 2005). Ademais, a hiperqueratose severa dos tetos já foi associada com infecção de *S. aureus* nos tetos (Zadoks et al. 2001), além do fato de que tetos lesionados são uma porta de entrada para patógenos (Amaral et al. 2004). De forma geral, é possível dizer que úberes distantes do chão, com diâmetro de teta pequeno e tetos em formato de funil (ao invés de cilindro) são menos suscetíveis à mastite (Hickman 1964; Rathore 1976; Bakken 1981), sendo que vacas multíparas, em estágios iniciais de lactação (a hipocalcemia altera o fechamento correto do esfíncter do canal da teta) (Kimura et al. 2006 apud Curtis et al. 1983; Goff 2008; Contreras & Rodríguez 2011) e com altos valores de CCS possuem maior incidência da forma clínica, além do fato de que vacas que já tiveram a doença possuem maior risco de reinfecção (Zadoks et al. 2001; Steeneveld et al. 2008).

Em relação à higiene, em vacas mantidas em boas condições de higiene, o uso de pré e pós-dipping sem lavagens adicionais pode realizar a desinfecção dos tetos de forma adequada. Entretanto, se a lavagem for necessária – sendo que eficácia da desinfecção pré-ordemha tem menor eficácia quando aplicada em tetos sujos (Munoz et al. 2008) –, é de extrema importância a secagem adequada dos tetos, já que o gotejamento pode deslocar potenciais patógenos para o canal do teta (Srivastava & Kumaresan 2015). Além disso, a desinfecção das teteiras idealmente deve ser feita entre animais distintos por imersão em solução sanificante, que deve ser trocada sempre, não devendo as quatro ser imersas juntas (Müller 2002).

O sistema de criação intensivo e semi-intensivo foram associados ao maior aparecimento da doença, sendo facilitadores da disseminação dos agentes etiológicos (Acosta et al. 2016). Além da criação, o clima também é um fator de risco: as chances de contaminação por patógenos ambientais se torna elevada em alta temperatura e umidade, sendo que a umidade alta facilita a sobrevivência e proliferação de bactérias *S. aureus* (Singh & Ludri 2001; Zafalon et al. 2009; Srivastava & Kumaresan 2015). Ademais, o

manejo da cama é essencial: deve ser mantida livre de microrganismos, trocando seu material regularmente para evitar altos valores de CCS (Srivastava & Kumaresan 2015), evitar a presença de fezes e tomar cuidado com a reciclagem da mesma em uma mesma propriedade (Klaas & Zadoks 2018), tendo-se em mente que o uso de esterco reciclado não é indicado, sendo um meio de cultura para o crescimento bacteriano (Cerqueira et al. 2009; Husfeldt et al. 2012). Recomenda-se o uso de cama inorgânica, que se mostrou útil para a redução de novos casos de mastite por *Klebsiella* spp. (Kristula et al. 2005; Munoz et al. 2006). Além do cuidado com a presença de fezes na cama, o mesmo cuidado deve ser tomado com o ambiente em que os animais vivem, devendo haver atenção à presença de fezes na água consumida pelos animais - existem dados de patógenos causadores da mastite que vivem no reto e fazem a via feco-oral, como o *S. agalactiae* (Cunha et al. 2016; Jørgensen et al. 2016; Klaas & Zadoks 2018).

É importante ressaltar o risco de infecção-cruzada que existe quando se há a presença outras espécies no ambiente em que o gado transita, podendo desempenhar um papel importante na introdução de patógenos como por exemplo a introdução de *Streptococcus canis* em um rebanho pela presença de carnívoros no mesmo ambiente (Tikofsky & Zadoks 2005). Além disso, os autores Santman-Berends et al. (2017) relataram que a proximidade (em um raio de cerca de 2 km) da propriedade bovina leiteira com propriedades de criações suínas possa se tornar um fator de risco quando se considera a presença de enterobactérias com detecção de betalactamases de espectro estendido (ESBL). Ademais, o controle de moscas tem sua importância no controle da mastite, sendo observado por Hillerton et al. (1990) que, moscas – especificamente a *Hydrotaea irritans*, podem ter como papel causar pequenos traumas na glândula mamária, tornando possível a entrada de patógenos na circulação, fato também relatado por Nickerson et al. (1995), com a observação de que animais com essas lesões induzidas apresentavam maior frequência de infecções intramamárias (70%) quando comparadas com vacas que apresentavam tetos sem as abrasões (40%).

5 CONCLUSÃO

A mastite é uma enfermidade extremamente importante devido aos prejuízos causados à pecuária leiteira, sendo necessário avaliar a propriedade como um todo para que seja possível estabelecer um método de controle adequado e individual para cada propriedade. É notável o aumento da importância dos *Staphylococcus Coagulase Negativos* (CNS), frente aos outros microrganismos causadores de mastite. Somado a

isso, também é importante ressaltar a importância de outros microrganismos, como a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, que são microrganismos isolados com elevada frequência e que podem ser responsáveis por mastites clínicas agressivas com potencial risco à vida do animal infectado.

Foi identificada resistência a antibióticos de 40% das amostras testadas para Gentamicina, Tetraciclina, Neomicina, Enrofloxacin e entre outros. Os dados demonstram também que, por serem amplamente utilizados no tratamento clínico, podem ter induzido resistência ao longo do tempo. Além da Gentamicina, os antibacterianos sulfametoxazol e trimetoprim (SUT) e Ampicilina e Sulbactam (ASB) obtiveram altas taxas de resistência. Além disso, em relação aos antibióticos testados para *Staphylococcus* spp, foi demonstrado que houve grande variabilidade do perfil de resistência a Gentamicina ao passar dos anos subsequentes a 2008, ao passo de que a Tetraciclina testada obteve aumento de resistência, apresentando 21% em 2008 e 66% em 2014. Em decorrência do aumento gradativo da resistência a estes antibióticos, evidencia-se que o clínico de animais de produção deve ter bastante cautela ao utilizar estes fármacos, impondo limites geográficos aos dados consultados que irão nortear o tratamento a ser implementado.

O atual cenário de resistência a fármacos, estes amplamente utilizados no tratamento de mastite na pecuária leiteira, pode ter sido resultado da seleção feita pela administração de subdoses de antibióticos e as práticas usadas no controle da enfermidade. Denota-se a necessidade do melhor controle e mudança no protocolo clínico e a solicitação rotineira de antibiogramas com o intuito de evitar falhas na antibioticoterapia, e assim propiciar a devida erradicação do microrganismo patogênico presente. Além disso, ressalta-se a importância de realizar novos estudos acerca dos agentes etiológicos causadores de mastite no Distrito Federal e Entorno, visando compreender cada vez mais a epidemiologia da doença na região e como os mais diversos fatores podem influenciar na dinâmica da doença.

REFERÊNCIAS

1. Gurr, M. I. 1999. Lipids in nutrition and health: A reappraisal. Elsevier. p. 188-196.
2. Heaney, R. P., McCARRON, D. A., Dawson-Hughes, B., Oparil, S., Berga, S. L., Stern, J. S., ... & Rosen, C. J. 1999. Dietary changes favorably affect bone remodeling in older adults. *Journal of the American Dietetic Association*, 99(10), 1228-1233.
3. Chilliard, Y., & Ferlay, A. 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reproduction Nutrition Development*, 44(5), 467-492.
4. Heaney, R. P., McCARRON, D. A., Dawson-Hughes, B., Oparil, S., Berga, S. L., Stern, J. S., ... & Rosen, C. J. 1999. Dietary changes favorably affect bone remodeling in older adults. *Journal of the American Dietetic Association*, 99(10), 1228-1233.
5. Dror, D. K., & Allen, L. H. 2011. The importance of milk and other animal-source foods for children in low-income countries. *Food and nutrition bulletin*, 32(3), 227-243.
6. Brasil 2014. Plano mais pecuária. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), Brasília, DF. 34p
7. Pyörälä, S. 2002. New strategies to prevent mastitis. *Reproduction in Domestic Animals*, 37(4), 211-216.
8. da Costa, E. O. 1998. Importância da mastite na produção leiteira do país. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*, 1(1), 3-9.
9. Lemos, A. M., Teodoro, R. L., & Madalena, F. E. 1996. Comparative performance of six Hotstein-Friesian x Guzera grades in Brazil. 9. Stayability, herd life and reasons for disposal. *Brazilian Journal of Genetics*, 19, 259-264.
10. Embrapa Gado de Leite. 2019. ANUÁRIO leite 2019: novos produtos e novas estratégias da cadeia do leite para ganhar competitividade e conquistar os clientes finais. São Paulo: Texto Comunicação Corporativa, 104 pp.
11. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2019. Censo agropecuário 2017: Resultados Definitivos. Rio de Janeiro, v. 8, p.1-105.
12. Maia, G. B. S, Pinto, A. R, Marques, C. Y. T., Roitman, F. B. & Lyra, D. D. 2013. Produção Leiteira no Brasil. Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social. In: <http://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/1514>. Access on: June 23, 2020.
13. Srivastava, A. K., & Kumaresan, A. 2015. Mastitis in dairy animals: an update. 1st ed. Satish Serial Publishing House. p. 11-364.
14. de Sá, J. P. N., de Figueiredo, C. H. A., de Sousa Neto, O. L., de Alencar Roberto, S. B., Gadelha, H. S., & de Alencar, M. C. B. 2018. Os principais microorganismos causadores da mastite bovina e suas consequências na cadeia produtiva de leite. *Revista Brasileira de Gestão Ambiental*, 12(1), 01-13.

15. Coentrão, C. M. 2008. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras. *Arq. bras. med. vet. zootec*, 283-288.
16. Portz, A. J. 2011. Avaliação da presença de resíduos de antibióticos e da qualidade microbiológica em leites cru e beneficiado no Distrito Federal. Monografia de conclusão de curso, Universidade de Brasília, Brasília. 35p.
17. Browning, J. W., Mein, G. A., Barton, M., Nicholls, T. J., & Brightling, P. 1990. Effects of antibiotic therapy at drying off on mastitis in the dry period and early lactation. *Australian veterinary journal*, 67(12), 440-442.
18. Webster, J. 2020. *Understanding the dairy cow*. John Wiley & Sons. p. 181.
19. Berry, E. A., & Hillerton, J. E. 2002. The effect of selective dry cow treatment on new intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, 85(1), 112-121.
20. Bradley, A. J., Breen, J. E., Payne, B., Williams, P., & Green, M. J. 2010. The use of a cephalonium containing dry cow therapy and an internal teat sealant, both alone and in combination. *Journal of Dairy Science*, 93(4), 1566-1577.
21. Lipkens, Z., Piepers, S., & De Vlieghe, S. 2019. Impact of Selective Dry Cow Therapy on Udder Health, Milk Yield, Culling Hazard and Antimicrobial Consumption in Commercial Dairy Herds. *Selectively Drying Off Dairy Cows*, 111.
22. Fey, P. D., Safranek, T. J., Rupp, M. E., Dunne, E. F., Ribot, E., Iwen, P. C., ... & Hinrichs, S. H. 2000. Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. *New England Journal of Medicine*, 342(17), 1242-1249.
23. Klaas, I. C., & Zadoks, R. N. 2018. An update on environmental mastitis: Challenging perceptions. *Transboundary and emerging diseases*, 65, 166-185.
24. Quinn, P. J. et al. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Artmed Editora, 2005.
25. Ribeiro, M., Petrini, L., Aita, M., Balbinotti, M., Junior, W. S., Gomes, J., ... & Barbosa, R. 2003. Relação Entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. *Current Agricultural Science and Technology*, 9(3).
26. Benedette, M. F., Silva, D. D., Rocha, F. P. C. D., Santos, D. A. N. D., Costa, E., & Avanza, M. F. B. 2008. Mastite bovina. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 7(11), 1-5.
27. Coser S.M., Lopes M.A. & Costa G.M. 2012. Mastite bovina: controle e prevenção. *Boletim Técnico-n.º*, 93, 1-30.
28. Dias, R.V.C. 2007. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. *Acta Veterinária Brasília, Mossoró*, v.1, n.1, p.23-27.
29. Kibebew, K. 2017. Bovine mastitis: A review of causes and epidemiological point of view. *J Biol Agric Healthc*, 7(2), 1-14.

30. Zachary, J. F., McGavin, M. D. 2012. Bases da patologia em veterinária. Elsevier Health Sciences Brazil. p. 507.
31. Hawari, A. D. & Al-Dabbas, F. 2008. Prevalence and Distribution of Mastitis Pathogens and their Resistance Against Antimicrobial Agents in Dairy Cows in Jordan. American Journal Of Animal And Veterinary Sciences, v. 3, n. 1, p.36-39,
32. Blowey, R. W. & Edmondson, P. W. 1995. Mastitis Control In Dairy Herds. Ipswich, Farming Press.196 pp.
33. Sharma, N., Rho, G., Hong, Y., Kang, T., & Lee, H., & Hur, T.Y & Jeong, D. 2012. Bovine Mastitis: An Asian Perspective. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances. 7. 454-476. 10.3923/ajava.2012.454.476.
34. Acosta, A. C., Silva, L. B. G. D., Medeiros, E. S., Pinheiro-Júnior, J. W., & Mota, R. A. (2016). Mastites em ruminantes no Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira, 36(7), 565-573.
35. Sheldrake, R. F., McGregor, G. D., & Hoare, R. J. 1983. Somatic cell count, electrical conductivity, and serum albumin concentration for detecting bovine mastitis. Journal of Dairy Science, 66(3), 548-555.
36. Schukken, Y. H., Leslie, K. E., Barnum, D. A., Mallard, B. A., Lumsden, J. H., Dick, P. C., ... & Kehrl, M. E. 1999. Experimental Staphylococcus aureus intramammary challenge in late lactation dairy cows: quarter and cow effects determining the probability of infection. Journal of Dairy Science, 82(11), 2393-2401
37. Barkema, H. W., Schukken, Y. H., Lam, T. J. G. M., Galligan, D. T., Beiboer, M. L., & Brand, A. 1997. Estimation of interdependence among quarters of the bovine udder with subclinical mastitis and implications for analysis. Journal of Dairy Science, 80(8), 1592-1599.
38. Barbosa, C. P., Benedetti, E., & Guimarães, E. C. 2009. Incidência de mastite em vacas submetidas a diferentes tipos de ordenha em fazendas leiteiras na região do Triângulo Mineiro. Bioscience Journal, 25(6).
39. Ribeiro Júnior, E., Silva, M. H., Viegas, S. A. D. A., Ramalho, E. J., Ribeiro, M. D., & Oliveira, F. C. S. D. 2008. California Mastitis Test (CMT) e whiteside como métodos de diagnóstico indireto da mastite subclínica. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, 9(4).
40. Steeneveld, W., Hogeveen, H., Barkema, H. W., van den Broek, J., & Huirne, R. B. 2008. The influence of cow factors on the incidence of clinical mastitis in dairy cows. Journal of dairy science, 91(4), 1391-1402.
41. Sargeant, J. M., Leslie, K. E., Shirley, J. E., Pulkrabek, B. J., & Lim, G. H. 2001. Sensitivity and specificity of somatic cell count and California Mastitis Test for identifying intramammary infection in early lactation. Journal of Dairy Science, 84(9), 2018-2024.
42. Barbosa, C. P., Benedetti, E., de Almeida Ribeiro, S. C., & Guimaraes, E. C. 2002. Relação entre contagem de células somáticas (CCS) e os resultados do " California Mastitis Test" (CMT), no diagnóstico de mastite bovina. Bioscience Journal, 18(1).
43. Trabulsi, L.R.; Alterthum, F, 2004. Microbiologia, 4.ed. São Paulo: Atheneu.

44. Embrapa Cerrados. O Cerrado. 2012. In: <http://www.cpac.embrapa.br/unidade/ocerrado/#:~:text=H%C3%A1%20duas%20esta%C3%A7%C3%B5es%20bem%20definidas,meses%20de%20janeiro%20e%20fevereiro.>> Acess on: jul 07, 2020.
45. Pardo, R. B., Sturion, D. J., Basile, J. R., Francisco, A. C. N., da Silva Duarte, D. D., Fernandes, A. A., & Panício, E. M. 1999. Levantamento dos agentes etiológicos da mastite bovina na região de Arapongas (PR). *Journal of Health Sciences*, 1(1).
46. Filippesen, L. F., Moreira, F. B., Sakashita, A. T., & Bittencourt, D. R. 1999. Prevalência da mastite bovina causada por *Prototheca zopfii* em rebanhos leiteiros, na região norte do Paraná. *Ciência Rural*, v. 29, n. 1, p.87-89.
47. Laffranchi, A., Müller, E. E., Freitas, J. C. Pretto-Giordano, L. G., Dias, J. A., & Salvador, R. 2001. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas ao longo dos primeiros quatro meses de lactação. *Ciência Rural*, 31(6), 1027-1032. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782001000600018>
48. Taponen, S., Simojoki, H., Haveri, M., Larsen, H. D., & Pyörälä, S. 2006. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Veterinary microbiology*, 115(1-3), 199-207.
49. Pyorala, S. & Taponen, S. 2009. Coagulase-negative staphylococci—Emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*, v. 134, n. 1-2, p.3-8.
50. Thorberg, B. M., Danielsson-Tham, M. L., Emanuelson, U., & Waller, K. P. 2009. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. *Journal of dairy science*, 92(10), 4962-4970.
51. Fontana V.L.D.S., Giannini M.J.S.M., Letfe C.Q.F., Miranda E.T., Almeida A.M.F., Fontana C.A.P., Souza C.M. & Stella A.E. 2010. Etiology of bovine subclinical mastitis, susceptibility of the agents to antimicrobial drugs and detection of the gene β -lactamasis in *Staphylococcus aureus*. *Vet. Zootec.* 17:552-559.
52. Cunha, A. F. D., Bragança, L. J., Quintão, L. C., Coelho, K. S., Souza, F. N. D., & Cerqueira, M. M. O. P. (2016). Prevalence, etiology and risk factors of clinical mastitis in dairy cattle of Viçosa-MG. *Acta Vet. bras.*, 48-54..
53. Contreras, G.A. & Rodríguez, J.M. 2011. Mastitis: Comparative Etiology and Epidemiology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16, 339–356. <https://doi.org/10.1007/s10911-011-9234-0>
54. Rathore, A. K., & Sheldrake, R. F. 1977. Teat orifice stretchability associated with teat diameter gradient and milk yield in lactating cows. *Animal Science*, 24(2), 215-220.
55. Erb, H. N., Smith, R. D., Oltenacu, P. A., Guard, C. L., Hillman, R. B., Powers, P. A., ... & White, M. E. 1985. Path Model of Reproductive Disorders and Performance, Milk Fever, Mastitis, Milk Yield, and Culling in Holstein Cows1. *Journal of Dairy Science*, 68(12), 3337-3349.

56. Biffa, D., Debela, E., & Beyene, F. 2005. Prevalence and risk factors of mastitis in lactating dairy cows in Southern Ethiopia. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 3(3), 189-198.
57. Zadoks, R. N., Allore, H. G., Barkema, H. W., Sampimon, O. C., Wellenberg, G. J., Gröhn, Y. T., & Schukken, Y. H. 2001. Cow-and quarter-level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science*, 84(12), 2649-2663.
58. Amaral, L. A. D., Isa, H., Dias, L. T., Rossi Jr, O. D., & Nader Filho, A. 2004. Avaliação da eficiência da desinfecção de teteiras e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 173-177.
59. Hickman, C. G. 1964. Teat shape and size in relation to production characteristics and mastitis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 47(7), 777-782.
60. Rathore, A. K. 1976. Relationships between teat shape, production and mastitis in Friesian cows. *British Veterinary Journal*, 132(4), 389-392.
61. Bakken, G. 1981. Relationships between udder and teat morphology, mastitis and milk production in Norwegian Red Cattle. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 31(4), 438-444.
62. Kimura, K., Reinhardt, T. A., & Goff, J. P. 2006. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. *Journal of dairy science*, 89(7), 2588-2595.
63. Curtis, C. R., Erb, H. N., Sniffen, C. J., Smith, R. D., Powers, P. A., Smith, M. C., ... & Pearson, E. J. 1983. Association of parturient hypocalcemia with eight periparturient disorders in Holstein cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 183(5), 559-561.
64. Goff, J. P. 2008. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *The veterinary journal*, 176(1), 50-57.
65. Munoz, M. A., Bennett, G. J., Ahlström, C., Griffiths, H. M., Schukken, Y. H., & Zadoks, R. N. 2008. Cleanliness scores as indicator of *Klebsiella* exposure in dairy cows. *Journal of dairy science*, 91(10), 3908-3916.
66. Müller, E.E. 2002. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. In: *Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil*. Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil. agosto de 206-217. In: <http://www.nupel.uem.br/qualidadeleitem.pdf>. Access on: July 24, 2020.
67. Singh, M., & Ludri, R. S. 2001. Somatic Cell Counts in Marrah buffaloes (*Bubalus bubalis*) during different stages of lactation, parity and season. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 14(2), 189-192.
68. Zafalon, L. F., Arcaro, J. R. P., Nader Filho, A., Ferreira, L. M., & Veschi, J. L. A. 2009. Toxin gene-carrier *Staphylococcus aureus* isolated from diverse transmission sources during the milking. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, 68(2), 269-277.
69. Cerqueira, M. M. O. P., Vargas, R. T., da Cunha, A. F., Lage, A. D., da Fonseca, L. M., Rodrigues, R., ... & de Souza, M. R. 2009. Mastite em novilhas: importância e controle. *Ciência Animal Brasileira*.

70. Husfeldt, A. W., Endres, M. I., Salfer, J. A., & Janni, K. A. 2012. Management and characteristics of recycled manure solids used for bedding in Midwest freestall dairy herds. *Journal of dairy science*, 95(4), 2195-2203.
71. Kristula, M. A., Rogers, W., Hogan, J. S., & Sabo, M. 2005. Comparison of bacteria populations in clean and recycled sand used for bedding in dairy facilities. *Journal of dairy science*, 88(12), 4317-4325.
72. Munoz, M. A., Ahlström, C., Rauch, B. J., & Zadoks, R. N. 2006. Fecal shedding of *Klebsiella pneumoniae* by dairy cows. *Journal of dairy science*, 89(9), 3425-3430.
73. Jørgensen, H. J., Nordstoga, A. B., Sviland, S., Zadoks, R. N., Sølverød, L., Kvitle, B., & Mørk, T. 2016. *Streptococcus agalactiae* in the environment of bovine dairy herds—rewriting the textbooks?. *Veterinary microbiology*, 184, 64-72.
74. Santman-Berends, I. M. G. A., Gonggrijp, M. A., Hage, J. J., Heuvelink, A. E., Velthuis, A., Lam, T. J. G. M., & van Schaik, G. 2017. Prevalence and risk factors for extended-spectrum β -lactamase or AmpC-producing *Escherichia coli* in organic dairy herds in the Netherlands. *Journal of dairy science*, 100(1), 562-571.
75. Hillerton, J. E., Bramley, A. J., & Thomas, G. 1990. The role of *Hydrotaea irritans* in the transmission of summer mastitis. *British Veterinary Journal*, 146(2), 147-156.
76. Nickerson, S. C., Owens, W. E., & Boddie, R. L. 1995. Mastitis in dairy heifers: initial studies on prevalence and control. *Journal of dairy science*, 78(7), 1607-1618.
77. Martins, Thamires et al. Intramammary treatment with gentamicin in lactating cows with clinical and subclinical mastitis. *Nova Odessa - SP Pesq. Vet. Bras.* 36(4):283-289, abril 2016 DOI: 10.1590/S0100-736X2016000400006.
78. Santos, Fernanda et al. 2017. Presence of *mecA*-positive multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis* in bovine milk samples in Brazil. *Juiz de Fora-MG. Journal Of Dairy Science*, [s.l.], v. 100, n. 6, p.4797-4806,. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-12334>. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9931>
79. Soares, Lidiane et al. 2012. Antimicrobial resistance and detection of *mecA* and *blaZ* genes in coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. *Rio de Janeiro – RJ, Pesq. Vet. Bras.* 32(8):692-696.

ANEXO

Quadro 1. Questionário para a avaliação dos fatores de risco acerca da mastite bovina para ser aplicado em propriedades do Distrito Federal e Entorno.

Fatores relacionados ao animal

Multipara ()	Esfíncter da teta com fechamento inadequado:
Primípara ()	Sim () Não ()
Está em estágio inicial da lactação:	Formato das tetas: Funil () Cilindro ()
Sim () Não ()	Outro ()
Idade (em anos): _____	Valor de CCS: _____
Apresenta hiperqueratose nos tetos:	Já foi acometida por mastite em lactações
Sim () Não ()	passadas: Sim () Não ()
Apresenta lesões nos tetos:	Tetos com elasticidade acentuada:
Sim () Não ()	Sim () Não ()
Úbere pendular, próximo do chão:	Apresenta hipocalcemia:
Sim () Não ()	Sim () Não ()

Fatores relacionados à higiene

Desinfecção dos tetos:	É feita a desinfecção das teteiras entre
Pré-dipping: Sim () Não ()	animais distintos: Sim () Não ()
Os tetos dos animais são lavados antes da	A higiene individual do ordenhador é feita
realização do pré-dipping: Sim () Não ()	de acordo com os padrões: Sim () Não ()
Pós-dipping: Sim () Não ()	

Fatores relacionados a diagnóstico e tratamento

Acesso a assistência técnica: Sim () Não ()	Inserção total da cânula de antibióticos:
Acesso a laboratórios: Sim () Não ()	Sim () Não ()
A identificação dos patógenos é feita:	Faz terapia da vaca seca:
Sim () Não ()	De todos os quartos ()
É feita a escolha de antibióticos de baixo	Terapia seletiva ()
espectro como primeira escolha para o	Uso de selantes intramamários:
tratamento:	Sim () Não ()
Sim () Não ()	

Fatores ambientais

Tipo de criação:	A cama apresenta quantidades consideráveis
Extensivo () Intensivo ()	de fezes: Sim () Não ()
Semi-intensivo ()	Sobre a quantidade
Temperatura média da região (em °C): _____	de fezes no ambiente em que os animais
Umidade relativa da região (porcentagem): _____	convivem: Pouca () Moderada () Grande ()
Tipo de chão onde a ordenha é realizada:	
Chão batido () Cimento ()	Presença de resíduos fecais na água que os
Cerâmica ()	animais consomem: Sim () Não ()
A troca do material de cama é feita de	
forma regular: Sim () Não ()	Presença de animais de outras espécies no
O material de cama é reciclado: Sim () Não ()	mesmo ambiente: Sim () Não ()
Presença de animais de outras espécies no	Qual (quais): _____
mesmo ambiente: Sim () Não ()	
Qual (quais): _____	Existe o controle da circulação humana
Propriedade próxima (raio de 2 km) de	entre os animais: Sim () Não ()
propriedades de criação de outras espécies:	É realizado o controle de moscas:
Sim () Não ()	Sim () Não ()
