

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS REALEZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE, BEM-ESTAR E PRODUÇÃO
ANIMAL SUSTENTÁVEL NA FRONTEIRA SUL

MARIA VICTÓRIA ZANGRANDE

OZONIOTERAPIA E SUA RELAÇÃO COM A SAÚDE DA GLÂNDULA MAMÁRIA
DE BOVINOS DA RAÇA HOLANDESA

REALEZA

2023

MARIA VICTÓRIA ZANGRANDE

**OZONIOTERAPIA E SUA RELAÇÃO COM A SAÚDE DA GLÂNDULA MAMÁRIA
DE BOVINOS DA RAÇA HOLANDESA**

Dissertação de mestrado, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde, Bem-estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde, Bem-Estar Animal e Produção Sustentável na Fronteira Sul

Orientadora: Prof. Dra. Maiara Garcia Blagitz Azevedo

Coorientadora: Dra. Luciana Bignardi de Soares Brisola Casimiro da Costa

REALEZA

2023

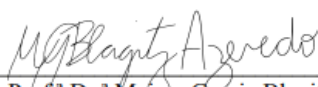
MARIA VICTÓRIA ZANGRANDE

**OZONIOTERAPIA E SUA RELAÇÃO COM A SAÚDE DA GLÂNDULA MAMÁRIA
DE BOVINOS DA RAÇA HOLANDESA**

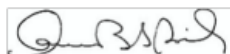
Dissertação de mestrado, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde, Bem-estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde, Bem-Estar Animal e Produção Sustentável na Fronteira Sul

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 27/10/2023

BANCA EXAMINADORA



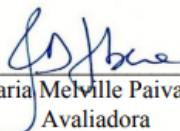
Prof.ª Dr.ª Maíara Garcia Blagitz Azevedo
Orientadora



Prof.ª Dr.ª Luciana Bignardi Brisola Casimiro da Costa



Prof.ª Dr.ª Marta Lizandra do Rego Leal - UFSM
Avaliadora



Prof.ª Dr.ª Alice Maria Melville Paiva Della Libera – USP
Avaliadora

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

, Maria Victória Zangrande
OZONIOTERAPIA E SUA RELAÇÃO COM A SAÚDE DA GLÂNDULA
MAMÁRIA DE BOVINOS DA RAÇA HOLANDESA / Maria Victória
Zangrande . -- 2023.
70 f.:il.

Orientadora: Doutora Maiara Garcia Blagitz Azevedo
Co-orientadora: Doutora Luciana Bignardi Brisola
Casimiro da Costa

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Saúde,
Bem-Estar e Produção Animal Sustentável Na Fronteira
Sul, Realeza, PR, 2023.

1. Ozonioterapia, qualidade do leite, mastite bovina.
I. Azevedo, Maiara Garcia Blagitz, orient. II. Costa,
Luciana Bignardi Brisola Casimiro da, co-orient. III.
Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, à Deus, por diariamente me permitir viver o mestrado, que todos os dias me deu força para continuar, que sempre fez grandes milagres na minha vida e pela oportunidade de conhecer grandes pessoas que hoje são muito especiais para mim. Desde o início estendeu suas mãos e abençoou minha vida.

Com certeza não chegaria até aqui sozinha, uma caminhada complexa e que com certeza teve a presença dos meus pais, meus amigos e meus amigos felinos, Yuki, ariel e mika. Minha família sem dúvidas me apoiou muito, sempre tive apoio e uma palavra amiga de todos.

Agradeço a minha mãe, Rosani, meu pai Sérgio em memória e meu pai do coração Alberto, mas para mim, Beto.

Obrigada mãe, por cada abraço caloroso, por cada palavra para acalmar meu coração, por vários momentos de conversa, todos os dias me dando a força e a base que eu preciso para continuar, mulher forte e guerreira que sempre me inspirou, não é à toa que quando criança eu já era sua fã. Obrigada por me proporcionar tudo, sou eternamente grata. Você é tudo para mim, meu porto seguro, minha casa, minha melhor amiga e sem dúvidas a base de tudo. Com você, aprendi a ser forte, ser independente, não temer pelas coisas que acontecem na nossa vida, por não ter medo de enfrentar meus piores monstros. Não sei definir em palavras o quanto eu sou grata e te amo. Obrigada mãe.

Obrigada pai, tenho certeza de que ai de cima você e Deusão fizeram muito por mim, a saudade é enorme, diariamente penso em ti, tenho certeza que a força que as vezes me vem do nada, que o acalento no meu coração e que o apoio que eu sinto, são vocês, sempre junto comigo, essa conquista também é sua e da minha mãe. Obrigada pai.

Sou imensamente grata ao meu pai do coração, que sempre com muita calma, muita paciência me ensina também a ser uma pessoa e uma profissional melhor, obrigada Beto por sempre me fazer lembrar o porquê eu fiz as escolhas da minha vida, se eu estudo hoje é por grande influência sua. Obrigada por sempre me apoiar, sempre me dar seu ombro quando preciso e por suas palavras de auxílio. Sou extremamente grata por você.

Sou imensamente grata a Deus por me apresentar duas pessoas extremamente importantes na minha vida durante a caminhada do mestrado, Sara e Davi. Grandes irmãos que Deus me presenteou, que sempre caminhamos juntos, que sempre respeitamos uns aos outros, e assim trilhamos nossa linda caminhada no mestrado. Davi, obrigada por me ensinar a

resiliência, a paciência e sempre a olhar as diversas facetas nas situações, sou muito grata pela sua amizade e irmandade durante esse caminho.

Sara, como deixar de destinar um parágrafo só para ela, minha irmã de outra mãe. Uma pessoa incrível, de um coração imenso, nunca nega ajuda para ninguém, que me ajuda todos os dias a vencer, que me inspira demais, e que sempre me dá a mão. Está comigo não só nos momentos bons, mas também nas dificuldades. Eu agradeço por você me aguentar todos os dias, até o dia que eu sei que não estou muito bem. Obrigada mulher.

A minha orientadora, professora Maiara Garcia Blagitz, uma grande inspiração na pesquisa. Passamos por muitos desafios, com certeza nossa união fez tudo andar, mas chegamos na reta final e com certeza nosso caminho ainda irá continuar. Obrigada por tudo, principalmente por me manter motivada e por me mostrar que desistir não vale a pena. Sei que nem sempre falei, mas a senhora é uma grande mulher, agora mãe da Alice e com certeza um exemplo a ser seguido. Sei que posso sempre contar com você e pode ter certeza de que pode contar comigo também, não é um fim e sim o começo de uma longa parceria.

Agradeço a minha co-orientadora Luciana Bignardi Brisola Casimiro da Costa, uma mulher inspiradora, que com certeza é um grande exemplo, obrigada professora por cada ensinamento, por cada explicação, por junto comigo não deixar a peteca cair, e obrigada até pelos puxões de orelha, com certeza me fizeram melhor.

Obrigada professora Tatiana Champion, que além de uma grande professora é uma grande mulher, obrigada por me apoiar, por me escutar e por me adotar por um tempo, com certeza você me ajudou muito a continuar. Sou extremamente grata a você e ao Fernando nossos vizinhos de sala. Obrigada Fernando Gnoatto, por todo o apoio, toda a ajuda que me deu sempre que eu precisei, com certeza nossa amizade será longa, muito obrigada por tudo.

Ao produtor Joari, obrigada por abrir as portas da sua propriedade para que nós pudéssemos executar o experimento. Obrigada por todo o acolhimento, por terem nos recebidos durante muitas e muitas visitas, sempre com um sorriso no rosto. Com toda a certeza sem vocês e sem os animais da propriedade este experimento não teria saído.

Obrigada ao corpo docente do PPG-SBPAS que de certa forma fizeram parte da minha formação. A UFFS que abriu as portas desde o início do mestrado. Obrigada a todos os técnicos, auxiliares, professores por todo o apoio e ajuda, sem dúvidas fizeram a diferença.

Sou eternamente grata a todos os meus amigos que mesmo de longe me deram apoio. Minha terapeuta Joene, que sem dúvidas me deu muita força para continuar. Sou grata ao grupo de estudos RUB pela oportunidade de poder contribuir um pouco com a formação dos alunos.

Agradeço a empresa eccovet, por confiar no meu trabalho e disponibilizar o gerador de ozônio para a execução do trabalho, sou muito grata pela oportunidade.

Por último mas não menos importante agradeço a Capes pelo recebimento do auxílio da bolsa durante 12 meses do mestrado me permitindo a dedicação exclusiva.

RESUMO

A mastite desempenha papel importante na indústria leiteira, seu tratamento é desafiador devido à diversidade de agentes resistentes aos antimicrobianos. Com isso, o objetivo do presente estudo é avaliar a redução da celularidade no leite em diferentes técnicas de contagem, diminuição de casos de mastite subclínica, menor taxa de animais contaminados, cura bacteriológica e manutenção da saúde da glândula mamária. Para isto, foram utilizadas 50 amostras de leite provenientes de quartos mamários de 44 vacas da raça Holandesa. A aplicação de gás ozonizado foi realizada nos quartos mamários naturalmente infectados via intramamária após a retirada do gás do aparelho gerador OZONEVET®, a concentração utilizada foi de 35µg, em um total de 4 aplicações com intervalos de 48 horas entre elas, conforme as recomendações do fabricante do aparelho ECCOVET®. Para a avaliação de eficiência do tratamento foram realizadas coletas de leite para análise de CCS (contagem de células somáticas) automática, CCS pela microscopia direta pelo método de Prescott & Breed e teste de *California Mastitis Test* (CMT) e exame microbiológico que foi realizada pela técnica de MALDI-TOF, espectrometria de massa. Os dados foram analisados através do software *GraphPad Prism*® na versão 9.5.1. O nível de significância foi considerado $p < 0,05$. Obteve-se com o tratamento de ozonioterapia redução dos graus no teste de CMT entre os dias 1 e dia 8, referindo-se à uma redução de celularidade no leite ($p=0,0001$), a mediana referente aos resultados do dia 1 foi de 3 (3-4), já a mediana referente ao dia 8 foi de 2 (1-3). A contagem de células mononucleares e polimorfonucleares pelo método de Prescott & Breed apresentou redução de celularidade quando comparado o dia 1 e o dia 8 ($p=0,0001$). A mediana referente à contagem de células mononucleares (cels/mL) no dia 1 foi de 736.000 (576.000-920.000) e quando comparado com o dia 8, houve uma redução no número de células 424.000 (244.000 – 728.000). A células polimorfonucleares apresentaram redução na contagem quando comparado o dia 1 496.000 (304.000-598.000) com o dia 8 que resultou em 200.000 (112.000-392.000). Para as contagens automáticas de células somáticas automáticas (cels/mL), foram encontrados valores medianos no dia 1 de 2.108.000 (679.000-4.783.000) e no dia 8 de 2.393.000 (790.000-4.969.000) ($p=0,1923$) não apresentando diferença estatística entre os momentos M1 e M8. Os resultados alcançados na análise microbiológica do leite (MALDI-TOF) indicaram redução dos resultados positivos entre o momento basal (79,3%) e após a ozonioterapia (48,2%). Conclui-se com os resultados alcançados, que a ozonioterapia melhora a saúde da glândula mamária agindo de forma positiva nas células de defesa, favorecendo o aumento de macrófagos e reduzindo os

neutrófilos, reduzindo os graus no teste do CMT e reduz os casos positivos na análise microbiológica. Com isso a técnica pode ser incluída no campo em busca de melhora na saúde da glândula mamária, redução no uso de medicamentos e conseqüentemente redução nos custos e melhora significativa da qualidade do leite.

Palavras-chave: Ozônio, mastite bovina, cura microbiológica, antimicrobianos, tratamento.

ABSTRACT

Mastitis plays an important role in the dairy industry and its treatment is challenging due to the diversity of antimicrobial-resistant agents. With this in mind, the aim of this study was to evaluate the reduction in cellularity in milk using different counting techniques, the reduction in cases of subclinical mastitis, the lower rate of contaminated animals, bacteriological cure and the maintenance of mammary gland health. For this purpose, 50 milk samples from the mammary quarters of 44 Holstein cows were used. Ozonated gas was applied to the naturally infected mammary tracts intramammary after the gas was removed from the OZONEVET® generator. The concentration used was 35µg, in a total of 4 applications with 48-hour intervals between them, in accordance with the recommendations of the manufacturer of the ECCOVET® device. In order to assess the effectiveness of the treatment, milk was collected for automatic somatic cell count (SCC) analysis, SCC by direct microscopy using the Prescott & Breed method and the California Mastitis Test (CMT) and microbiological examination using the MALDI-TOF mass spectrometry technique. The data was analyzed using GraphPad Prism® software in version 9.5.1. The significance level was considered to be $p < 0.05$. The ozone therapy treatment resulted in a reduction in the CMT test scores between days 1 and 8, referring to a reduction in milk cellularity ($p=0.0001$). The median for the results on day 1 was 3 (3-4), while the median for day 8 was 2 (1-3). The mononuclear and polymorphonuclear cell count using the Prescott & Breed method showed a reduction in cellularity when comparing day 1 and day 8 ($p=0.0001$). The median mononuclear cell count (cels/mL) on day 1 was 736,000 (576,000-920,000) and when compared to day 8, there was a reduction in the number of cells to 424,000 (244,000 - 728,000). Polymorphonuclear cells showed a reduction in count when comparing day 1 496,000 (304,000-598,000) with day 8 which resulted in 200,000 (112,000-392,000). For the automatic somatic cell counts (cels/mL), median values were found on day 1 of 2,108,000 (679,000-4,783,000) and on day 8 of 2,393,000 (790,000-4,969,000) ($p=0.1923$) with no statistical difference between times M1 and M8. The results achieved in the microbiological analysis of milk (MALDI-TOF) indicated a reduction in positive results between baseline (79.3%) and after ozone therapy (48.2%). It can be concluded from the results that ozone therapy improves the health of the mammary gland by acting positively on defense cells, favoring an increase in macrophages and reducing neutrophils, reducing CMT test scores and reducing positive cases in microbiological analysis.

The technique can therefore be used in the field to improve mammary gland health, reduce the use of medication and consequently reduce costs and significantly improve milk quality.

Keywords: Ozone, bovine mastitis, microbiological cure, antimicrobials, treatment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Aplicação de ozonioterapia via intramamária	34
Figura 2 – Extração do ozônio através do equipamento gerador utilizando como fonte principal o oxigênio.....	34
Figura 3 – Comparação dos graus de mastite subclínica pelo teste de CMT entre o momento basal, antes da aplicação e após a ozonioterapia	36
Figura 4 – Comparação da contagem de células somáticas automática durante as aplicações.	36
Figura 5 - Contagem de células somáticas mononucleares pelo método de Prescott & Breed (1910) no momento basal e após a última aplicação de ozônio.....	37
Figura 6 - Contagem de células somáticas polimorfonucleares pelo método de Prescott & Breed (1910) no momento basal e após a última aplicação de ozônio.....	37
Figura 7 - Contagem de linfócitos pelo método de contagem de células somáticas por microscopia direta no momento basal, antes da ozonioterapia e após a última aplicação de ozônio.....	38
Figura 8 - Contagem de macrófagos pelo método de contagem de células somáticas por microscopia direta no momento basal e após a última aplicação de ozônio	38
Figura 9 - Contagem de neutrófilos pelo método de contagem de células somáticas por microscopia direta no momento basal e após a última aplicação de ozônio	39
Figura 10 - Análise microbiológica pelo método MALDI-TOF, espectrometria de massas do leite, representado nos resultados positivos e negativos entre o momento basal e após a última aplicação de ozonioterapia	39
Figura 11 - Variedade e frequência dos agentes microbiológicos no momento basal e após a última aplicação de ozonioterapia	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição estatística da contagem de células somáticas do leite no diagnóstico de mastite entre os diferentes métodos utilizados	35
Tabela 2 - Frequência e porcentagem de amostras positivas e negativas na análise microbiológica no momento basal, antes da ozonioterapia, e após a última aplicação de ozônio	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

UFFS - Universidade Federal da Fronteira Sul

CMT - *Califórnia Mastitis Test*

CCS - Contagem de células somáticas

MALDI-TOF - Espectrometria de massas

CÉLS - Células

M1 - Momento 1

M8 - Momento 8

IL -1 - Interleucinas 1

IL -6 - Interleucinas 6

IL -12 - Interleucinas 12

IL- 18 - Interleucinas 18

TNF α - Fator de necrose tumoral

NK - Células Natural Killer

SCN - *Staphylococcus coagulase negativa*

EROS - Espécies Reativas de oxigênio

LOP's - Lipooligopeptídeos

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

LOO - Lipoperóxido

LO - Radicais de alcoxila

4 – HNE - 4-hidroxinonenal

Nrf2 - Fator nuclear eritróide 2

ATP - Adenosina Trifosfato

CEUA - Comitê Ética de uso animal

APCBRH – Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa

MN – Células Mononucleares

PMN – Células Polimorfonucleares

PBS - Tampão Fosfato-salino

RPMI 1640 - *Roswell Park Memorial Institute*

FCR - Força centrífuga real

LISTA DE SÍMBOLOS

® Registro de marca

μg Micrograma

μL Microlitro

O₃ Ozônio

cm² Centímetros

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	17
2. ARTIGO	27
2.1. Resumo.....	27
2.2 Introdução.....	29
2.3 Materiais e métodos.....	31
2.3.1 Comitê de ética e pesquisa.....	31
2.3.2 Local de estudo, mostragem e seleção dos animais.....	31
2.3.3 Coleta de amostras de leite.....	31
2.3.4 Processamento de amostras.....	32
2.3.4.1 <i>California Mastitis Test</i>	32
2.3.4.2 Avaliação de CCS individual automática	32
2.3.4.3 Avaliação de CCS microscópica pela técnica Pescott & Breed	32
2.3.4.4 Avaliação de CCS microscópica diferencial.....	33
2.3.4.5 Avaliação microbiológica do leite.....	33
2.3.5 Aplicação de ozonioterapia.....	33
2.3.6 Análise estatística.....	34
2.4 Resultados	35
2.5 Discussão	42
2.6 Conclusão.....	44
2.7 Referências.....	45
3.CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
4. REFERÊNCIAS.....	49
5. ANEXO A.....	57

1. INTRODUÇÃO

Várias formas terapêuticas são utilizadas para o tratamento de mastite, convencionais e avançadas que incluem antibióticos, anti-inflamatórios, vacinação, entre outros. Atualmente com o conhecimento adquirido durante anos pela comunidade científica, uma conscientização maior em busca de uma terapia alternativa e eficaz faz-se necessária para a cura dessa doença (GOMES *et al.*, 2016). Assim, há necessidade de investimentos na busca por tratamentos inovadores e sustentáveis, como por exemplo a aplicação de ozônio na glândula mamária, proposto neste estudo.

O ozônio é formado por três átomos de oxigênio caracterizado pela união de uma molécula com um átomo de oxigênio (BOCCI, 2006). De acordo com Campos *et al.*, (2003), sua utilização como tratamento foi iniciado na primeira guerra mundial.

Seu uso medicinal é extraído através de um equipamento gerador de ozônio, tendo como fonte principal o oxigênio. Um cilindro de oxigênio é acoplado ao aparelho que por meio de descargas elétricas se transforma em duas moléculas de oxigênio atômico (O), quando se unem novamente a molécula de oxigênio gera o ozônio O₃ (CARDOSO, 2009).

Depois que o ozônio é formado, ele reage com doadores de elétrons que sofrem oxidação, o que irá gerar o O₃, considerado ânion radical. Este irá se decompor em radical hidroxila formando moléculas de dióxigênio, tornando o ozônio oxidante potente (GROOTVELT *et al.*, 2004).

É considerado o desinfetante microbicida mais eficiente e requer contato bastante curto. Foi demonstrado que quando o ozônio é transferido para a água por um misturador em linha sem movimento, as bactérias são destruídas em dois segundos. Portanto, o tempo de contato na ozonização não é considerado importante, mas sim a concentração utilizada (SAFIAI *et al.*, 2018).

O ozônio tem como mecanismos de ação induzir o estresse oxidativo moderado ao interagir com ácidos graxos insaturados presentes nas membranas celulares, essa interação aumenta a produção de antioxidantes endógenos, a perfusão local e aumenta a oxigenação, além de estimular as respostas imunes (SMITH *et al.*, 2017).

A aplicação do gás ozônio sobre qualquer tipo de tecido vivo reage com os componentes da membrana celular, gerando espécies reativas de oxigênio (EROS) e produtos de oxidação lipídica, os lipooligopeptídeos (LOP's), dentre eles o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que age como mensageiro do ozônio pelas células sanguíneas (BOCCI *et al.*, 2011).

Após EROS e LOP's formados podem ser reduzidos pelos antioxidantes enzimáticos como glutatona peroxidase, superóxido dismutase e catalase, e não enzimáticos de baixo peso molecular, como vitamina E, vitamina C, glutatona, ácido úrico, tornando assim a formação de peróxido de hidrogênio com baixa toxicidade. Estes podem ser absorvidos por via endovenosa e capilares linfáticos (MANDHARE *et al.*, 2012).

Os lipooligopeptídeos (LOP's) são compostos por substâncias como lipoperóxidos (LOO), aldeídos, radicais de alcoxila (LO), F2- isoprostanos sendo o 4-hidroxinonenal (4-HNE) o mais importante, principalmente na estabilidade (SMITH *et al.*, 2017). É uma molécula altamente reativa, porém é facilmente degradada pela glutatona-transferase e aldeído desidrogenase. Seu mecanismo de ação é dose-dependente, agindo de forma sinalizadora em vários processos biológicos, como a proteína quinase C (MILKOVIC *et al.*, 2015).

O estresse oxidativo controlado que o ozônio causa ativa o Nrf2, um fator de transcrição relacionado à expressão de elementos que causam respostas antioxidantes agindo como protetor celular (HAHN *et al.*, 2016).

O tratamento do ozônio promove um aumento dos eritrócitos no sangue e com isto facilita a passagem do oxigênio pelos vasos capilares e melhorando o suprimento dos tecidos (LEITE, 1999). Da mesma forma, ocorrerá a estimulação da carboxilação oxidativa de piruvato que irá estimular a produção de ATPe causando a reparação dos tecidos. Devido a todas essas reações metabólicas e enzimáticas o ozônio possui um poder oxidante maior que o oxigênio (DIAZ *et al.*, 2001).

Suas ações mais importantes são descritas por melhorar a oxigenação do tecido lesado, auxiliar na eliminação de metabólitos tóxicos e possuir ação imunomoduladoras (RECIO DEL PINTO *et al.*, 1999). De acordo com VALACCHI *et al.*, (2005) as EROS agentes mais efetivas contra patógenos resistentes a antimicrobianos. O peróxido de hidrogênio resultante das reações do ozônio é capaz de melhorar a atividade fagocitária dos neutrófilos, além de estimular a liberação de citocinas importantes que agem na resposta imune frente à um desafio, como por exemplo, proteínas de fase aguda, IL-8, interferon- γ (BOCCI *et al.*, 2011).

Os efeitos bactericidas ocorrem pela interrupção da integridade dos fosfolípidos e lipoproteínas da membrana citoplasmática e da parede celular das bactérias. As bactérias Gram-negativas são mais sensíveis ao ozônio devido à peroxidação dos compostos de membrana (CHO *et al.*, 2010). Segundo ZHANG *et al.* (2016) o ozônio diminui a capacidade multiplicadora da *Escherichia coli* e *Streptococcus faecalis* devido a penetração na membrana celular e a reação com as estruturas citoplasmáticas também é capaz de modificar o DNA da bactéria.

A parede bacteriana é formada por íons negativos e para a integridade da membrana celular, essa estrutura precisa estar intacta, o ozônio possui uma ação na propriedade eletroquímica da superfície, causando a quebra da superfície e extravasamento de íons (FENG *et al.*, 2018).

A ação fungicida está relacionada com danos à reprodução viral, atuando como antioxidante poderoso dos capsídeos virais e do material genético. As estruturas em que o ozônio tem facilidade de ação, são as estruturas com maior número de ligações duplas, ou com alta densidade elétrica (TIZAOUI, 2020).

Entre seus benefícios está a ampla variedade de vias de aplicação como vias parenteral (IM, IV, SC), intra-articular, intra vaginal, intra-mamária, transretal e tópica. Nesse sentido, a diversidade das vias de aplicação e os benefícios atribuídos à sua utilização, o seu uso pode ser muito favorável no tratamento da mastite em bovinos leiteiros (VIDAL *et al.*, 2009).

Segundo BORRELI (2011) a dor é de origem multifatorial então o ozônio pode atuar de diversas formas causando a analgesia. Muitos mecanismos estão envolvidos, mas os mais prováveis são o devido a liberação de endorfinas e degeneração dos receptores de dor causando como consequência estimulação do sistema analgésico (RAEISSADAT *et al.*, 2018).

Estudos realizados demonstram que o uso de tratamentos intramamários com ozônio apresentam uma reação favorável de até 60% das vacas com mastite aguda (OGATA *et al.*, 2000). Também, estudos concordam que a terapia com ozônio é eficaz, rápida e barata contra a mastite clínica e subclínica (OGATA *et al.*, 2000).

Atualmente na medicina de grandes animais o ozônio é comumente explorado em doenças reprodutivas, doenças podais, ferimentos, mastite. A aplicação intrauterina de ozônio além da sua ação bactericida, melhora o ambiente do útero, e sua eficiência frente a infecções uterinas como endometrite e metrite (DJURICIC *et al.*, 2014; MALI *et al.*, 2020).

O uso da ozonioterapia em doenças podais, ferimentos e traumas tem sido amplamente utilizado para cicatrização e a alta capacidade bactericida, pois inativa bactérias destruindo sua parede celular (ZHANG *et al.*, 2016; SZPONDER *et al.*, 2017).

Nos últimos anos muitos estudos sobre a ação do ozônio nas doenças de bovinos, e uma alta crescente na área de reprodução animal, devido a alta exigência que os animais de produção têm em relação à vida reprodutiva. Um estudo conduzido por DURRANI *et al.*, (2017), utilizou 50 vacas com problemas uterinos, infecções causadas por *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, *Arcanobacterium pyogenes* e *Streptococcus pyogenes* e dessas praticamente todos os agentes bacterianos foram suscetíveis ao tratamento quando comparado o uso de antibioticoterapia, somente a *Streptococcus pyogenes* não respondeu ao ozônio.

Entre os benefícios da aplicação do ozônio de forma medicinal está o fato de melhorar a perfusão tecidual e a oxigenação, melhorando a vida reprodutiva desses animais (MALI *et al.*, 2020), aumentando a fertilidade (ZOBEL *et al.*, 2014).

Além de doenças reprodutivas e mastite outra utilização na clínica de bovinos são em distúrbios podais, como laminite, dermatite e a técnica vem sendo amplamente utilizada em equinos e caprinos na busca pela melhora tecidual e redução de utilização de medicamentos (LABENS *et al.*, 2013; SZPONDER *et al.*, 2017).

Outras formas de utilizar o ozônio também são aplicadas, como óleo ozonizado para uso tópico ou até mesmo o uso do ozônio para fins oftálmicos já foi explorado para casos de conjuntivite e blefarite obtendo desaparecimento dos sinais clínicos após o tratamento (SPADEA *et al.*, 2018).

Ogata; Nagahata (2000) realizaram um estudo onde compararam a administração intramamária de ozônio com a antibioticoterapia no tratamento da mastite e chegaram a conclusão que a ozonioterapia não apresentou resíduo no leite, considerado vantagem para sua utilização durante a lactação dos animais.

Certas quantidades desta mistura de ozônio e oxigênio podem ser administradas no sistema circulatório, pelas vias intravascular, intramuscular e subcutânea ou topicamente. Esta mistura tem sido utilizada na clínica veterinária no tratamento de metrite, endometrite, retenção de placenta em ginecologia e também em mastite. Foi constatado que o ozônio é capaz de reduzir a contagem de células somáticas (CCS) em casos de mastite (ONYAY *et al.*, 2015).

Mastite é a resposta imune da glândula mamária frente a patógenos causando uma reação inflamatória. Atualmente é considerada uma das enfermidades mais importantes e que acarreta grandes perdas econômicas e produtivas na produção leiteira, considerada como um dos principais problemas sanitários na bovinocultura leiteira. Soma-se a isso, prejuízos relacionados ao tratamento do animal e custos secundários. (RUEGG *et al.*, 2014).

A mastite é considerada a principal doença que afeta a glândula mamária e ocorre principalmente quando os animais estão mais vulneráveis e principalmente com a imunidade afetada (REIS *et al.*, 2016).

É considerada uma das doenças mais comuns e prevalentes que afetam o setor lácteo. Estudos mostram que a mastite pode atingir em média de 20% a 40% das fêmeas em lactação (HUSSAIN *et al.*, 2012) e podem gerar prejuízos econômicos como redução na produção de leite e conseqüente queda no preço do leite ofertado pelos laticínios, custos com tratamento e descarte de animais (HALASA *et al.*, 2007).

O impacto que a mastite causa na qualidade do leite é reconhecido mundialmente e os programas de controle devem ser considerados como pilares principais, baseados em medidas preventivas, identificação e tratamento adequado de animais infectados. Geralmente a completa eficiência do controle é difícil ser alcançada em decorrência da variedade etiológica da mastite, da agilidade no diagnóstico e da resistência e capacidade de adaptação bacteriana na glândula mamária (BARKEMA *et al.*, 2006).

Os impactos da mastite na produção de leite estão relacionados ao grau de lesão tecidual, tornando-se maiores as alterações nos componentes do leite e mais elevadas as contagens de células somáticas (CCS) (AGHAMOHAMMADI *et al.*, 2020). A redução na produção de leite deve-se à lesão de células epiteliais secretoras da glândula mamária infectada devido a liberação de toxinas bacterianas bem como a liberação de citocinas eicosanóides pelo organismo durante a resposta inflamatória (RUEGG *et al.*, 2014).

As causas da mastite variam de acordo com fatores de risco como o ambiente, patógenos envolvidos e manutenção da imunidade e saúde das vacas (RUEGG *et al.*, 2014). A causa bacteriana é a mais significativa em relação a danos fisiológicos e econômicos, não dispensando outras causas como produtos químicos, lesões e agentes não bacterianos que podem desencadear uma resposta inflamatória da glândula mamária (BLOWEY *et al.*, 2010).

A múltipla etiologia das mastites é um fator importante a ser considerado no seu tratamento, controle e prevenção. O controle da mastite é mundialmente uma das alternativas mais utilizadas na tentativa de prevenir e evitar prejuízos que a doença carrega consigo (SVILAND; WAAGE, 2002). Dentre os principais grupos de agentes bacterianos, podem ser classificados como Gram-positivas e Gram-negativas (CONTRERAS *et al.*, 2001).

Resposta imune aos agentes patogênicos se trata de um sistema complexo de células, tecidos e moléculas que juntos defendem a glândula mamária (SORDILLO, 2018) e podem ser classificadas como respostas imunes inatas e respostas imunes adaptativas ou adquiridas (CARNEIRO, 2009).

As primeiras linhas de defesa da glândula mamária são as barreiras anatômicas pertencentes à imunidade inata, como: a pele do teto, o músculo esfíncter e o tampão de queratina. A pele quando se apresenta saudável, reduz o risco de infecções, e além da pele o canal do teto é fundamental, pois a pele é a principal via de entrada dos agentes patogênicos (CARNEIRO, 2009).

Um anel muscular chamado esfíncter também participa desta barreira física, entre as ordenhas normalmente ele mantém-se fechado e durante o estímulo dos tetos na ordenha ele se abre para saída do leite. Além de barreira física, o esfíncter também possui uma barreira química

devido há um tampão de queratina formado pelas células da parede do canal do quarto mamário (NEVES, 2011).

Quando as barreiras físicas dos quartos mamários não são suficientes, o agente patogênico acaba colonizando a cisterna da glândula, então as barreiras solúveis e as células de defesa da imunidade inata começam a agir (RAINARD, 2003). As barreiras solúveis são compostas por três grupos: Sistema complemento, que promove a lise da membrana celular das bactérias. Os peptídeos que ligam elementos essenciais, compostos pela lactoferrina. E as enzimas hidrolíticas que agem em estruturas com a lisozima (LINDE *et al.*, 2008).

Em uma glândula mamária sadia, os macrófagos sinalizam e atraem a migração dos polimorfonucleares até o foco da inflamação através da liberação das citocinas pró-inflamatórias (ALNAKIP *et al.*, 2014). Os macrófagos também secretam interleucinas importantes como marcadores de defesa da glândula mamária e compõem a resposta inflamatória e este tem ação de facilitadores para liberação de leucócitos na corrente sanguínea até o foco da inflamação (SORDILLO, 2018). Entre as principais interleucinas secretadas pelos macrófagos estão: IL-1, IL-6, IL-12 e IL-18, bem como o TNF α - (fator de necrose tumoral) (TIZARD, 2008).

Além dos macrófagos, outras células têm grande importância na resposta imune inata apesar de serem consideradas não específicas, são os neutrófilos, as células Natural Killer (NK) e as células epiteliais (SORDILLO, 2018).

A imunidade adaptativa frente a exposição bacteriana leva mais tempo do que a imunidade inata para agir, e enquanto a imunidade adaptativa é capaz de levar a respostas específicas a imunidade inata age de forma generalizada (JOBIM, 2008).

A mastite pode ser classificada de acordo com a forma de manifestação, clínica e subclínica. De acordo com os agentes causadores, forma de transmissão e patogenicidade das bactérias. E classificada conforme duração da infecção, hiperaguda, aguda e crônica (ZAFALON *et al.*, 2005).

Quanto à manifestação pode ser classificada em mastite clínica e subclínica. Na mastite clínica são evidentes sinais locais e sintomas sistêmicos e pode ser categorizada como mastite superaguda, aguda e subaguda, dependendo da gravidade dos sintomas (DE VLIEGHER *et al.*, 2012). Vários fatores que contribuem para o nível de infecção incluem o agente causador da doença, idade do animal, sua saúde imunológica e estágio de lactação (HURLEY; THEIL, 2011).

Os sinais clínicos apresentados por animais acometidos com mastite são manifestados de acordo com os graus severidade da inflamação e pode ser classificada em três escores: grau

1: mastite leve com alterações visíveis no leite, grumos e coágulos; grau 2: moderado com alterações no leite e no úbere, edema, vermelhidão, dor; grau 3: grave com alterações sistêmicas além das alterações no leite e no úbere, desidratação (RADOSTITIS *et al.* 2002).

A mastite subclínica não apresenta alterações visíveis no leite e na glândula mamária. O aumento de celularidade é uma das principais indicações de mastite subclínica, outros indicadores podem incluir aumento de bactéria no leite, redução da produção, alteração na composição e qualidade do leite (ASHRAF; IMRAN, 2018).

De acordo com os agentes envolvidos, podem ser classificados em contagiosos, ambientais, e conforme patogenicidade em principais e oportunistas (HAWARI *et al.*, 2008).

Os principais métodos para o diagnóstico da mastite clínica envolvem: teste da caneca de fundo escuro, exame do úbere e da vaca e monitoramento de animais positivos para mastite (RADOSTITIS *et al.*, 2002).

O teste de fundo escuro é utilizado como exame visual do leite e observação de coágulos e alterações do leite, como grumos, pus e sangue. A inspeção e palpação do úbere também são necessários para o diagnóstico da enfermidade, pois além das alterações do leite outro indicativo de mastite clínica são as alterações no úbere. O úbere pode apresentar edema, endurecimento do quarto acometido ou alteração na palpação, dor quando o animal apresenta reatividade quanto tocado, rubor, aumento de temperatura e em casos severos perda de função (RADOSTITIS *et al.*, 2002).

Existem várias alternativas para realizar o diagnóstico de mastite de formas diretas e indiretas. As formas indiretas identificam principalmente aumento da celularidade do leite, já as formas diretas identificam os agentes patogênicos (AGHAMOHAMMADI *et al.*, 2020).

As técnicas diagnósticas indiretas contam com o *California Mastitis Test* (CMT). Este teste é caracterizado por homogeneizar amostra de leite em detergente aniônico que irá atuar no rompimento do núcleo e do citoplasma das células de defesa e com isso ocorrerá a liberação do material genético no meio reagente causando ou não formação gelatinosa (SMOLENSKI *et al.*, 2007). Além do *California Mastitis Test*, técnicas de contagem de células somáticas também são utilizadas. Desta forma, estas auxiliam na evolução do diagnóstico da mastite subclínica (VARGAS *et al.*, 2014).

Métodos de diagnósticos diretos encontram-se à cultura para detecção de microrganismos tradicionais (VIGUIER *et al.*, 2009) e atualmente cultura na fazenda (LAGO *et al.*, 2011). Juntamente com a avaliação microbiológica, pode-se avaliar o perfil de sensibilidade microbiana dos agentes, o que auxiliam nas condutas terapêuticas (RIBEIRO,

2008). Outra forma de identificação de patógenos é a espectrometria de massa de tempo de voo de ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF) (BARREIRO *et al.*, 2010).

O MALDI-TOF é uma técnica que utiliza ionização para identificar as proteínas das bactérias e tem sido utilizada nas rotinas de diagnóstico microbiológico na clínica humana e veterinária, pois possibilita a identificação precisa das bactérias (SENG *et al.*, 2010). Além da precisão de diagnóstico, o método é mais rápido quando comparado às metodologias convencionais para diagnóstico de microrganismos (ILNA *et al.*, 2009).

Os agentes bacterianos classificados como contagiosos se disseminam durante a ordenha através dos tetos contaminados por meio da ordenhadeira e contato com as mãos de ordenhadores (LANGONI, 2013). São identificados como agentes contagiosos: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* não aureus (SCN), *Mycoplasma* spp., *Corynebacterium bovis* (LANGONI *et al.*, 2011).

Por outro lado, os agentes caracterizados como ambientais diferente dos contagiosos não colonizam a glândula mamária, mas causam mastite devido a contaminação do ambiente e alta carga bacteriana nos conjuntos de teteiras da ordenha, exterior dos tetos e úbere proveniente das camas ou pasto, o que permite que os patógenos através do canal do teto cheguem até a cisterna da glândula mamária, ocasionando uma infecção e que através da resposta do organismo frente ao agente inicia-se uma resposta inflamatória (BRADLEY, 2002). Os patógenos ambientais mais comuns: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas* spp., *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, leveduras, algas e fungos (LANGONI *et al.*, 2011).

Após a *Staphylococcus aureus*, os *Streptococcus* são considerados o segundo grupo de microrganismos de importância etiológica na mastite de bovinos, quatro espécies são encontradas em rebanhos: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus uberis*. A infecção intramamária causada por *Streptococcus agalactiae* causa aumento da contagem de células somáticas no leite de animais e aumento de contagem bacteriana, devido à alta capacidade de liberação no leite (INNINGS *et al.*, 2005).

Os *Streptococcus agalactiae* colonizam principalmente os ductos e a cisterna glândula mamária, e devido sua capacidade de multiplicação e liberação de metabólitos ocorre uma resposta inflamatória intensa que por consequência provoca danos no tecido mamário (CARVALHO *et al.*, 2017). A infecção é preferencialmente subclínica causando um aumento da celularidade (KEEFE, 2012).

Streptococcus uberis são bactérias gram-positivas, consideradas oportunistas e transmitidas pelo ambiente. Por causar infecções crônicas algumas cepas tornam-se

contagiosas, além de ter alta capacidade de adesão e colonização do tecido mamário (LANGONI *et al.*, 2011).

Staphylococcus aureus, é um dos principais patógenos contagiosos causadores de mastite, causa infecções crônicas que não respondem à terapia antimicrobiana, dissipando pelo rebanho como consequência causando grandes perdas econômicas (KRÖMKER; LEIMBACH, 2017). Sua transmissão ocorre pelo contato entre vacas sadias e contaminadas através das teteiras, toalhas de uso compartilhado e mãos dos ordenhadores.

Nem todas as infecções são transmitidas a partir da mesma cepa entre os animais causando dentro dos rebanhos diferentes cepas de *Staphylococcus spp.*, ou seja, outras fontes além da glândula mamária podem ser fontes de infecção. Após a colonização através do canal do teto normalmente a *Staphylococcus aureus* causa uma infecção crônica e subclínica com aumento de CCS em aproximadamente 600.000 céls/ml, possuindo alta capacidade de colonização e adaptação na glândula mamária devido entre outros fatores, a formação de biofilme (BOTARO *et al.*, 2015).

Klebsiella pneumoniae são microrganismos gram-negativos, normalmente encontrados no ambiente, na cama dos animais e no pasto, normalmente estão presentes em camas com materiais de madeira como serragem e maravalha. São responsáveis por grandes surtos de mastite nos rebanhos. Grande parte das infecções causadas por *Klebsiella spp.* ocorrem durante as primeiras semanas antes do parto e nos primeiros meses de lactação, principalmente relacionado ao ambiente onde os animais ficam e os cuidados e manejos pré-parto (SHUKKEN *et al.*, 2012).

O bem-estar animal é quando o animal tem a possibilidade de se adaptar ao local onde vive, e tem a capacidade de expressar seu comportamento natural (ROBICHAUD *et al.*, 2019). Fatores importantes que prejudicam o bem-estar e a saúde dos bovinos leiteiros envolvem as instalações, equipamentos, práticas de manejo, higiene de instalações e sistemas de criação (JIANG *et al.*, 2021). De acordo com Santana *et al.*, (2017) quando os animais são expostos ao calor extremo, chegando ao estresse calórico por longos períodos, a ação das células imunes será dificultada e devido a isso o animal fica predisposto a contaminação por agentes causadores de mastite.

Um programa de controle de mastite eficaz inclui diagnóstico precoce da infecção, boas práticas de manejo e biossegurança no momento da ordenha visando reduzir a chance de transmissão de bactérias contagiosas. A saúde e a higiene do úbere das vacas têm grande impacto na ocorrência de novas infecções (KEEFE, 2012), com isso medidas de higiene podem reduzir esse impacto.

A preparação do úbere antes da ordenha é necessário produzir um leite de qualidade. Entre as medidas de controle incluem-se utilização de *pré-dipping* antes da ordenha, secagem dos tetos com papel toalha e após a ordenha utilização de *pós-dipping* (WAGNER; RUEGG, 2002).

Além dos manejos de higiene ambiental e durante o processo de ordenha, deve-se incluir a utilização de antibioticoterapia de forma estratégica, para buscar uma redução nos problemas futuros com resistência bacteriana (RUEGG *et al.*, 2017).

Algumas medidas para o controle e prevenção de reintrodução de novas cepas de *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus* são comumente utilizadas, entre elas a terapia de vaca seca bem como protocolos de biossegurança nos manejos de ordenha (KEEFE, 2012). O uso de antibióticos é realizado há muitos anos com mais de uma finalidade, com objetivo terapêutico no caso da terapia de vaca seca, para curar infecções existentes, terapia em lactação nos casos clínicos ou fins preventivos (LANGONI, 2017).

A seleção de antibióticos para tratamento de mastite clínica deve ser feita através do histórico do animal, etiologia, agente microbiológico e deve ser baseado nos princípios terapêuticos recomendados (RUEGG *et al.*, 2017). Embora os antibióticos sejam frequentemente utilizados em casos de mastite, mesmo sem avaliar a gravidade das doenças, sinais clínicos e patógenos, a maioria dos casos não graves não serão beneficiados com seu uso. E isso se dá devido a capacidade de adaptação de algumas bactérias e formação de biofilme, o que torna o tratamento ineficaz (RAINARD *et al.*, 2018).

A hipótese do presente estudo é que a utilização do ozônio na aplicação intramamária causa estimulação da ação imune devido ao leve estresse oxidativo envolvido, além da sua ação bactericida agindo diretamente na parede celular. Com isso, o objetivo é avaliar a redução da celularidade no leite em diferentes técnicas de contagem, diminuição de casos de mastite subclínica, menor taxa de animais contaminados, cura bacteriológica e manutenção da saúde da glândula mamária.

2. ARTIGO

OZONIOTERAPIA E SUA RELAÇÃO COM A SAÚDE DA GLÂNDULA MAMÁRIA EM BOVINOS DA RAÇA HOLANDESA

Maria Victória Zangrande Pecoits*
Luciana Bignardi Brisola Casimiro da Costa**
Maiara Garcia Blagitz ***

RESUMO

A mastite desempenha um papel importante na indústria leiteira com consideráveis perdas econômicas que prejudicam a saúde e o bem-estar animal. Diante disso, os objetivos do presente estudo foram: avaliar o efeito da ozonioterapia em relação à manutenção da saúde da glândula mamária, quanto à cura mastite subclínica, redução da celularidade e cura microbiológica dos quartos mamários tratados. Foram utilizadas 50 amostras de leite provenientes de quartos mamários de 44 vacas da raça Holandesa. Após a seleção dos animais, as aplicações foram realizadas por via intramamária com a utilização de uma sonda e seringa de 50 mL estéreis. A extração do ozônio foi a partir do aparelho gerador OZONEVET®. A concentração aplicada foi de 35µg, somou-se um total de quatro aplicações com intervalos de 48 horas entre elas, dia 1, dia 3, dia 5, dia 7. Para a avaliação de eficiência do tratamento, foram realizadas coletas de leite para análise de CCS (contagem de células somáticas) em diferentes técnicas e análise de MALDI-TOF. Os dados foram analisados através do software GraphPad Prism® na versão 9.5.1. O nível de significância foi considerado $p < 0,05$. Como resultado, com o tratamento de ozonioterapia, houve a redução dos escores no teste de CMT entre os dias um e dia oito, referindo-se à uma redução de celularidade no leite ($p=0,0001$). A contagem de células mononucleares e polimorfonucleares, pelo método de Prescott & Breed, apresentou redução quando comparado o dia 0 e o dia 8 ($p=0,0001$). A mediana referente à contagem de células mononucleares no dia 1 quando comparado com o dia 8, houve uma redução no número de células. A células polimorfonucleares apresentaram redução na contagem quando comparado o dia 1 com o dia 8, após a ozonioterapia. A contagem automática de células somáticas (cels/mL), não apresentaram diferenças estatística entre os momentos antes e após a ozonioterapia. Os resultados alcançados na análise microbiológica do leite indicaram redução dos casos positivos entre o momento basal e após a ozonioterapia. Portanto, conclui-se que a ozonioterapia melhora a saúde da glândula mamária agindo de forma positiva nas células de defesa, favorecendo o aumento de macrófagos e reduzindo o número de neutrófilos. Também reduz os graus no teste do CMT e os casos positivos na análise microbiológica. Com isso, a técnica pode ser incluída para melhoria da saúde da glândula mamária, redução no uso de medicamentos e conseqüentemente redução nos custos e melhora significativa da qualidade do leite.

Palavras-chave: Ozônio, mastite bovina, cura microbiológica, antimicrobianos, tratamento.

* Médica Veterinária – Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS). Mestre. E-mail: mzangrande@gmail.com.

ABSTRACT

Mastitis performs an important role in the dairy industry, causing considerable economic losses and damaging animal health and welfare. The objectives of this study were to evaluate the effect of ozone therapy on maintaining the health of the mammary gland, curing subclinical mastitis, reducing cellularity and microbiological healing of the treated mammary quarters. Fifty milk samples from the mammary quarters of 44 Holstein cows were used. After selecting the animals according to the selection criteria, the applications were carried out intramammary using a sterile 50 mL probe and syringe. The ozone was extracted using an OZONEVET® generator and the concentration applied was 35µg, in a total of 4 applications with 48-hour intervals between them. To assess the efficiency of the treatment, milk was collected for analysis of SCC (somatic cell count) using different techniques and MALDI-TOF analysis. The data was analyzed using GraphPad Prism® software in version 9.5.1. The significance level was considered to be $p < 0.05$. The ozone therapy treatment resulted in a reduction in the CMT test scores between days 1 and 8, referring to a reduction in milk cellularity ($p=0.0001$). The mononuclear and polymorphonuclear cell count using the Prescott & Breed method showed a reduction when comparing day 0 and day 8 ($p=0.0001$). There was a reduction in the median number of mononuclear cells on day 1 compared to day 8. Polymorphonuclear cells showed a reduction in count when comparing day 1 with day 8 after ozone therapy. The automatic somatic cell count (cels/mL) showed no statistical difference between the moments before and after ozone therapy. The results achieved in the microbiological analysis of milk indicated a reduction in positive cases between baseline and after ozone therapy. It can be concluded that ozone therapy improves the health of the mammary gland by acting positively on defense cells, favoring an increase in macrophages and reducing neutrophils. It also reduces CMT test scores and positive cases in microbiological analysis. With this, the technique can be included in the field in order to improve mammary gland health, reduce the use of medication and consequently reduce costs and significantly improve milk quality.

Keywords: Ozone, bovine mastitis, microbiological cure, antimicrobials, treatment.

INTRODUÇÃO

A mastite nos bovinos é uma reação inflamatória que afeta a glândula mamária, causada principalmente por uma infecção bacteriana (RUEGG *et al.*, 2014). É uma preocupação significativa no setor lácteo em todo o mundo devido ao seu impacto na saúde animal, na produção e na qualidade do leite. Esta doença provoca perdas econômicas para os produtores devido a diminuição da produção de leite, aos custos de tratamento e ao potencial descarte das vacas afetadas (HALASA *et al.*, 2007).

Existem várias alternativas para realizar o diagnóstico de mastite de formas diretas e indiretas. As formas indiretas identificam principalmente aumento da celularidade do leite e envolvem a contagem das células somáticas em diferentes métodos, como por exemplo, contagem automática por citometria de fluxo, contagem por microscopia direta (VARGAS *et al.*, 2014) ou pela técnica de Prescott & Breed (1910).

Já as formas de diagnóstico diretas identificam os agentes patogênicos e envolvem diferentes métodos como crescimento bacteriano em meios de cultura e o MALDI-TOF. Além disso, é possível o diagnóstico por meio da ionização das proteínas das bactérias (AGHAMOHAMMADI *et al.*, 2020; BARREIRO *et al.*, 2010).

O aspecto de saúde pública da mastite bovina gira principalmente em torno da segurança e da qualidade do leite. O leite mastítico pode conter níveis mais elevados de células somáticas, bactérias e substâncias inflamatórias, o que pode levar a alterações na composição e qualidade do leite. Ademais, influenciar a segurança dos produtos lácteos e a sua adequação ao consumo humano (AGHAMOHAMMADI *et al.*, 2020).

A contaminação do leite com bactérias patogênicas devido a mastite representa um risco potencial para a saúde dos consumidores. Embora a pasteurização elimine eficazmente muitos microrganismos nocivos, incluindo os associados a mastite, garantir a qualidade do leite cru é crucial para prevenir a transmissão de agentes patogênicos e manter a segurança dos consumidores nos produtos lácteos (BARKEMA *et al.*, 2006).

Além disso, o uso de antibióticos para tratar a mastite traz preocupações sobre a resistência antimicrobiana. A utilização excessiva ou incorreta de antibióticos pode contribuir para o desenvolvimento de bactérias resistentes aos antibióticos, o que pode potencialmente afetar a eficácia dos antibióticos utilizados (BARKEMA *et al.*, 2006).

Práticas de gestão adequadas, incluindo boa higiene, monitoração regular e tratamento imediato da mastite quando necessário, são essenciais para minimizar a sua ocorrência e o seu impacto na saúde animal e na saúde pública (KEEFE, 2012). Além disso, a conscientização do uso responsável de antibióticos e a adesão às normas de qualidade do leite são vitais para garantir a segurança dos produtos lácteos consumidos pelo público (RAINARD *et al.*, 2018).

Com a conscientização dos consumidores em busca de produtos lácteos com mais qualidade, houve uma movimentação da comunidade científica em busca de terapias integrativas para a cura dessa doença, como por exemplo, a aplicação de ozônio na glândula mamária. Atualmente, na medicina de grandes animais, o ozônio tem sido utilizado no tratamento de doenças reprodutivas, doenças podais, ferimentos e de doenças da glândula mamária (MALI *et al.*, 2020).

Depois que o ozônio é formado, ele reage com doadores de elétrons que sofrem oxidação, o que irá gerar o O₃, considerado ânion radical. Este irá se decompor em radical hidroxila formando moléculas de dióxigênio, tornando o ozônio oxidante potente (GROOTVELT *et al.*, 2004).

O ozônio tem como mecanismos de ação induzir o estresse oxidativo moderado ao interagir com ácidos graxos insaturados presentes nas membranas celulares, essa interação

aumenta a produção de antioxidantes endógenos, a perfusão local e aumenta a oxigenação, além de estimular as respostas imunes (SMITH *et al.*, 2017).

Uma das vantagens da utilização desta terapia são suas variadas formas de aplicação como via intramuscular, via subcutânea, via intramamária e via intrauterina. A terapia tem sido utilizada na clínica de bovinos em casos de mastite e foi constatado que o gás é capaz de reduzir a contagem de células somáticas, e após seu tratamento a ozonioterapia não apresentou resíduo no leite (OGATA; NAGAHATA, 2000; ONYAY *et al.*, 2015).

Estudos realizados demonstram que o uso de tratamentos intramamários com ozônio reduziram em até 60% os casos de mastite aguda, e concordam que a terapia com ozônio é eficaz, rápida e barata contra a mastite clínica e subclínica (OGATA *et al.*, 2000).

A eficiência no tratamento de doenças com o ozônio explica-se devido seus mecanismos de ação que envolvem induzir o estresse oxidativo moderado ao interagir com ácidos graxos insaturados presentes nas membranas celulares, essa interação aumenta a produção de antioxidantes endógenos, a perfusão local e aumenta a oxigenação, além de estimular as respostas imunes (SMITH *et al.*, 2017).

Tendo em vista o impacto dos casos de mastite, bem como o uso indiscriminado de antimicrobianos, acredita-se que a utilização do ozônio na aplicação intramamária causa estimulação da ação das células de defesa, além da sua ação bactericida que age diretamente na parede celular. Com isso, os objetivos deste estudo foram: avaliar o efeito da ozonioterapia em relação à manutenção da saúde da glândula mamária, quanto à cura mastite subclínica, redução da celularidade e cura microbiológica dos quartos mamários tratados

MATERIAL E MÉTODOS

Cômite de ética e pesquisa:

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de animais (CEUA) da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), através do protocolo n°: 9028160522.

Local de estudo, amostragem e seleção dos animais:

O experimento foi realizado nos meses de fevereiro a março em fazenda leiteira localizada no estado do Paraná, Brasil, entre os meses de fevereiro e março de 2023. As vacas foram mantidas em condições ambientais homogêneas e foram alojadas em sistema *Free Stall* durante todo período experimental.

A seleção dos animais para o estudo foi realizada baseada nos casos de mastite no rebanho. Após a seleção dos animais que atenderam os critérios de inclusão os animais foram submetidos às aplicações de ozônio.

Antes do início do experimento, os animais foram previamente selecionados a partir do histórico da propriedade. Foram avaliadas todas as vacas em lactação da raça holandesa e selecionadas aquelas que atenderam os seguintes critérios de inclusão: vacas no início, meio e final de lactação que não estavam próximas ao período de secagem (65 dias antes da data prevista do parto); animais positivos em um ou mais quartos mamários no teste de *California Mastitis Test* (CMT), considerando negativo, traços, escore 1, escore 2 e escore 3; vacas que obtiveram contagem de células somáticas automática (CCS) acima de 200.000 céls/mL na avaliação individual com um pool dos quatro tetos; animais que não passaram por tratamentos com antibiótico 30 dias antes do início do experimento;

A partir destes critérios, foram utilizadas 50 amostras de leite provenientes de quartos mamários de 44 vacas da raça Holandesa. Para a determinação do quarto mamário que recebeu o tratamento com ozônio, foi realizado previamente o teste de CMT. Os tetos que obtiveram resultados positivos no teste foram selecionados para a terapia.

Coleta de amostras de leite:

As coletas de amostras de leite foram realizadas de forma padronizada antes do início da ordenha, após a desinfecção dos tetos com *pré-dipping* e gaze com álcool 70°. Em todas as etapas foram utilizadas luvas descartáveis e realizada a desinfecção das mãos com álcool 70°. As luvas foram trocadas entre os animais.

As alíquotas para as técnicas de CCS diferencial, CCS microscópica e para o MALDI-TOF foram realizadas nos momentos D1 (antes da 1ª aplicação de ozônio) e D8 (um dia após a última aplicação de ozônio). As coletas de amostras de CCS automática foram realizadas nos momentos D1, D3 (após a 2ª aplicação de ozônio) e D8.

Para a realização do teste de CMT e para CCS microscópica pela técnica de Prescott & Breed as coletas foram realizadas em tubos cônicos com capacidade de 15 mL. As amostras foram encaminhadas e processadas no Laboratório da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS).

As amostras destinadas para análise microbiológica pela técnica de MALDI-TOF, foram coletadas de forma asséptica em tubos estéreis de 5 mL após a higienização dos tetos com gaze e álcool 70°. Todos os responsáveis pela coleta usaram luva cirúrgica estéril. Após a coleta essas amostras foram mantidas em gelo e transportadas para o laboratório e congeladas em freezer -20°C. Posteriormente foram enviadas para o laboratório Qualileite na cidade de Pirassununga - SP em caixa isotérmica de isopor e gelo reciclável.

As amostras para CCS diferencial foram coletadas em tubos cônicos com capacidade de 50 mL, dos quais 25 mL eram contidos de leite e a mesma proporção de solução PBS - Solução salina tamponada com fosfato (1:1).

A coleta de amostras para CCS automática foram realizadas em tubos específicos com conservante e encaminhadas ao laboratório PARLEITE (pertencente à APCBRH) para análise.

Processamento de amostras:

California Mastitis Test

O CMT é realizado de forma rápida e prática principalmente para o diagnóstico de mastite subclínica. Este teste consiste na interpretação da viscosidade formada entre o detergente aniônico do teste e o conteúdo celular das células de defesa presentes no leite. A interpretação do resultado se dá por meio da reação formada pela viscosidade, considerando negativo, traços, grau 1, grau 2 e grau 3.

Para a realização do CMT foram utilizados 2 mL de leite e 2 mL de detergente aniônico (1:1). Em seguida realizou-se a homogeneização por 30 segundos para a obtenção do resultado e posterior interpretação Schalm Noorlander (1957).

O teste foi utilizado para seleção dos animais e para identificação dos quartos mamários que foram submetidos à terapia de ozônio, bem como durante o acompanhamento da ozonioterapia.

Avaliação de CCS individual automática

Após a ordenha, a amostra de leite foi coletada em frasco plástico com capacidade de 30 mL, contendo uma pastilha do conservante Bronopol® (2-bromo-2 nitropropane-1-,3-diol), para a realização da contagem automática de células somáticas pela técnica de citometria de fluxo. A amostra foi mantida refrigerada por três dias até ser encaminhada para análise no Laboratório PARLEITE – APCBRH localizado em Curitiba - PR.

As amostras para CCS automática foram coletadas, nos dias D1 (antes da primeira aplicação), D3 e D8 (um dia após a última aplicação). Todos os animais que passaram pela ozonioterapia foram submetidos à avaliação de CCS do teto afetado para obter o valor quantitativo de células somáticas no leite. Estes resultados foram comparados antes e após o final das sessões de ozonioterapia.

Avaliação de CCS microscópica pela técnica Prescott & Breed

A contagem microscópica das células do leite foi realizada de acordo com o método de Prescott & Breed (1910). Foram distribuídos 10 µL de leite em uma área de um cm² em lâmina de microscopia. Subsequente, as lâminas foram secas em temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente, as lâminas foram fixadas em Metanol P.A. por dez minutos e após 24 horas coradas, utilizando o Kit de corante Panótico® rápido (Laborclin®, Brasil).

Para a determinação do número de células foi realizada a contagem em 100 campos visuais, utilizando a objetiva de imersão (100x). Para a obtenção do resultado final, obteve-se

a contagem de cada tipo celular, subdividindo em mononucleares e polimorfonucleares, e multiplicou-se a média pelo fator do microscópio previamente calculado (4000), expressando o resultado em número de células somáticas por mL de leite. Os leucócitos foram diferenciados em mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN).

Avaliação de CCS diferencial

As amostras de leite foram coletadas em tubos cônicos com capacidade de 50mL contendo 25mL de leite contendo a mesma proporção de 25 mL de PBS (Tampão Fosfato-salino) (1:1). No laboratório estas amostras foram submetidas à centrifugação (450g por 20 minutos, à 4°C), conforme técnica descrita por Koess e Hamann (2008).

O sobrenadante mais viscoso, na fase de separação, sobre a fração líquida (tampão de gordura), foi retirado e, após desprezar a fração sobrenadante invertendo-se os frascos uma única vez, mantiveram-se os mesmos invertidos para limpar os lados do frasco com papel macio e absorvente.

Os botões de células precipitadas foram desprendidos pela aspensão de PBS (Tampão Fosfato-salino) e na sequência foram concentrados em um único frasco e completando-se o volume de 50mL com PBS refrigerado. A suspensão foi pela segunda vez centrifugada, nas mesmas condições mencionadas. Após o sobrenadante foi desprezado e o botão de células ressuspenso em 1ml com meio enriquecido contendo RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute).

Amostras de 200µL da suspensão celular foram submetidas a citocentrifugação a uma força centrífuga real (FCR) de 28 g durante seis minutos. A partir do sedimento, confeccionaram-se as lâminas, e após 24 horas foram fixadas com Metanol P.A. por dez minutos. Por mais 24 horas estas foram coradas, pela coloração Panótico® (Laborclin®, Brasil), para então serem contadas e diferenciadas 100 células em microscopia de campo claro (1000x). Nestas foram observados os diferentes tipos celulares, como os neutrófilos, linfócitos e macrófagos.

Avaliação microbiológica do leite

Como as avaliações acima, o exame microbiológico foi realizado antes da primeira aplicação, no D1 e no D8. Uma amostra de leite de cada quarto mamário foi coletada assepticamente antes da ordenha, mantida em gelo e conservada em freezer -20°C até o momento que foram enviadas para laboratório Qualileite da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. A identificação dos agentes causadores de mastite subclínica foi realizada pela técnica de ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massa seguindo as recomendações de (Barreiro *et al.*, 2017).

Aplicação de ozonioterapia

A terapia de gás ozonizado foi aplicada após a ordenha nos quartos mamários que apresentaram os critérios descritos. Para a aplicação foram utilizadas luvas estéreis para reduzir a contaminação e as mesmas trocadas entre os animais. Antes da introdução da sonda pelo canal do teto, estes foram higienizados com gazes emergidas em álcool 70°. Após a aplicação, os tetos foram mergulhados em solução pós-*dipping* com base de iodo.

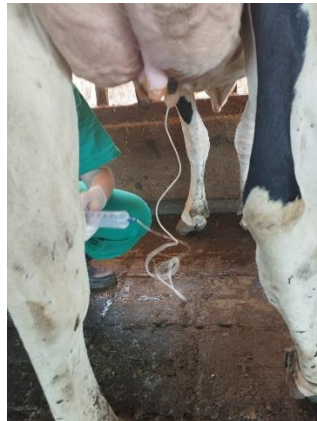
A aplicação foi realizada por via intramamária imediatamente após a retirada do gás do aparelho gerador OZONEVET®, com auxílio de uma seringa estéril de 50 mL e uma sonda de

polietileno estéril nº 06. A concentração aplicada foi de 35µg, num total de 4 aplicações com intervalos de 48 horas entre elas, conforme as recomendações do fabricante do aparelho ECCOVET® e a técnica também utilizada pelos autores Torrico *et al.* (2018) com modificações na quantidade de aplicações.

Análise estatística

Para definição da distribuição dos dados foi realizado o teste de normalidade *Shapiro-Wilk*, e definido se as variáveis são paramétricas ou não paramétricas, todos os grupos avaliados são vinculados entre si, ou seja, são amostras pareadas ou dependentes. As variáveis não paramétricas, compostas por dois grupos, foram descritas em medianas e intervalos interquartis (25% a 75%) e avaliadas pelo teste de *Wilcoxon*, e aquelas variáveis não paramétricas compostas por mais de dois grupos foram avaliadas pelo teste de Friedman. Variáveis paramétricas compostas por dois grupos foram descritas em média e desvio padrão e avaliadas pelo teste T pareado. O nível de significância foi considerado $p < 0,05$. As variáveis obtidas no MALTI-TOF, foram analisadas pelo teste de Fisher onde foi analisada a associação entre as variáveis. Os dados foram obtidos por meio do software GraphPad Prism® na versão 9.5.1.

Figura 1: Aplicação de ozonioterapia via intramamária



Fonte: arquivo pessoal

Figura 2: Extração do ozônio através do gerador e cilindro de oxigênio



Fonte: arquivo pessoal

RESULTADOS

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da ozonioterapia em relação à manutenção da saúde da glândula mamária, quanto à cura mastite subclínica, redução da celularidade e cura microbiológica dos quartos mamários tratados. Com isto, espera-se redução da contagem de células somáticas com consequente melhora na saúde do úbere e redução de quartos mamários positivos na análise microbiológica após o tratamento. Os quartos mamários que passaram pelo tratamento com ozônio à uma concentração de 35ug/mL obtiveram melhora detectada pela redução do escore de CMT e redução de contagem de células somáticas. Os resultados referentes a contagem de células somáticas podem ser observados na Tabela 1.

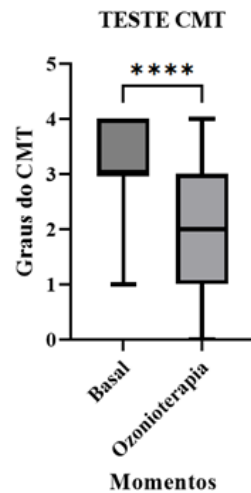
Tabela 1: Descrição da contagem de células somáticas do leite no diagnóstico de mastite entre os diferentes métodos utilizados

Variáveis	Momentos		Valor de p
	Momento 1 -Basal	Momento 8 - Ozonioterapia	
<i>Califórnia Mastitis Test</i> (escore)	3 (3-4) ^a	2 (1-3) ^b	p<0,0001
CCS automática (céls/mL)	2.108.000 (679.000-4.783.000) ^a	2.393.000 (790.000 – 4.969.000) ^a	p=0.1926
CCS Prescott & Breed – células mononucleares (céls/mL)	736.000 (576.000-920.000) ^a	424.000 (244.000-728.000) ^b	p<0,0001
CCS Prescott & Breed – células polimorfonucleares (céls/mL)	496.000 (304.000-598.000) ^a	200.000 (112.000-392.000) ^b	p<0,0001
CCS Prescott & Breed – contagem de células totais	1.232.000 (880.000-1.518.000) ^a	624.000 (356.000 -1.120.000) ^b	P<0,0001
CCS microscópica diferencial – Linfócitos (%)	37.00 (20.00 – 43.00) ^a	33.00 (24.00-47.00) ^a	p=0.1952
CCS microscópica diferencial – Neutrófilos (%)	47.00 (37.00-72.00) ^a	23.00 (13.00-54.00) ^b	p=0.0105
CCS microscópica diferencial – Macrófagos (%)	23.00 (13.00-54.00) ^a	24.00 (20.00-47.00) ^b	p=0,0243

Valores seguidos pelas mesmas letras minúsculas na mesma linha não diferem entre si e diferentes letras minúsculas na mesma linha diferem entre si, pelos testes Wilcoxon, teste de Friedman e teste T pareado, com 0,05% de possibilidade de erro.

No presente estudo, obteve-se com o tratamento de ozonioterapia redução dos graus no teste de CMT entre os momentos basal e após a ozonioterapia. Este resultado é reflexo da diminuição de celularidade no leite (p<0,0001), Na (Figura 3) a mediana referente aos resultados do momento 1 (basal) foi de: 3 (3–4), já a mediana referente ao momento 8 (após a ozonioterapia) foi de: 2 (1-3).

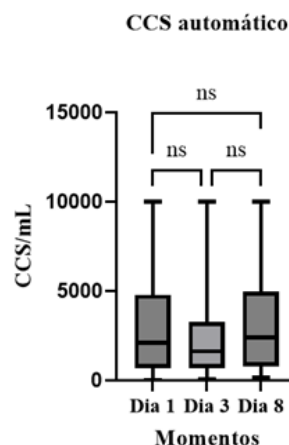
Figura 3: Comparação dos graus de mastite subclínica pelo teste de CMT entre o momento basal, antes da aplicação e após a ozonioterapia.



Os asteriscos denotam diferença ($p < 0,0001$) de celularidade entre o momento basal, antes da ozonioterapia e após a aplicação de ozônio.

Para a contagem de células somáticas automática (cels/mL), diferente das outras técnicas de contagem de células somáticas, as coletas foram realizadas em três momentos: momento 1 (basal); momento 3 (antes da segunda aplicação); momento 8 (24 horas após a última aplicação de ozônio). Foram encontrados os valores de mediana no momento 1 de: 2.108.000 (679.000-4.783.000) céls/mL, no momento 3 a contagem de células foi de: 1.622.000 (689.000-3.267.000) céls/mL e no momento 8 os resultados foram de: 2.393.000 (790.000-4.969.000) céls/mL ($p=0,1926$) não apresentando diferença estatística entre os momentos 1, 3 e momento 8, conforme apresentados na Figura 4.

Figura 4: Comparação de contagem de células somáticas automática durante as aplicações de ozônio.

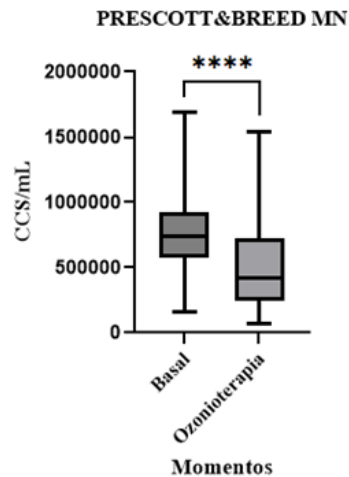


A ausência de asteriscos (ns) demonstram que não houve diferença estatística entre o momento 1, basal, o momento 3, 48 horas após a primeira aplicação e momento 8, depois da ozonioterapia ($p=0,1926$).

A contagem de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares pelo método de Prescott & Breed (1910) apresentaram redução quando comparado o momento 1 (basal) e o momento 8 (após a ozonioterapia) ($p < 0,0001$). Referente à contagem de células mononucleares (céls/mL) obteve-se como resultado no momento basal: 736.000 (576.000-920.000) céls/mL, já no

momento 8, após a ozonioterapia os resultados foram de: 424.000 (244.000-728.000) céls/mL, apresentando uma redução na celularidade quando comparados os dois momentos ($p < 0,0001$), resultados representados na Figura 5.

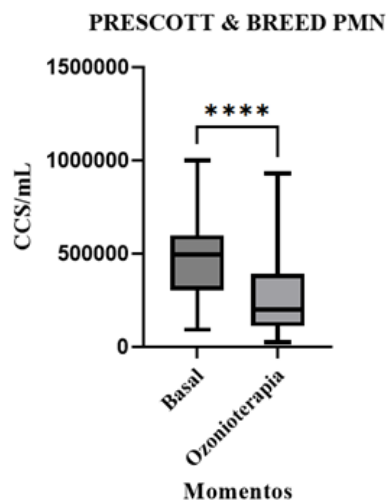
Figura 5: Contagem de células somáticas mononucleares pelo método de Prescott & Breed (1910) no momento basal e após a última aplicação de ozônio.



Os asteriscos denotam diferença ($p < 0,0001$) de celularidade mononuclear entre o momento basal, antes da ozonioterapia e após a aplicação de ozônio.

A contagem de células polimorfonucleares (céls/mL) no momento basal foi de: 496.000 (304.000-598.000) céls/mL, já no momento 8, após a ozonioterapia o resultado da contagem de células foi de: 200.000 (112.000-392.000) céls/mL, apresentando uma redução nas células somáticas do leite quando comparamos ambos os momentos ($p < 0,0001$), resultados estes apresentados na Figura 6.

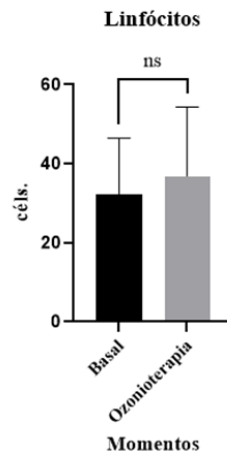
Figura 6: Contagem de células somáticas polimorfonucleares pelo método de Prescott & Breed (1910) no momento basal, antes da ozonioterapia e após a última aplicação de ozônio.



Os asteriscos denotam diferença ($p < 0,0001$) de celularidade mononuclear entre o momento basal, antes da ozonioterapia e após a aplicação de ozônio.

Durante a contagem de CCS diferencial as células foram diferenciadas em linfócitos, neutrófilos e macrófagos. A contagem de linfócitos pelo método diferencial (Figura 7), resultou no momento basal: 37 (20 - 43) céls, já após a ozonioterapia a contagem de linfócitos foi de: 33 (24 - 47) céls, não apresentando diferença estatística entre os momentos ($p=0,1952$).

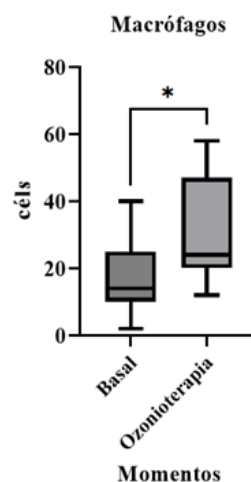
Figura 7: Contagem de linfócitos pelo método de contagem de células somáticas por microscopia direta no momento basal, antes da ozonioterapia e após a última aplicação de ozônio.



A ausência de asteriscos (ns), demonstram que não houve diferença estatística entre o Dia 1, basal, o Dia 3, 48 horas após a aplicação e Dia 8, depois da ozonioterapia ($p=0,1952$).

A contagem dos macrófagos resultou em aumento na quantidade de células de defesa após a ozonioterapia ($p=0,0243$). No momento basal o resultado da contagem foi de: 14 (10 - 25) céls, já no momento 8, após a ozonioterapia o resultado foi de: 24.00 (20.00-47.00) céls, apresentados na Figura 8.

Figura 8: Contagem de macrófagos pelo método de contagem de células somáticas por microscopia direta no momento basal, antes da ozonioterapia e após a última aplicação de ozônio.

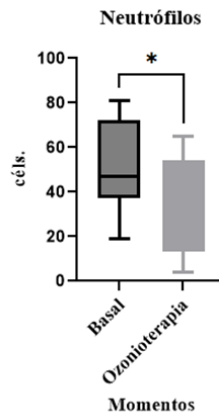


Os asteriscos denotam diferença de celularidade mononuclear entre o momento basal, antes da ozonioterapia e após a aplicação de ozônio ($p=0,0243$).

Na contagem de neutrófilos no momento basal o resultado foi de: 47 (37 - 72) céls, já após a ozonioterapia o resultado foi de: 23.00 (13.00-54.00) céls (Figura 9), representando uma redução na celularidade e apresentando diferença estatística entre os momentos ($p=0,0105$).

Resultado encontrado também na CCS pelo método de Prescott & Breed, onde ocorreu redução nas células polimorfonucleares após a aplicação de ozônio.

Figura 9: Contagem de neutrófilos pelo método de contagem de células somáticas por microscopia direta no momento basal, antes da ozonioterapia e após a última aplicação de ozônio.



Os asteriscos denotam diferença de celularidade mononuclear entre o momento basal, antes da ozonioterapia e após a aplicação de ozônio ($p=0,0105$).

Para a análise microbiológica, realizada pelo método de MALDI-TOF, as amostras foram coletadas nos quartos mamários onde o ozônio foi aplicado. Desta forma a cura microbiológica foi avaliada pelo isolamento bacteriano no momento basal e após a ozonioterapia. Foram considerados positivos os quartos mamários que apresentaram crescimento bacteriano, e quartos negativos quando não foram isoladas bactérias nas amostras.

Novas infecções foram consideradas quando amostras que eram negativas no momento basal apresentaram isolamento após a ozonioterapia, bem como animais que apresentaram diferentes patógenos no momento basal e no momento 8. Os resultados estão representados na Figura 10.

Figura 10: Análise microbiológica pelo método MALDI-TOF, espectrometria de massas do leite

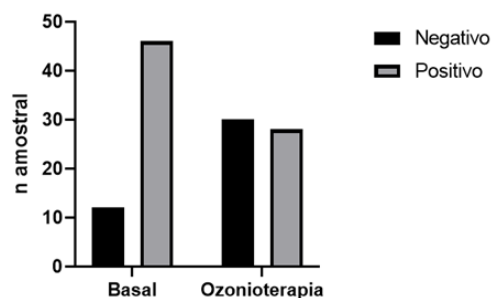
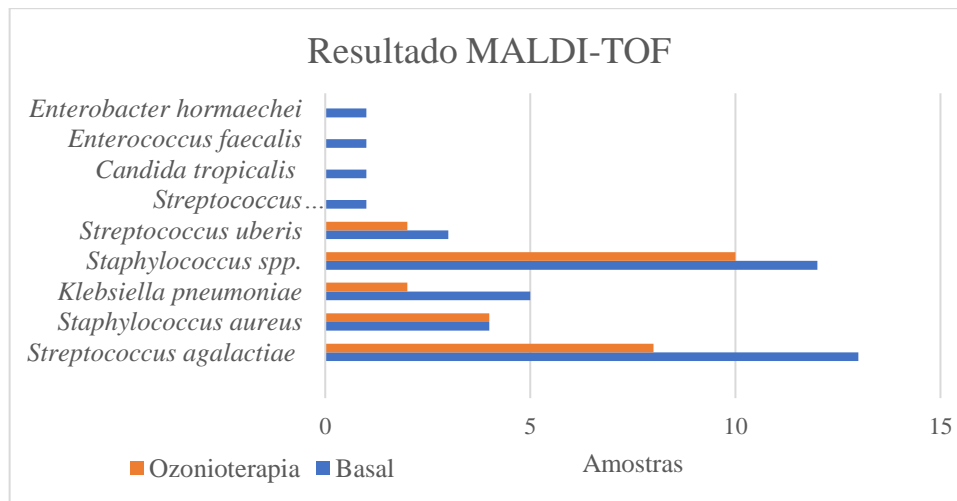


Figura 11: Variedade e frequência dos agentes patogênicos no momento basal, antes da ozonioterapia, e após a última aplicação de ozônio.



Diferença demonstrada na redução de resultados positivos entre o momento basal, antes da ozonioterapia, e após a última aplicação de ozônio.

O número e porcentagem de amostras positivas e negativas na análise microbiológica nos dois momentos da ozonioterapia, M1 (basal) e M8 (após a ozonioterapia) estão representados na (Tabela 2).

Obtiveram-se as seguintes proporções: 18% (n=9) das análises apresentaram resultados negativos em ambos os momentos; 42% (n= 22) das amostras resultaram em positivos no M1 e negativos no M8; já 6% (n=3) das amostras apresentaram resultados negativos no M1 e positivos no M8; enquanto 34% (n=18) das análises resultaram em positivos nos dois momentos, desses 26% (n=14) das amostras apresentaram patógenos diferentes entre o momento basal e após a ozonioterapia.

Tabela 2: Frequência e porcentagem de amostras positivas e negativas na análise microbiológica no momento basal e após a ozonioterapia.

		Ozonioterapia		Total
		Positivo	Negativo	
Basal	Positivo	18 (34%)	22 (42%)	40 (76%)
	Negativo	3 (6%)	9 (18%)	12 (24%)
Total		21 (40%)	31 (60%)	52 (100%)

Quando avaliada a frequência dos patógenos e o perfil microbiológico no momento basal, foram encontradas 40 amostras com isolamento bacteriano, ou seja, amostras positivas. O segundo grupo com maior quantidade de casos foram *Staphylococcus spp.* 26% (n=12), representando *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus chromogenes*.

Staphylococcus aureus foram diagnosticados em 8,6% (n=4) dos casos analisados, *Streptococcus uberis* representa 6,5% (n=3) das amostras positivas, *Streptococcus dysgalactiae* 2,1% (n=1), *Klebsiella pneumoniae* 10,8% (n=5), *Enterococcus faecalis* e *Enterobacter hormaechei* ambas representando 2,1% (n=1).

Ao analisar a variedade de patógenos presentes nas amostras (Figura 9) observou-se uma maior quantidade de quartos mamários infectados com a bactéria *Streptococcus agalactiae*, 13 casos (28,2 %) bem como aumento de celularidade das amostras.

Ao comparar o momento 1 com o momento 8, observou-se uma redução na variedade dos mesmos e redução de amostras com isolamento bacteriano, 21 amostras. Nesta fase encontrou-se *Streptococcus agalactiae* que diferente do momento basal resultou em 8 casos (28,5%), *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus uberis* ambos apresentaram 7,1% (n=2) dos casos positivos e *Staphylococcus aureus* representando 14,2%(n=4) dos casos.

DISCUSSÃO

Segundo autores Ogata e Nagahata (2000) a aplicação de ozônio intramamário em casos de mastite clínica de vacas leiteiras pode resultar em desinflamação do quarto mamário inflamado, bem como a cura frente os agentes bacterianos. Estes autores observaram que cerca de 60% das vacas com mastite clínica aguda, tratadas com ozonioterapia não necessitaram de antibióticos para recuperação. Este método de terapia com ozônio provou ser eficaz, seguro e econômico, não apresentando risco de resíduos no leite.

Scrollavezza *et al.*, (1997) avaliaram vacas leiteiras com mastite clínica e utilização da ozonioterapia. As aplicações locais foram realizadas com o gás em diferentes concentrações nos quartos acometidos e de acordo com a gravidade da doença. A escolha da concentração foi realizada de acordo com o grau da inflamação, aumento de CCS, casos agudos ou crônicos. Os pesquisadores apresentaram resultados positivos na redução de CCS automática, principalmente nos casos subclínicos que a ozonioterapia foi eficiente, resultado encontrado na atual pesquisa quando avaliados os resultados na contagem de células somáticas microscópica.

Alguns casos como por exemplo, casos de mastite causada por *Staphylococcus aureus*, ocorre grande variação de celularidade devido seu comportamento de eliminação sazonal e cíclico. Ou seja, estes agentes não necessariamente serão eliminados diariamente (WALKER *et al.*, 2011), fato que justifica a variação de contagem de células somáticas em algumas amostras.

Atualmente, na literatura, considera-se que quartos mamários com contagens de células somáticas no leite acima de 200.000 céls/mL são considerados infectados (SCHUKKEN *et al.*, 2003). Mas no início do processo infeccioso, a celularidade pode apresentar valores menores devido ao comportamento e adaptação das bactérias na glândula mamária (MIRA *et al.*, 2013). Por exemplo, em infecções por agentes oportunistas ou secundários pode-se observar o aumento discreto das células somáticas no leite (SCHUKKEN *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2016). Os resultados obtidos vão de encontro com estudos em bovinos que já demonstraram que a auto-hemoterapia ozonizada é capaz de aumentar a quantidade de células imunológicas sugerindo que o crescimento de linfócitos B acontece devido ao efeito da ozonioterapia por meio da liberação de interleucinas (TERASAKI *et al.*, 2011).

A contagem dos macrófagos resultou em aumento na quantidade de células de defesa após a ozonioterapia, resultado encontrado por Orakdogan *et al.* (2016) onde demonstrou que doses baixas de O₃ aumentam secreções de macrófagos. Este foi um dado importante encontrado no presente estudo representado pelo aumento de macrófagos após a última aplicação de ozonioterapia. este aumento significa que a glândula mamária está em busca da sua higidez após o tratamento com ozonioterapia, lembrando que na mama sadia há o predomínio de células mononucleares (SCHUKKEN *et al.*, 2003).

Em contrapartida na CCS pelo método de Prescott & Breed, as células mononucleares apresentaram uma redução no número de células, demonstrando diferença entre as técnicas, representando uma possível limitação do método Prescott & Breed já que na técnica da CCS diferencial, as amostras de leite integral passam por uma lavagem com PBS (Tampão salino) facilitando a visualização e diferenciação na lâmina, já o método Prescott & Breed o leite integral é colocado diretamente na lâmina. Outro fator importante é que no método de Prescott & Breed as células são diferenciadas somente em dois grupos, células mononucleares e polimorfonucleares, diferente da CCS diferencial onde as células são diferenciadas em macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos.

O aumento dos macrófagos após a ozonioterapia é um indicador de que o ozônio auxiliou na ação imune e na manutenção da saúde da glândula mamária, já que quando o tecido glandular mamário se apresenta saudável, este contém maior quantidade de macrófagos no leite. O aumento de macrófagos após as aplicações pode ser explicado pois quando O₃ reage com os

ácidos graxos e outros antioxidantes, forma-se H_2O_2 (peróxido de hidrogênio). O peróxido de hidrogênio difunde-se facilmente nas células imunes, demonstrando que atua na ação imune e regeneração do tecido (SMITH *et al.*, 2017).

Diante de um processo inflamatório os neutrófilos migram da circulação sanguínea para a glândula mamária em resposta a uma grande variedade de mediadores inflamatórios, principalmente às citocinas. Por serem caracterizadas como células de primeira linha de defesa celular (BANNERMAN *et al.*, 2004), a redução da contagem de neutrófilos é um indicador da capacidade do ozônio reduzir respostas inflamatórias nos tecidos.

Além da fagocitose das bactérias, os neutrófilos usam o sistema de metabolismo oxidativo para eliminar a bactéria. Quando estimulados, estes produzem espécies reativas de oxigênio que são importantes na ação contra os agentes patogênicos (BANNERMAN *et al.*, 2004). BOCCI *et al.*, (2006) sugeriram que a produção de citocinas pelos leucócitos é induzida pela ozonização, confirmando que o uso da ozonioterapia em concentrações corretas auxilia no sistema antioxidante e ação imunomoduladora do organismo.

Nosso estudo mostrou uma redução da resposta inflamatória na glândula mamária quando exposta ao gás ozônio, caracterizada pela redução no número de neutrófilos pela técnica de CCS diferencial e de células polimorfonucleares pela técnica de CCS microscópica. Esta redução indica eficácia do tratamento. Resultado semelhante foi encontrado em um estudo envolvendo vacas leiteiras pós-parto, com a utilização da ozonioterapia em casos de inflamação uterina. Os autores relatam redução na inflamação uterina após a utilização do gás de ozônio e solução destilada estéril no tratamento (ESCANDON, 2020).

Para a análise microbiológica, realizada pelo método de MALDI-TOF, as amostras foram coletadas nos quartos mamários infectadas e que foram tratadas com ozônio. Desta forma a cura microbiológica foi avaliada pelo isolamento no momento basal e após a ozonioterapia. Novas infecções foram consideradas quando amostras que eram negativas no momento basal apresentaram isolamento após a ozonioterapia, bem como animais que apresentaram diferentes patógenos no momento basal e no momento 8.

As novas infecções podem ser explicadas pelos manejos adotados na propriedade pela higiene de ordenha, que apresentavam algumas limitações, como higiene dos tetos realizados com panos úmidos. Melin *et al.*, (2002) relataram que uma boa higiene dos tetos antes da ordenha tem efeito benéfico e pode levar a um controle da contaminação bacteriana.

Estudos constataram que mais de 40% de bovinos em lactação, no rebanho, que são ordenhadas com os úberes sujos aumentou em aproximadamente 15% a taxa de contaminação no leite (ZUCALI *et al.*, 2015). Práticas de manejo na sala de ordenha como pré-dipping com desinfetantes específicos, podem reduzir novas taxas de infecção do rebanho (DOYLE *et al.*, 2015). Segundo Ruegg (2006) o controle da mastite e a produção de leite de qualidade dependem da manutenção de excelentes padrões de higiene.

Outro fator importante na ocorrência de uma nova infecção é a patogenicidade das bactérias e a capacidade de contaminação, tendo em vista que grande parte das novas infecções do presente estudo são causadas pelos grupos de patógenos *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus spp.* que são bactérias caracterizadas pela alta taxa de contaminação e alta capacidade de adaptação na glândula mamária. A transmissão normalmente ocorre durante a ordenha, através dos equipamentos de ordenha, mãos de ordenhadores e toalhas contaminadas (INNINGS *et al.*, 2005).

Torrito *et al.* (2018), utilizaram a mesma concentração e volume de ozônio gasoso de 35 $\mu\text{g/mL}$. Estes autores observaram que que 39% dos quartos mamários infectados apresentaram cura microbiológica, resultado semelhante encontrado no presente estudo onde ocorreu redução das amostras positivas entre o momento basal (79,3%) e após a ozonioterapia (48,2%).

A resposta positiva de alguns grupos de patógenos frente a aplicação da ozonioterapia pode ser explicada devido a ação do ozônio sobre a membrana celular, desestabilizando a superfície e ocorrendo extravasamento de íons, com isso ocorre a morte celular (FENG *et al.*, 2018).

Burton (2000) considerou o ozônio efetivo na luta contra mastite aguda e também crônica, incluindo as que não respondem bem à antibioticoterapia. Devido a peroxidação dos compostos da membrana celular as bactérias Gram-negativas devido sua morfologia são mais sensíveis ao ozônio, o que justifica a resposta ao tratamento de grupos de patógenos como *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus* ambientais (CHO *et al.*, 2010). Outra hipótese é a capacidade de reduzir a multiplicação desse grupo de patógenos, pois o ozônio penetra na membrana celular e reage com as intracelulares, podendo modificar o DNA da bactéria (ZHANG *et al.*, 2016).

O *Staphylococcus aureus* é um patógeno resistente aos antibióticos devido sua alta capacidade de adaptação na glândula mamária e formação de biofilme. Outro ponto importante que dificulta o diagnóstico e consequentemente o tratamento eficaz dos animais acometidos é a liberação bacteriana cíclica no leite, ou seja, as bactérias não são liberadas diariamente dificultando o diagnóstico, isso também pode ser relacionado ao fato de animais resultarem positivos para *Staphylococcus aureus* no momento 8, porém negativos no momento basal (KROMER; LEIMBACH, 2017).

Streptococcus agalactiae tem alta capacidade de contaminação, causa aumento exponencial de celularidade e contagem de bactérias no leite. A taxa de cura com antibióticos da classe dos beta-lactâmicos é alta facilitando o controle e erradicação no rebanho (CARVALHO *et al.* 2017), fato importante que quando relacionado aos resultados da ozonioterapia, pode-se observar boa taxa de cura de animais infectados com *Streptococcus agalactiae*.

Com isso a ozonioterapia mostrou-se eficiente, facilitando a erradicação de animais positivos no rebanho, possibilitando a redução no uso de antibióticos e evitando descarte de leite como citado por Ogata (2000).

Provavelmente, o mecanismo pelo qual o ozônio aumenta a imunidade intramamária é devido à ativação do metabolismo eritrocitário e ao aumento da resposta imune do tecido local, levando à normalização do microambiente (BOCCI, 2011). Assim, acredita-se que a redução de quartos mamários acometidos, bem como redução de amostras positivas no isolamento bacteriano foi alcançado devido ao efeito antiinflamatório e antibacteriano do ozônio na glândula mamária e na população de microrganismos.

CONCLUSÃO

Conclui-se com os resultados alcançados, que a ozonioterapia na concentração de 35µg/mL, com 4 aplicações via intramamária tem efeito benéfico sob a qualidade do leite, agindo de forma positiva através da resposta das células de defesa, favorecendo o aumento de macrófagos e reduzindo os neutrófilos, bem como redução nos casos positivos na análise microbiológica. Assim, esta nova estratégia terapêutica poderá ser utilizada como um método integrativo de rotina em programas de controle de mastite em fazendas leiteira, favorecendo a redução no uso de medicamentos de forma exacerbada e redução nos custos.

REFERÊNCIAS

- AGHAMOHAMMADI, M., Herd-level mastitis-associated costs on Canadian dairy farms. **Frontiers in veterinary science**, v. 5, p. 100, 2018.
- AMOSUN E. A., AJUWAPE A.T.P., AND ADETOSOYE A. I., Bovine Streptococcal Mastitis in Southwest and Northern States of Nigeria Afr. **Journal of Biomedicine Research**, v.13, p. 33 – 37, 2010.
- BANNERMAN, D. D., PAAPE, M. J., GOFF, J. P., KIMURA, K., LIPPOLIS, J. D., HOPE, J. C., Innate immune response to intramammary infection with *Serratia marcescens* and *Streptococcus uberis*. **Veterinary research**, v. 35(6), p. 681–700, 2004.
- BOCCI, V.A., Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. **Archives of medical research**, v. 37, p. 425–435, 2006.
- BOCCI, V. A., **Ozone, a new medical drug**. 2ª Edição, Springer, London, 2011.
- CARVALHO-C., G.A.; SILVA, J.R.; PAIVA, L.V.; CUSTÓDIO, D.A.; MOREIRA, R.O.; MIAN, G.F.; PRADO, I.A.; CHALFUN-JUNIOR, A.; COSTA, G.M., Molecular epidemiology of *Streptococcus agalactiae* isolated from mastitis in Brazilian dairy herds. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 48, p. 551–559, 2017.
- CHO, M., KIM, J., KIM, J.Y., YOON, J., KIM, J.H., Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants. **Water Research**, v. 44, p. 3410–3418, 2010.
- FENG, L., ZHANG, K., GAO, M., SHI, C., GE, C., QU, D., ZHU, J., SHI, Y., HAN, J., Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* by aqueous ozone. **Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 28, p. 1233–1246, 2018.
- GOMES F, HENRIQUES M., Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. **Current microbiology**, v. 72(4), p. 377–382, 2016.
- GROOTVELT, M., History of clinical applications of ozone. **Quintessence Publishing Books**, 2004.
- VARGAS, D. P. de, NÖRNBERG, J. L., MELLO, R. de O., SHEIBLER, R. B., BREDA, F. C., MILANI, M. P., Correlações entre contagem de células somáticas e parâmetros físico-químicos e microbiológicos de qualidade do leite. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, p. 473-483, 2014.
- INNINGS A., KRABBE M., ULLBERG M., HERRMANN B., Identification of 43 *Streptococcus* species by pyrosequencing analysis of the *rnpB* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5983-5991, 2005.
- KROMKER V, LEIMBACH S., Mastitis treatment-Reduction in antibiotic usage in dairy cows. **Reproduction Domestic Animal**, v. 52, p. 21, 2017.

- MALI, S.S., RANGNEKAR, M.N., AMLE, M.B., KHILLARE, K.P., MALI, A.B., MHASE, P.P., Efficacy of intrauterine ozone therapy in repeat breeder cows with subclinical uterine infection. **Haryana Veterinary**, v. 59, p. 83–86, 2020.
- MELIN, M., WIKTORSSON, H., CHRISTIANNSSON, A., MCLEAN, J., SINCLAIR, M., WEST, B., Teat cleaning efficiency before milking in DeLaval VMSTM versus conventional manual cleaning using *Clostridium tyrobutyricum* spores as marker. In: **Proceedings of the First North American Conference on robotic milking**, Canadá, 2002.
- MIRA C.S., DELLA LIBERA A.M.M.P., SOUZA F.N., BLAGITZ M.G., Correlação entre a contagem automática de células somáticas e a porcentagem de neutrófilos pela citometria de fluxo e pela técnica de citocentrifugação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65(5), p. 1403–1408, 2013.
- ORAKDOGEN M, USLU S, EMON ST, SOMAY H, MERIC ZC, HAKAN T., The effect of ozone therapy on experimental vasospasm in the rat femoral artery. **Turkish neurosurgery**, v. 26, p. 860-865, 2016.
- OGATA, A., NAGAHATA, H., Intramammary application of ozone therapy to acute clinical mastitis in dairy cows. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62(7), p. 681-686, 2000.
- ONYAY. F., KUCUKASLAN I, AY SS, FINDIK M., Ozone treatment in Veterinary Gynecology and Obstetrics: Review. *Turkiye Klinikle*. **Journal of Veterinary Science**, v. 6, p. 48-53, 2015.
- RAINARD P, FOUCRAS G, FITZGERALD JR, WATTS JL, KOOP G, MIDDLETON JR., Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. *Transbound Emerg Dis*, v. 65, p. 149–165, 2018.
- RUEGG, P. L., The role of hygiene in efficient milking. **WCDS advances in Dairy Technology**, v. 18, p. 285-293, 2006.
- RUEGG P.L., A 100-year review: mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science**. v. 100(12), p. 10381–10397, 2017.
- SCROLLAVEZZA, P., ABLONDI, M., POGLIACOMI, B., GUARESCHI, D., DALL AGLIO, R., POLDI, R., PEZZOLI, G., Ozone treatment in mastite, metritis and retention of fetal membranes in the dairy cow. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DO OZÔNIO, 2, 1997, Havana. p. 17-21
- SMITH NL, WILSON AL, GANDHI J, VATSIA S, KHAN SA., Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. **Medical Gas Research**, v. 7(3), p. 212-219, 2017.
- SCHUKKEN Y.H., WILSON D.J., WELCOME F., GARRISON-TIKOFSKY L. & GONZALEZ R.N., Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. **Veterinary Research**, v. 34(5), p. 579–596, 2003.
- SCHUKKEN Y.H., GONZÁLEZ R.N., TIKOFSKY L.L., SCHULTE H.F., SANTISTEBAN C.G., WELCOME F.L., BENNETT G.J., ZURAKOWSKI M.J. ZADOKS R.N. CNS mastitis: nothing to worry about? **Veterinary Microbiology**, v. 134(1-2), p. 9–14, 2009.

SOUZA F.N., CUNHA A.F., ROSA D.L.S.O., BRITO M.A.V., GUIMARÃES A.S., MENDONÇA L.C., SOUZA G.N., LAGE A.P., BLAGITZ M.G., LIBERA A.M.M.P.D., HEINEMANN M.B. & CERQUEIRA M.M.O.P., Somatic cell count and mastitis pathogen detection in composite and single or duplicate quarter milk samples. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36(9), p. 811–818, 2016.

TERASAKI, N., OGATA, A., OHTSUKA, H., TAMURA, K., HOSHI, F., KOIWA, M., KAWAMURA, S., Changes of immunological response after experimentally ozonated autohemoadministration in calves. **The Journal of veterinary medical science**, v. 63(12), p. 1327–1330, 2011.

WALKER J.B., RAJALA-SCHULTZ P.J., WALKER W.L., MATHEWS J.L., GEBREYES W.A. & DEGRAVES F.J., Variation in daily shedding patterns of *Staphylococcus aureus* in naturally occurring intramammary infections. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 23, p. 1114–1122, 2011.

ZHANG, Y., WU, Q., ZHANG, J., YANG, X., Alteration in *Escherichia coli* and *Streptococcus faecalis* cells induced by ozone. **Journal of Food Science Technology**, v. 1, p. 106–112, 2016.

ZUCALI, M., BAVA, L., COLOMBINI, S., BRASCA, M., DECIMO, M., MORANDI, S., TAMBURINI, A., CROVETTO, G.M., Management practices and forage quality affecting the contamination of milk with anaerobic spore-forming bacteria. **Journal of Science Food Agricola**, v. 95, p. 1294–1302, 2015.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados alcançados pode-se concluir que a aplicação de ozônio via intramamária na concentração de $35\mu\text{g/mL}$, com 4 aplicações, apresentou efeito benéfico sobre a qualidade do leite dos animais tratados, causando efeito benéfico através da resposta das células de defesa, favorecendo o aumento de macrófagos e reduzindo os neutrófilos, bem como redução nos casos positivos na análise microbiológica. Com isso observa-se que esta nova estratégia terapêutica pode ser utilizada como um método integrativo de rotina em programas de controle de mastite em fazendas leiteira, favorecendo a redução no uso de medicamentos de forma exacerbada e redução nos custos, produzindo um leite conseqüentemente mais saudável para o consumo humano.

4. REFERÊNCIAS

- AGHAMOHAMMADI, M., Herd-level mastitis-associated costs on Canadian dairy farms. **Frontiers in veterinary science**, v. 5, p. 100, 2018.
- ALNAKIP, M., The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions. **Journal of Veterinary Medicine**, 2014.
- AMOSUN E. A., AJUWAPE A.T.P., AND ADETOSOYE A. I., Bovine Streptococcal Mastitis in Southwest and Northern States of Nigeria Afr. **Journal of Biomedicine Research**, v.13, p. 33 – 37, 2010.
- ASHRAF, A., IMRAN, M., Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. **Tropical animal health and production**, v. 50, p. 1193-1202, 2018.
- ASHRAF, A., IMRAN, M., Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. **Animal Health Research Reviews**, 21(1), 36-49, 2020.
- BANNERMAN, D. D., PAAPE, M. J., GOFF, J. P., KIMURA, K., LIPPOLIS, J. D., HOPE, J. C., Innate immune response to intramammary infection with *Serratia marcescens* and *Streptococcus uberis*. **Veterinary research**, v. 35(6), p. 681–700, 2004.
- BARKEMA H.W., SCHUKKEN Y.H. ZADOKS R.N., Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 89(6), p. 1877–1895, 2006.
- BARREIRO S, A. L. B. S., DAVID, J. M., DAVID, J. P., Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p.113–123, 2018.
- BIAN Y, LV Y, L. Q., Identification of diagnostic protein markers of subclinical mastitis in bovine whey using comparative proteomics. *Journal of Veterinary Research*, v .58, p.385-392 2014.
- BLOWEY R., EDMONDSON P., **Milking machines and mastitis**. Mastitis control in dairy herds, 2ª ed. UK: CAB eBooks, CAB International, pp. 60–94, 2010.
- BOCCI, V., ZANARDI, I., TRAVAGLI, V., Oxygen/ozone as a medical gas mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects. **Medicinal Gas Research**, v.1, p. 1–9, 2011.
- BOCCI, V.A., Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. **Archives of medical research**, v. 37, p. 425–435, 2006.
- BORRELLI, E., Mechanism of action of oxygen ozone therapy in the treatment of disc herniation and low back pain. **Acta Neurochirurgica**. 108, 123–125, 2011.
- BOTARO, B. G., CORTINHAS, C. S., DIBBERN, A. G., E SILVA, L. F., BENITES, N. R., DOS SANTOS, M. V., *Staphylococcus aureus* intramammary infection affects milk yield and SCC of dairy cows. **Tropical animal health and production**, v. 47(1), p. 61–66, 2015.

- BRADLEY A.J., Bovine mastitis: an evolving disease. **Veterinary Journal**. Londres, p. 116-128, 2002.
- CAMPOS, A., CALLES, B. **La ozonoterapia, una opción de tratamiento en la medicina veterinaria**, 2003. Tese de mestrado: Centro de Investigaciones del Ozono. Universidad de Granma. Cuba, 2003.
- CARNEIRO, D. M. V. F.; DOMINGUES, P. F e VAZ, A.K., Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1934-1943, 2009.
- CARVALHO-C., G.A., SILVA, J.R., PAIVA, L.V., CUSTÓDIO, D.A., MOREIRA, R.O., MIAN, G.F., PRADO, I.A., CHALFUN-JUNIOR, A., COSTA, G.M., Molecular epidemiology of *Streptococcus agalactiae* isolated from mastitis in Brazilian dairy herds. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 48, p. 551-559, 2017.
- CHO, M., KIM, J., KIM, J.Y., YOON, J., KIM, J.H., Mechanisms of Escherichia coli inactivation by several disinfectants. **Water Research**, v. 44, p. 3410-3418, 2010.
- CONTRERAS G. A., RODRIGUEZ J. M., Mastitis: comparative etiology and epidemiology. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16(4), p. 339-356, 2011.
- De Vlieghe S., Fox L. K. K., Pieppers S., McDougall S., Barkema H. W., Invited review: mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **Journal of Dairy Science**, v. 95(3), p. 1025-1040, 2012.
- DELLA LIBERA A.M.M.P., ARAÚJO W.P., KITAMURA S.S., ROSENFELD A.M.F., BIRGEL E.H., Citologia do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) híbridadas criadas no Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural** v. 34(4), p. 1087-1092, 2004.
- DIAZ R., MENENDEZ D., TABARES F., High Frequency Ozone Generation System. **Ozone: Science & Engineering**, v. 23, p. 171-176, 2001.
- DJURICIC, D., LIPAR, M., SAMARDZIJA, M., Ozone treatment of metritis and endometritis in Holstein cows. **Veterinary Arhiv**, v. 84, p. 103-110, 2014.
- DOYLE, C.J., GLEESON, D., JORDAN, K., BERESFORD, T.P., ROSS, R.P., FITZGERALD, G.F., COTTER, P.D., Anaerobic sporeformers and their significance with respect to milk and dairy products. **Journal of Food Microbiology**, v. 197, p. 77-87, 2015.
- ENGINLER, S. O., SABUNCU, A., KAHRAMAN B. B., Comparison of Intramammary Ozone Administration Doses in Dairy Cows with Clinical Mastitis. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, p. 1260, 2015.
- ESCANDON, B. M., ESPINOZA, J. S., PEREA, F. P., QUITO, F., OCHOA, R., LOPEZ, G. E., GARZON, J. P. Intrauterine therapy with ozone reduces subclinical endometritis and improves reproductive performance in postpartum dairy cows managed in pasture-based systems. **Tropical Animal Health Production**, 2020.
- FENG, L., ZHANG, K., GAO, M., SHI, C., GE, C., QU, D., ZHU, J., SHI, Y., HAN, J., Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* by aqueous ozone. **Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 28, p. 1233-1246, 2018.

GOMES F, HENRIQUES M., Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. **Current microbiology**, v. 72(4), p. 377–382, 2016.

GROOTVELT, M., History of clinical applications of ozone. **Quintessence Publishing Books**, 2004.

GULMEN S, KURTOGLU T, METEOGLU I, KAYA S, OKUTAN H., Ozone therapy as an adjunct to vancomycin enhances bacterial elimination in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* mediastinitis. **Journal of Surgical Research**. v. 185, p. 64-69, 2013.

HAHN, G.F., OLIVEIRA, J.R., BOCK, P.M., O papel do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf-2) no diabetes mellitus. **Clinical Biomedicine Research**, v. 37, p. 203–2013, 2016.

HALASA T, HUIJPS K, ØSTERÅS O AND HOGVEEN H., Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. **The Veterinary Quarterly**, v. 29, p. 18–31, 2007.

HAWARI A. D., HASSAWI D. S., Mastitis in one humped she-camels (*Camelus dromedarius*) in Jordan. **The Journal of Biological Sciences**, v. 8, p. 958-961, 2008.

HOQUE, M.N., DAS, Z.C., TALUKDER, A.K., Different screening tests and milk somatic cell count for the prevalence of subclinical bovine mastitis in Bangladesh. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, p. 79–86, 2015.

HURLEY WL, THEIL PK., Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. **Nutrients**, v. 3(4), p. 442-74, 2011.

HUSSAIN R, JAVED MT, KHAN A., Changes in some biochemical parameters and somatic cell counts in the milk of buffalo and cattle suffering from mastitis. **Pakistan Veterinary Journal** v. 32, p. 418–421, 2012.

INAL, M., DOKUMACIOGLU, A., OZCELIK, E., UCAR, O., 2011., The effects of ozone therapy and coenzyme Q10 combination on oxidative stress markers in healthy subjects. **J. Med. Sci.** 180, 703–707.

INAL, M., DOKUMACIOGLU, A., OZCELIK, E., UCAR, O., The effects of ozone therapy and coenzyme Q10 combination on oxidative stress markers in healthy subjects. **Journal of Medicine Science**, v. 180, p. 703–707, 2011.

INNINGS A., KRABBE M., ULLBERG M., HERRMANN B., Identification of 43 *Streptococcus* species by pyrosequencing analysis of the *mnpB* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5983-5991, 2005.

JIANG, R., SHARMA, C., BRYANT, R., MOHAN, M. S., AL-MARASHDEH, O., HARRISON, R., TORRICO, D. D., Animal welfare information affects consumers' hedonic and emotional responses towards milk. **Food Research International**, v. 141, p. 110006, 2021.

JOBIM, M.; JOBIM, L. F. Células natural killer e vigilância imunológica. **Jornal de Pediatria**, v. 84, p. 58-67, 2008.

KEEFE G., Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v. 28(2), p. 203–216, 2012.

KOESS, C.; HAMANN, J., Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. *J. Dairy Res.*, v.75, p.225-232, 2008.

KROMKER V, LEIMBACH S., Mastitis treatment-Reduction in antibiotic usage in dairy cows. **Reproduction Domestic Animal**, v. 52, p. 21, 2017.

LABENS, R., SCHRAMME, M.C.A., BARR, A.R.S., Orthopaedics 1: Diagnosis of lameness/diseases of joints and bones. **Equine Medicine, Surgery and Reproduction**. Saunders, UK, 310–329. 2013.

LAGO, A., GODDEN, S. M., BEY, R., RUEGG, P. L., & LESLIE, K. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. **Journal of dairy science**, v. 94(9), p. 4441–4456, 2011.

LANGONI H., Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p.620-6, 2013.

LANGONI H., PENACHIO D. DA S., CITADELLA J.C.C., LAURINO F., FACCIOLI-MARTINS P.Y., LUCHEIS S.B., MENOZZI B.D., SILVA A.V. da., Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. p. 1059- 1065, 2011.

LINDE, A., ROSS, C. R., DAVIS, E. G., DIB, L., BLECHA, F., T. MELGAREJO, T., Innate immunity and host defense peptides in Veterinary Medicine. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.22, n.2, p.247-265, 2008.

MADEJ, P., PLEWKA, A., MADEJ, J. A., NOWAK, M., PLEWKA, D., FRANIK, G., GOLKA, D., Ozonotherapy in an induced septic shock. I. Effect of ozonotherapy on rat organs in evaluation of free radical reactions and selected enzymatic systems. **Inflammation**, v. 30(1-2), p. 52–58, 2007.

MALI, S.S., RANGNEKAR, M.N., AMLE, M.B., KHILLARE, K.P., MALI, A.B., MHASE, P.P., Efficacy of intrauterine ozone therapy in repeat breeder cows with subclinical uterine infection. **Haryana Veterinary**, v. 59, p. 83–86, 2020.

MELIN, M., WIKTORSSON, H., CHRISTIANNSSON, A., MCLEAN, J., SINCLAIR, M., WEST, B., Teat cleaning efficiency before milking in DeLaval VMSTM versus conventional manual cleaning using *Clostridium tyrobutyricum* spores as marker. In: **Proceedings of the First North American Conference on robotic milking**, Canadá, 2002.

MILKOVIC, L., GASPAROVIC, A.C., ZARKOVIC, N., Overview on major lipid peroxidation bioactive factor 4-hydroxynonenal as pluripotent growth regulating factor. **Free Radical Research**, v. 49, p. 850–860, 2015.

MIRA C.S., DELLA LIBERA A.M.M.P., SOUZA F.N., BLAGITZ M.G., Correlação entre a contagem automática de células somáticas e a porcentagem de neutrófilos pela citometria de fluxo e pela técnica de citocentrifugação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65(5), p. 1403–1408, 2013.

NEVES, R. B. S., Resposta imune da glândula mamária de bovinos: específica e inespecífica- Uso de citocinas na imunomodulação. 2011. 36p. Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Goiânia – GO.

OGATA, A., NAGAHATA, H., Intramammary application of ozone therapy to acute clinical mastitis in dairy cows. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62(7), p. 681-686, 2000.

ONYAY. F., KUCUKASLAN I, AY SS, FINDIK M., Ozone treatment in Veterinary Gynecology and Obstetrics: Review. *Turkiye Klinikle. Journal of Veterinary Science*, v. 6, p. 48-53, 2015.

ORAKDOGEN M, USLU S, EMON ST, SOMAY H, MERIC ZC, HAKAN T., The effect of ozone therapy on experimental vasospasm in the rat femoral artery. **Turkish neurosurgery**, v. 26, p. 860-865, 2016.

RADOSTITIS, O.M. GAY, C. C., BLOOD, D. C., HINCHCLIFF, K. W., **Clínica Veterinária - Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos**. 9ª ed. Editora Guanabara, 1772 p., 2002.

RAEISSADAT, S.A., RAYEGANI, S.M., FOROGH, B., ABADI, P.H., MORIDNIA, M., DEHGOLAN, S.R., Intra-articular ozone or hyaluronic acid injection: which one is superior in patients with knee osteoarthritis? A 6-month randomized clinical trial. **Journal of pain research**. v. 11, p.111–117, 2018.

RAINARD P, FOUCRAS G, FITZGERALD JR, WATTS JL, KOOP G, MIDDLETON JR., Knowledge gaps and research priorities in Staphylococcus aureus mastitis control. *Transbound Emerg Dis*, v. 65, p. 149–165, 2018.

RAINARD, P., The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. **Veterinary Research**, v. 34, p. 647-670, 2003.

RECIO DEL PINO, E., SERRANO, M. A., RODRIGUEZ Del Rio, M., Aspectos de la ozonoterapia en pacientes con neuropatía periférica epidérmica. **Rev. Cubana Enfermer**, 1999.

REIS, J. F., MADUREIRA, K. M., SILVA, C. P. C., BALDACIM, V. P. A., FAGLIARI, J. J., GOMES, V., Perfil sérico proteico de vacas Holandesas no período de transição. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, p. 587-595, 2016.

RIBEIRO M.G., **Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia**, p.759-771, Manual de Terapêutica Veterinária. 3ª ed. Roca, São Paulo, 2008.

ROBICHAUD, M. V., RUSHEN, J., PASSILLÉ, A. M., VASSEUR, E., ORSEL, K., PELLERIN, D., Associations between on-farm animal welfare indicators and productivity and profitability on Canadian dairies: I. On freestall farms. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 5, p. 4341-4351, 2019.

RUEGG P. L., ERSKINE R. J., MORIN DE., **Mammary Gland Health. Large Animal Intern Medicine**, 5ª ed. Edn. Mosby Elsevier, 2014.

RUEGG P.L., A 100-year review: mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science**. v. 100(12), p. 10381–10397, 2017.

RUEGG P.L., New perspectives in udder health management. **Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p.149-163, 2012

RUEGG P.L., Practical approaches to mastitis therapy on large dairy herds. In: Large Dairy Herd Management. **American Dairy Science Association, Champaign, IL**. p. 933–948, 2017.

RUEGG, P. L., The role of hygiene in efficient milking. **WCDS advances in Dairy Technology**, v. 18, p. 285-293, 2006.

SAFIAI, M.H., KASHIM, M.I.A., ISA, F.N.M., YUSOFF, A.F., JAMSARI, E.A., ZIN, D.M.M., Application of ozone therapy as an alternative treatment in Malaysia according to islamic perspective. **International Journal of Civil Engineering and Technology**, v. 9, p. 1444–1458, 2018.

SAGAI, M., BOCCI, V. Mechanisms of action involved in ozone therapy: is healing induced via a mild oxidative stress? **Medical Gas Research** v. 1, p. 1–18, 2011.

SANTANA, M. L., BIGNARDI, A. B., PEREIRA, R. J., STEFANI, G., & EL FARO, L., Genetics of heat tolerance for milk yield and quality in Holsteins. **Animal: an international journal of animal bioscience**, 11(1), 4–1, 2017.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O., Experiments and observation leading to development of California Mastitis Test. **JAVMA: Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.130, p.199-204, 1957.

SCHUKKEN Y.H., GONZÁLEZ R.N., TIKOFSKY L.L., SCHULTE H.F., SANTISTEBAN C.G., WELCOME F.L., BENNETT G.J., ZURAKOWSKI M.J. ZADOKS R.N., CNS mastitis: nothing to worry about? **Veterinary Microbiology**, v. 134(1-2), p. 9–14, 2009.

SCHUKKEN Y.H., WILSON D.J., WELCOME F., GARRISON-TIKOFSKY L. & GONZALEZ R.N., Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. **Veterinary Research**, v. 34(5), p. 579–596, 2003.

SCHUKKEN, Y., CHUFF, M., MORONI, P., GURJAR, A., SANTISTEBAN, C., WELCOME, F., ZADOKS, R., The "other" gram-negative bacteria in mastitis: *Klebsiella*, *serratia*, and more. The Veterinary clinics of North America. **Food animal practice**, 28(2), 239–256, 2012.

SCROLLAVEZZA, P., ABLONDI, M., POGLIACOMI, B., GUARESCHI, D., DALL AGLIO, R., POLDI, R., PEZZOLI, G., Ozone treatment in mastite, metritis and retention of fetal membranes in the dairy cow. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DO OZÔNIO, 2, 1997, Havana. p. 17-21

SENG, P., ROLAIN, J. M., FOURNIER, P. E., LA SCOLA, B., DRANCOURT, M., RAOULT, D., MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. **Future microbiology**, v. 5(11), p. 1733–1754, 2010.

SMITH NL, WILSON AL, GANDHI J, VATSIA S, KHAN AS., Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. **Medical Gas Research**, v. 7(3), p. 212-219, 2017.

SMOLENSKI, G., HAINES, S., KWAN, F. Y., BOND, J., FARR, V., DAVIS, S. R., STELWAGEN, K., WHEELER, T. T., Characterisation of host defence proteins in milk using a proteomic approach. **Journal of proteome research**, v. 6(1), p. 207–215, 2007.

SORDILLO, L. M., Mammary gland immunobiology and resistance to mastitis. *Veterinary Clinics*. **Food Animal Practice**, v. 34, n. 3, p. 507-523, 2018.

SOUZA F.N., CUNHA A.F., ROSA D.L.S.O., BRITO M.A.V., GUIMARÃES A.S., MENDONÇA L.C., SOUZA G.N., LAGE A.P., BLAGITZ M.G., LIBERA A.M.M.P.D., HEINEMANN M.B. & CERQUEIRA M.M.O.P. Somatic cell count and mastitis pathogen detection in composite and single or duplicate quarter milk samples. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36(9), p. 811–818, 2006.

SPADEA, L., TONTI, E., SPATERNA, A., MARCHEGANI, A., Use of ozone-based eye drops: a series of cases in veterinary and human spontaneous ocular pathologies. **Case reports in ophthalmology**, v. 9, p. 287–298, 2018.

SVILAND, S., WAAGE, S. Clinical bovine mastitis in Norway. **Preventive veterinary medicine**, v. 54, p. 65-78, 2002.

SZPONDER, T., WESSELY-SZPONDER, J., SWIECA, M., GRUSZECKI, T., The combined use of ozone therapy and autologous platelet-rich plasma as an alternative approach to foot rot treatment for sheep. A preliminary study. **Small Ruminant Research**, v. 156, p. 50–56, 2017.

TERASAKI, N., OGATA, A., OHTSUKA, H., TAMURA, K., HOSHI, F., KOIWA, M., KAWAMURA, S. Changes of immunological response after experimentally ozonated autohemoadministration in calves. **The Journal of veterinary medical science**, v. 63(12), p. 1327–1330, 2011.

TIZAOUI, C., Ozone: a potential oxidant for COVID-19 virus (SARS-CoV-2). **Ozone: Science & Engineering**, v. 42, p. 378–385, 2020.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**, 9ª ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

TOZZETTI, D. S., BATAIER, M. B. N.; ALMEIDA, L. R.; PICCININ, A. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas – revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, v. 6, p. 1-7, 2008.

VALACCHI, G., LIM, Y., BELMONTE, G., MIRACCO, C., ZANARDI, I., BOCCI, V., TRAVAGLI, V. Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice. **Wound Repair Regeneration**, 19, 107–115, 2011.

VARGAS, D. P. de, NÖRNBERG, J. L., MELLO, R. de O., SHEIBLER, R. B., BRENDA, F. C., MILANI, M. P. Correlações entre contagem de células somáticas e parâmetros físico-químicos e microbiológicos de qualidade do leite. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, p. 473-483, 2014.

VIGUIER, C., ARORA, S., GILMARTIN, N., WELBECK, K., O'KENNEDY, R. Mastitis detection: current trends and future perspectives. **Trends in biotechnology**, v. 27(8), p. 486–493, 2009.

WAGNER A. M., RUEGG PL The effect of manual forestripping on milking performance of Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, p. 804–809, 2002.

WALKER J.B., RAJALA-SCHULTZ P.J., WALKER W.L., MATHEWS J.L., GEBREYES W.A. & DEGRAVES F.J. Variation in daily shedding patterns of *Staphylococcus aureus* in naturally occurring intramammary infections. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 23, p. 1114–1122, 2011.

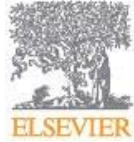
ZHANG, Y., WU, Q., ZHANG, J., YANG, X., Alteration in *Escherichia coli* and *Streptococcus faecalis* cells induced by ozone. **Journal of Food Science Technology**, v. 1, p. 106–112, 2016.

ZOBEL, R., MATINEC, R., IVANOVIC, D., ROSIC, N., STANCIC, Z., ZERKAVIC, I., FLAJSIG, B., PLAVEC, H., SMOLEC, O., Intrauterine ozone administration for improving fertility rate in Simmental cattle. **Veterinarski Arhiv**. v. 84, p. 1–8, 2014.

ZUCALI, M., BAVA, L., COLOMBINI, S., BRASCA, M., DECIMO, M., MORANDI, S., TAMBURINI, A., CROVETTO, G.M., Management practices and forage quality affecting the contamination of milk with anaerobic spore-forming bacteria. **Journal of Science Food Agricola**, v. 95, p. 1294–1302, 2015.

5. ANEXO A

Normas Revista Research in Veterinary Science



RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE

The Official Journal of the [Association for Veterinary Teaching and Research Work](#)



DESCRIPTION

Research in Veterinary Science is an International multi-disciplinary journal publishing original articles, reviews and short communications of a high scientific and ethical standard in all aspects of veterinary and biomedical research.

The primary aim of the journal is to inform veterinary and biomedical scientists of significant advances in veterinary and related research through prompt publication and dissemination. Secondly, the journal aims to provide a general multi-disciplinary forum for discussion and debate of news and issues concerning veterinary science. Thirdly, to promote the dissemination of knowledge to a broader range of professions, globally.

High quality papers on all species of animals are considered, particularly those considered to be of high scientific importance and originality, and with interdisciplinary interest. The journal encourages papers providing results that have clear implications for understanding disease pathogenesis and for the development of control measures or treatments, as well as those dealing with a comparative biomedical approach, which represents a substantial improvement to animal and human health.

Studies without a robust scientific hypothesis or that are preliminary, or of weak originality, as well as negative results, are not appropriate for the journal. Furthermore, observational approaches, case studies or field reports lacking an advancement in general knowledge do not fall within the scope of the journal.

GUIDE FOR AUTHORS

Research in Veterinary Science publishes original contributions and review articles on research concerning the health and disease of animals, including studies in comparative medicine.

Types of contribution

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Short Communications
3. Review articles
4. Letters to the Editor

5. Perspectives
6. Commentary
7. Editorial

Original research papers

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Short Communications

Short Communications should not exceed 1600 words and include no more than two tables or figures. They should have an abstract but no other divisions. Typescripts should be clearly marked Short Communication.

Review articles

Review articles on veterinary topics are invited for publication. They should give an update on recent advances in a particular field and be targeted at research veterinarians who are not necessarily working in the same field. The length should not exceed 4000 words.

Letters to the Editor

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors-in-Chief. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Perspectives

Perspectives should highlight topics focusing on recent developments in an area, with particular emphasis on those aspects that are of greatest interest and/or significance. Perspectives should be based mainly on a personal viewpoint so up to three authors are allowed. These submission must have fewer than 1200 words, one figure or table and no more than ten references. An abstract is not required.

Case Reports

Case reports should be up to 2500 words excluding references, 25 references, 4 tables and/or figures.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print *Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable) *Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests

to declare

- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information on Ethics in publishing.

Animal Welfare

Before papers describing animal studies are accepted for publication in Research in Veterinary Science, the authors must satisfy the editors that the work conformed to appropriate ethical standards. Whether or not a particular piece of work is accepted for publication will be decided by the editors whose decision will be final.

The authors should provide written assurances that: (i) The project underwent ethical review and was given approval by an institutional animal care and use committee or by appropriately qualified scientific and lay colleagues. (ii) The care and use of experimental animals complied with local animal welfare laws, guidelines and policies.

The editors expect authors to have adhered to the following general principles: (i) Alternative procedures that replace the use of animals should be used if possible. Where this is not possible, the animals used should be carefully selected to be the least sentient species possible and of an appropriate strain. (ii) The minimum number of animals should be used consistent with achieving the scientific objectives of the study. (iii) Pain and distress should be minimised by the use of humane endpoints, sedation, anaesthesia, analgesia and post-operative care. (iv) Access to veterinary care must be available at all times. (v) Investigators and personnel that care for and use animals must be trained and possess relevant expertise and training that should be updated regularly. (vi) If animals have to be killed, this should be done humanely according to local euthanasia regulations, such as the Home Office guidelines in the UK or guidelines of the American Veterinary Association Panel on Euthanasia.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author but copies should not be provided to the journal. Only if specifically requested by the journal in exceptional circumstances (for example if a legal issue arises) the author must provide copies of the consents or evidence that such consents have been obtained. For more information, please review the Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals. Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double anonymized) or the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this:

'Declarations of interest: none'. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

Declaration of generative AI in scientific writing

The below guidance only refers to the writing process, and not to the use of AI tools to analyse and draw insights from data as part of the research process.

Where authors use generative artificial intelligence (AI) and AI-assisted technologies in the writing process, authors should only use these technologies to improve readability and language. Applying the technology should be done with human oversight and control, and authors should carefully review and edit the result, as AI can generate authoritative-sounding output that can be incorrect, incomplete or biased. AI and AI-assisted technologies should not be listed as an author or co-author, or be cited as an author. Authorship implies responsibilities and tasks that can only be attributed to and performed by humans, as outlined in Elsevier's AI policy for authors.

Authors should disclose in their manuscript the use of AI and AI-assisted technologies in the writing process by following the instructions below. A statement will appear in the published work. Please note that authors are ultimately responsible and accountable for the contents of the work.

Disclosure instructions

Authors must disclose the use of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process by adding a statement at the end of their manuscript in the core manuscript file, before the References list. The statement should be placed in a new section entitled 'Declaration of Generative AI and AI-assisted technologies in the writing process'.

Statement: During the preparation of this work the author(s) used [NAME TOOL / SERVICE] in order to [REASON]. After using this tool/service, the author(s) reviewed and edited the content as needed and take(s) full responsibility for the content of the publication.

This declaration does not apply to the use of basic tools for checking grammar, spelling, references etc. If there is nothing to disclose, there is no need to add a statement.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify compliance, your article may be checked by Crossref Similarity Check and other originality or duplicate checking software.

Preprint posting on SSRN

In support of Open Science, this journal offers its authors a free preprint posting service.

Preprints provide early registration and dissemination of your research, which facilitates early citations and collaboration.

During submission to Editorial Manager, you can choose to release your manuscript publicly as a preprint on the preprint server SSRN once it enters peer-review with the journal. Your choice will have no effect on the editorial process or outcome with the journal. Please note that the corresponding author is expected to seek approval from all co-authors before agreeing to release the manuscript publicly on SSRN.

You will be notified via email when your preprint is posted online and a Digital Object Identifier (DOI) is assigned. Your preprint will remain globally available free to read whether the journal accepts or rejects your manuscript.

For more information about posting to SSRN, please consult the SSRN Terms of Use and FAQs.

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Reporting sex- and gender-based analyses

Reporting guidance

For research involving or pertaining to humans, animals or eukaryotic cells, investigators should integrate sex and gender-based analyses (SGBA) into their research design according to funder/ sponsor requirements and best practices within a field. Authors should address the sex and/or gender dimensions of their research in their article. In cases where they cannot, they should discuss this as a limitation to their research's generalizability. Importantly, authors should explicitly state what definitions of sex and/or gender they are applying to enhance the precision, rigor and reproducibility of their research and to avoid ambiguity or conflation of terms and the constructs to which they refer (see Definitions section below). Authors can refer to the Sex and Gender Equity in Research (SAGER) guidelines and the SAGER guidelines checklist. These offer systematic approaches to the use and editorial review of sex and gender information in study design, data analysis, outcome reporting and research interpretation - however, please note there is no single, universally agreed-upon set of guidelines for defining sex and gender.

Definitions

Sex generally refers to a set of biological attributes that are associated with physical and physiological features (e.g., chromosomal genotype, hormonal levels, internal and external anatomy). A binary sex categorization (male/female) is usually designated at birth ("sex assigned at birth"), most often based solely on the visible external anatomy of a newborn. Gender

generally refers to socially constructed roles, behaviors, and identities of women, men and gender-diverse people that occur in a historical and cultural context and may vary across societies and over time. Gender influences how people view themselves and each other, how they behave and interact and how power is distributed in society. Sex and gender are often incorrectly portrayed as binary (female/male or woman/man) and unchanging whereas these constructs actually exist along a spectrum and include additional sex categorizations and gender identities such as people who are intersex/have differences of sex development (DSD) or identify as non-binary. Moreover, the terms "sex" and "gender" can be ambiguous—thus it is important for authors to define the manner in which they are used. In addition to this definition guidance and the SAGER guidelines, the resources on this page offer further insight around sex and gender in research studies.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**:

(a) the reason

for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service to find the best home for your manuscript. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated Scientific Managing Editor, a tool assisted recommendation, or a combination. If you agree, your manuscript will be transferred, though you will have the opportunity to make changes to the manuscript before the submission is complete. Please note that your manuscript will be independently reviewed by the new journal. More information.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement, it is recommended to state this.

Open access

Please visit our Open Access page for more information.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the Language Editing service available from Elsevier's Language Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Authors are requested to suggest the names of up to 5 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission. Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees.

For queries concerning the submission process or journal procedures please visit the Elsevier Support Center. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Submit your article

Please submit your article via <https://www.editorialmanager.com/rvsc/default.aspx>.

PREPARATION***Queries***

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our Support Center.

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. More information on types of peer review.

Use of Word Processing Software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face,

italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required separate file submissions. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the

novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the example Highlights.

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Abstract, self-contained and embodying the main conclusions. It should note the relevance to veterinary science as well as the aims and objectives of the work. Sentences such as 'the results are discussed', which merely describe the paper, are not allowed.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviation and symbols

Authors are asked to explain each scientific abbreviation at its first occurrence in their papers; for example, complement fixation test (CFT). The policy of the journal with respect to units and symbols is that SI (System International) symbols should be used.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or

other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature

1. Authors and Editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature. Virologists should consult the latest Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses for proper nomenclature and spelling.
2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the official recommendations of the IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature should be followed.

Formulae

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.
2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.
3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.
4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.
5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca²⁺, not as Ca⁺⁺.
6. Isotope numbers should precede the symbols, e.g. ¹⁸O.
7. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the endproduct of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P₂O₅).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information in normal text.
2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

Artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.

- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available.

1. You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
 - Supply files that are too low in resolution;
 - Submit graphics that are disproportionately large for the content.
 - Embed illustrations within the manuscript file.

1. All illustrations (line drawings and photographs) must be submitted as separate files.
2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.
4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible, any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.
5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
6. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
7. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will**

receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Please ensure each table is submitted as a separate file. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Please ensure each table is submitted as a separate file. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Manuscript Formatting

Manuscripts should have **numbered lines**, with wide margins and **double spacing**, throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscripts, including the title page, references, tables, etc., should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

References

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which

citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

Text: All citations in the text should refer to:

2. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
3. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
4. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown '

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Foster, N., Berndt, A., Lalmanach, A.C., Methner, U., Pasquali, P., Rychlik, I., Velge, P., Zhou, X., Barrow, P., 2012. Emergency and therapeutic vaccination—is stimulating innate immunity an option? *Res. Vet. Sci.* 93, 7–12.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

For reference style 2 Harvard: [dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refer to the results of observations or experimentation that validate research findings, which may also include software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research

materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Research Elements

This journal enables you to publish research objects related to your original research – such as data, methods, protocols, software and hardware – as an additional paper in a Research Elements journal.

Research Elements is a suite of peer-reviewed, open access journals which make your research objects findable, accessible and reusable. Articles place research objects into context by providing detailed descriptions of objects and their application, and linking to the associated original research articles. Research Elements articles can be prepared by you, or by one of your collaborators.

During submission, you will be alerted to the opportunity to prepare and submit a manuscript to one of the Research Elements journals.

More information can be found on the Research Elements page.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative

methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Additional information

Authors can also keep track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track your accepted article" option on the journal's homepage <https://www.elsevier.com/locate/rvsc> For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.