

VITOR RAFAEL RODRIGUES JACINTO

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DE MASTITES BOVINAS
NUMA EXPLORAÇÃO LEITEIRA AFETADA POR
PROTOTHECA SPP.**

Orientadora: Professora Doutora Ângela Dâmaso

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa
2021**

VITOR RAFAEL RODRIGUES JACINTO

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DE MASTITES BOVINAS
NUMA EXPLORAÇÃO LEITEIRA AFETADA POR
PROTOTHECA SPP.**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 22 de janeiro de 2021, com o despacho Reitoral nº 04/2021, com a seguinte composição de júri:

Presidente: Professora Doutora Margarida Alves

Arguente: Professor Doutor Luís Pinho

Orientadora: Professora Doutora Ângela Dâmaso

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária**

Lisboa

2021

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação de mestrado só me foi possível por ter tido o privilégio de ser acompanhado por pessoas que me ajudaram direta ou indiretamente, sem elas não conseguiria alcançar este propósito não fossem as pessoas que estiveram sempre presentes e me reconfortaram incessantemente. A todas, um sincero obrigado.

Deixo um especial agradecimento,

À minha Orientadora Professora Doutora Ângela, por me ter acompanhado e orientado neste meu percurso, por toda a disponibilidade e pela gentileza demonstrada e por toda a partilha de conhecimento que me orientou ao longo deste meu percurso.

À Doutora Ema Roque, com quem tive a oportunidade de conhecer no meu estágio e que sempre se mostrou disponível para ensinar e partilhar o seu conhecimento, tornando-se assim importante para a realização do presente estudo, um muito obrigada pela compreensão e amizade.

Ao Professor Doutor Pedro Lima, por toda a ajuda, disponibilidade pela transmissão de ensinamentos que me transmitiu durante os seis meses de estágio.

Aos responsáveis da exploração de leite que tão bem me acolheram durante os seis meses de estágio e pela disponibilização de todos os dados que permitiram a realização deste estudo.

A todos os meus familiares, mas em especial ao meu Pai e à minha Mãe, porque foram eles quem, ao longo da minha vida, sempre estiveram presentes, incondicionalmente, em todas as minhas escolhas, demonstrando compreensão e um eterno amor.

À minha namorada Michelle, por toda a paciência, pelo companheirismo, pela compreensão e pelo carinho constante.

A todos os meus amigos, por todos os momentos partilhados, pela amizade e por se mostrarem sempre disponíveis para me ouvirem falar repetidamente sobre o mesmo assunto inúmeras vezes.

A todos os meus colegas de curso pelo companheirismo e amizade.

E a todos aqueles que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para este meu percurso.

Os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Prototheca spp. é um género de algas com capacidade de causar mastite aguda ou crónica incurável em vacas leiteiras. O objetivo deste estudo foi estudar a ocorrência de mastite subclínica e calcular a prevalência anual da *Prototheca* spp. numa exploração e a sua relação com o trimestre anual, quarto mamário afetado e número de lactações. Foram recolhidas amostras de leite em 245 vacas com elevada contagem de células somáticas, num total de 414 quartos, e feitas culturas bacterianas para identificação do agente etiológico da infecção intramamária. O estudo decorreu entre janeiro e dezembro de 2019.

A prevalência anual de mastite subclínica no efetivo foi de 44 % em 2019. *Prototheca* spp. foi o agente causador de 29% das mastites nos quartos analisados.

Streptococcus agalactiae foi o agente com maior prevalência no primeiro trimestre de 2019, enquanto que nos restantes trimestres do ano, o agente com maior prevalência foi *Prototheca* spp. Estes resultados são comprovados estatisticamente uma vez que se verificou uma relação estatisticamente significativa entre os agentes e o trimestre do ano ($F=94.91$; $p<0.05$). Em grupos de lactação verificou-se que o grupo de vacas com uma lactação que apresentou uma maior prevalência foi *Streptococcus uberis* foi o agente com maior prevalência nas mastites de vacas de primeira lactação, com 18.9% ($n=14$) dos casos, enquanto que *Prototheca* spp. foi o agente que mais afetou vacas na segunda lactação 36.3%, ($n=61$), na terceira (24.2%, $n=29$) e na quarta ou lactações posteriores (46.2%, $n=24$). Verificou-se uma relação estatisticamente significativa entre o agente infeccioso e o número de lactações ($F=116,35$; $p<0.05$).

Quando analisada a ocorrência de mastite, verificou-se que *Prototheca* spp. é o agente com maior prevalência em todos os quartos mamários. Em todos quartos mamários foi observada uma maior prevalência de agentes ambientais, no entanto estes resultados não foram estatisticamente significativos ($p=0,354$).

Este estudo conclui que a prevalência de mastite subclínica por agentes ambientais nesta exploração é alta, que *Prototheca* spp. foi durante 2019 a causa mais prevalente desta afeção e que esta prevalência foi mais significativa entre Abril e Dezembro de 2019 e entre as vacas com duas ou mais lactações.

Palavras-chave: bovinos leiteiros, mastite, *Prototheca* spp, prevalência.

ABSTRACT

Prototheca spp. is a genus of algae capable of causing acute or chronic incurable mastitis in dairy cows. The purpose of this study is to study the occurrence of mastitis and calculate the annual prevalence of *Prototheca spp.* on the farm and the relationship with the annual trimester, affected mammary quarter and number of lactations. Milk samples were collected from 245 cows with a high somatic cell count, in a total of 414 quarters, and bacterial cultures were made to identify the etiologic agent of intramammary infection. The study ran between January and December 2019.

The annual prevalence of mastitis in the herd was 44% in 2019. *Prototheca* was the causative agent of 29% of mastitis in the analyzed quarters.

Only in the first quarter of 2019 the agent with the highest prevalence was *Streptococcus agalactiae* while in the remaining quarters of the year, the agent with the highest prevalence was algae of the genus *Prototheca spp.* These results are proven statistically since there was a statistically significant relationship between the agents and the quarter of the year ($F = 94.91$; $p < 0.05$).

In lactation groups it was found that the group of cows with a lactation that had a higher prevalence was *Streptococcus uberis* was the agent with the highest prevalence in mastitis of first lactation cows, with 18.9% ($n = 14$) of the cases, whereas *Prototheca spp.* was the agent that most affected cows in the second lactation (36.3%, $n = 61$), in the third (24.2%, $n = 29$) and in the fourth or later lactations (46.2%, $n = 24$). There was a statistically significant relationship between the infectious agent and the number of lactations ($F = 116.35$; $p < 0.05$). ($F = 116.35$; $p < 0.05$).

When analyzing the occurrence of mastitis, it was found that *Prototheca spp.* is the agent with the highest prevalence in all quarters. In all quarters, a higher prevalence of environmental agents was observed, however these results were not statistically significant ($p = 0.354$).

This study concludes that the prevalence of subclinical mastitis by environmental agents on this farm is high, that *Prototheca spp.* was the most prevalent cause of this condition during 2019 and that this prevalence was more significant between April and December 2019 and among cows with two or more lactations .

Keywords: dairy cattle, mastitis, *Prototheca spp.*, prevalence.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IIIMs – Infecções Intramamárias

IIM – Infecção Intramamária

spp. – Espécies

CCS – Contagem de células somáticas

CS – Células somáticas

WST – Teste Whiteside

WMT – Teste de Mastite de Wisconsin

TCM – Teste Californiano de Mastites

SCN – Staphylococcus coagulase negativo

PCR – Polymerase Chain Reactio

FNAC – Citologia aspirativa por agulha fina

OE – Óleos essenciais

Ig – Imunoglobulina

IL 8 – Interleucina 8

NAGase - N-Acetil- β -D-Glucosaminidase

°C – Grau Celsius

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABELAS	8
ÍNDICE DE GRÁFICOS	9
1. CASUÍSTICA DE ESTÁGIO	10
2. INTRODUÇÃO	11
3. MASTITE BOVINA	12
3.1. Classificação das Mastites	13
3.1.2. Subclínicas <i>versus</i> Clínicas	13
3.2. Fatores De Risco	15
3.2.1. Fatores Individuais	15
3.2.2. Fatores Ambientais e Maneio	16
3.3. Agentes etiológicos de Mastites	17
3.3.1. Classificação dos agentes etiológicos	17
3.3.2. Mastites por Agentes ambientais e seu Controle	17
3.3.2.1. <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	19
3.3.2.2. <i>Streptococcus uberis</i>	20
3.3.2.3. Coliformes	21
3.3.2.3.1. <i>Escherichia coli</i>	22
3.3.2.3.2. <i>Klebsiella</i> spp.	23
3.3.2.4. <i>Serratia</i> spp.	24
3.3.2.5. <i>Pseudomonas</i> spp.	24
3.3.3. Mastites por Agentes Contagiosos	25
3.3.3.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	26
3.3.3.3. <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos (SCN)	27
3.3.3.3. <i>Streptococcus agalactiae</i>	28
3.3.3.4. <i>Corynebacterium bovis</i>	29
3.3.3.5. <i>Mycoplasma</i> spp.	30
3.4. Detecção e Diagnóstico de Mastites	32

3.4.1. Sinais Clínicos	32
3.4.2. Contagem de Células Somáticas (Contraste leiteiro)	33
3.4.3. Teste Californiano de Mastites	34
3.4.4. Teste de NAGase	35
3.4.5. Teste Whiteside	35
3.4.6. Teste de Mastite de Wisconsin	36
3.4.7. Cultura Microbiológica	37
3.4.8. Teste da Condutividade Elétrica	37
3.5. <i>Prototheca spp.</i>	39
3.5.1. História da Taxonomia	39
3.5.2. Epidemiologia	40
3.5.3. Patogénese e Sinais Clínicos	41
3.5.4. Diagnóstico	42
3.5.5. Tratamento	45
3.5.6. Controlo e Prevenção	48
4. MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1. Caracterização da Exploração	51
4.1.1. Protocolos de ordenha	52
4.1.2. Identificação dos animais com mastite subclínica e colheita de amostras de leite	53
4.1.3. Cultivo e isolamento	53
4.1.4. Parâmetros em estudo	54
4.1.5. Análise Estatística	56
5. RESULTADOS	57
5.1. Prevalência e incidência de mastite	57
5.2. Agentes e número de lactações	60
5.3. Prevalência e tipo de teto	62
5.4. Ocorrência de <i>Prototheca spp.</i>	64
5.4.1. Trimestre Anual	64
5.4.2. Número de Lactação	64
5.4.3. Prevalência e tipo de teto	65
6. DISCUSSÃO	66
7. CONCLUSÃO	70
8. BIBLIOGRAFIA	71
9. APÊNDICES	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Crescimento de algas <i>Prototheca zopfii</i> em placa de ágar Sabouraud dextrose após 96 horas de incubação a 28 ° C	42
Figura 2 - Visualização microscópica de algas <i>Prototheca</i> spp. através de microscopia de luz (MB 40x)	42
Figura 3 - Células de <i>Prototheca zopfii</i> na parede epitelial do alvéolo mamário e no espaço interalveolar	43
Figura 4 - Micrografias eletrônicas por varredura de células do genótipo II (A) e II (B) de <i>Prototheca zopfii</i> . Indicando a diferença no tamanho e forma esporangiais dos genótipos I e II	43

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 1– Relação entre o resultado do TCM e a CCS e como interpretá-los.</i>	34
<i>Tabela 2- Correlação de resultados no WMT com valores de CCS.</i>	36
<i>Tabela 3- Diâmetros médios observados nos testes de sensibilidade a antibacterianos de <i>Prototheca zopfii</i> isolados.</i>	46
<i>Tabela 4 - Frequência trimestral de quartos analisados com mastites no ano 2019.</i>	57
<i>Tabela 5 - Frequência relativa de mastites subclínicas por mês no ano 2019, em 414 quartos testados (N=2200).</i>	57
<i>Tabela 6- Frequência trimestral de quartos analisados com mastite por agente.</i>	59
<i>Tabela 7– Frequência de agentes detetados nos quartos afetados por número de lactação da vaca.</i>	61
<i>Tabela 8 - Valores absolutos e relativos de agentes detetados por grupo de quarto mamário.</i>	62
<i>Tabela 9 - Frequências relativas e absolutas de mastites ambientais e contagiosas nos grupos de quartos anteriores e posteriores.</i>	63

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição percentual das áreas atendidas durante o período de estágio.	10
Gráfico 2 - Frequência relativa de isolamento por quarto mamário dos agentes etiológicos de mastite durante o período do estudo (ano 2019).	58
Gráfico 3 - Distribuição frequência de casos de mastite por agente ambientais e contagiosos. por trimestre durante o ano 2019 ($n=414$).	60
Gráfico 4 - Distribuição do número total de casos de mastite (verde) e número de casos de mastite por <i>Prototheca</i> spp. (Azul) por trimestre durante o ano 2019.	60
Gráfico 5 - Distribuição da frequência absoluta e frequência relativa de quartos mamários positivos para <i>Prototheca</i> spp. (azul) entre os restantes agentes etiológicos (verde) e grupos de lactação ($p\text{-value} < 0.05$).	62
Gráfico 6 - Distribuição da proporção dos casos de <i>Prototheca</i> spp. (azul) entre os restantes agentes etiológicos (verde) e tipo de quarto afetado ($p\text{-value} > 0.05$).	63
Gráfico 7 - Distribuição da frequência absoluta e frequência relativa de quartos mamários positivos por <i>Prototheca</i> spp. por trimestre durante o ano 2019 ($n=118$)	65
Gráfico 8 - Distribuição do número casos de mastite por <i>Prototheca</i> spp. por Grupo de lactação durante o ano 2019 ($n=118$).	65
Gráfico 9 - Distribuição do número de casos de mastite por <i>Prototheca</i> spp. por quarto afetado durante o ano 2019 ($N=118$).	66

1. CASUÍSTICA DE ESTÁGIO

O estágio curricular para conclusão do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (ULHT) teve lugar numa exploração leiteira de bovinos sob orientação do Dr. Pedro Lima. Este período de estágio teve uma duração de 6 meses, com início a 2 de Setembro e terminando a 4 de Fevereiro.

Tinha como objetivo aprofundar conhecimentos nas diversas áreas de estudo numa exploração leiteira.

Ao longo deste período, além de acompanhar o Dr. Pedro Lima principalmente em serviços de manejo reprodutivo, tive oportunidade de acompanhar vários profissionais de diversas áreas de especialidade, através de serviços prestados na exploração como: área da qualidade do leite, podologia, bem estar animal, neonatologia, sanidade, urgência e nutrição. As atividades realizadas estão discriminadas nos apêndices 1 e 2.

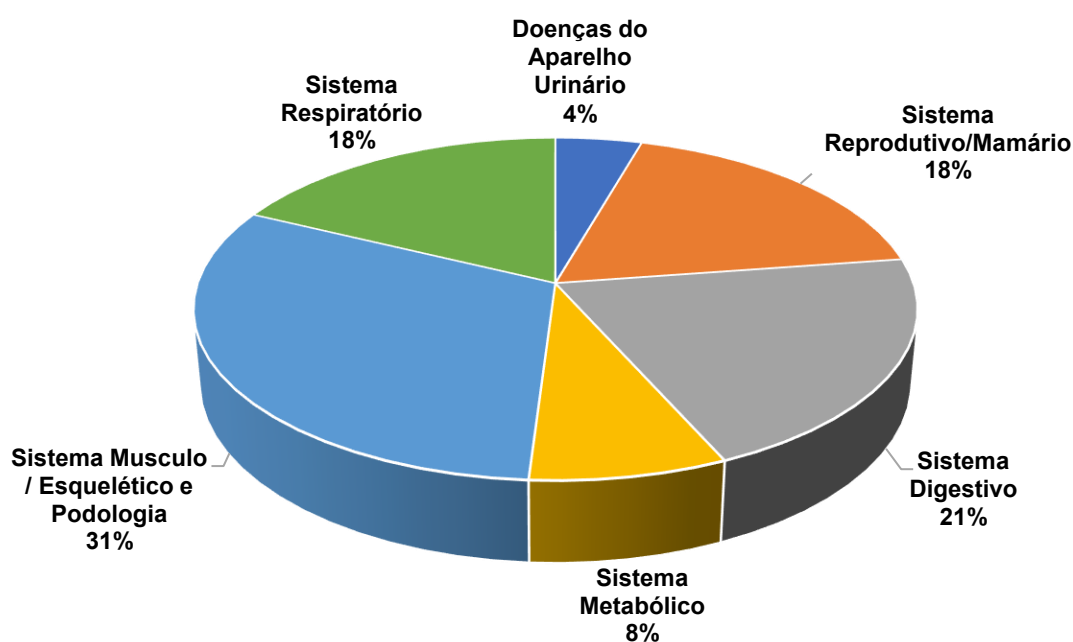


Gráfico 1 - Distribuição percentual das áreas atendidas durante o período de estágio.

2. INTRODUÇÃO

Mastite é o termo que descreve a ocorrência de inflamação da glândula mamária, é uma das doenças mais comuns em efetivos bovinos leiteiros e a principal causa de diminuição da produção leiteira numa exploração.

Trata-se de uma doença complexa e de carácter multifatorial, na qual é importante identificar os fatores de risco para a sua ocorrência em cada exploração, para que se possa seguir um plano de controlo e profilático direcionado aos agentes mais prevalentes.

A mastite é considerada ainda a doença com maior impacto económico na produção leiteira uma vez que é responsável pela diminuição da produção, redução da qualidade do leite, refugo precoce de vacas lactantes e aumento dos custos associados à assistência veterinária.

Entre os vários agentes com potencial patogénico para causar mastite encontra-se a *Prototheca spp.*, uma alga unicelular incolor considerada como agente oportunista rara, com capacidade de causar doença em qualquer animal e que nas vacas pode resultar no desenvolvimento de mastite subclínica ou clínica na forma aguda ou crónica. Tem potencial zoonótico apesar de a ocorrência de prototecose humana ser rara. A *Prototheca spp.* está presente em várias localizações geográficas no globo, sendo encontrada com grande frequência em ambientes com alta humidade e presença de matéria orgânica.

Esta alga tem grande importância económica por causar infeção persistente e não ter cura, podendo causar um enorme aumento da concentração de células somáticas, que pode ser intermitente, mascarando muitas vezes a infeção. A ênfase no combate a esta doença deve ser colocado na identificação dos fatores de risco e implementação de estratégias de prevenção e controlo nas explorações leiteiras afetadas.

O presente estudo procura estudar a ocorrência deste agente patogénico e a sua relação com os outros agentes de mastite no efetivo, identificar alguns fatores de risco presentes na exploração e tentar trazer mais informação sobre este problema pouco reportado na literatura portuguesa.

3. MASTITE BOVINA

A mastite ou mamite é a inflamação da glândula mamária que se caracteriza por apresentar alterações patológicas no tecido glandular e uma série de modificações físico-químicas no leite, de natureza multifatorial e complexa (Bradley & Green, 2005).

A maioria das alterações importantes do leite incluem a descoloração, a presença de coágulos e de um grande número de leucócitos. Pode haver calor, dor, rubor, tumefação e edema na glândula mamária em muitos casos clínicos. No entanto, um grande número de mastites não é facilmente detetável por palpação manual ou por meio de exame visual do leite. Estas mastites são classificadas como mastites subclínicas. Por causa do grande número de casos subclínicos, o diagnóstico de mastite depende em grande parte de testes indiretos, que dependem, por sua vez, da concentração de células somáticas ou concentração de íons como sódio, potássio e o cloreto através do cálculo da condutividade elétrica no leite (Zafalon et al., 2005; Hogan & Smith, 2012).

As células somáticas do leite são compostas principalmente por leucócitos, compreendendo macrófagos, células polimorfonucleares (neutrófilos) e linfócitos o tipo de célula predominante, além de uma baixa percentagem de células epiteliais (Talukder & Ahmed, 2017). A variação de CCS pode ser influenciada por alguns fatores como número de lactações, período de lactação, estação do ano, no entanto o principal fator responsável pelo seu aumento é a presença de uma inflamação na glândula mamária (Bradley & Green, 2005). Normalmente, no leite de uma glândula mamária saudável, a CCS é inferior a 1×10^5 células / ml, com uma concentração de neutrófilos (<11%), macrófagos (66% - 88%), linfócitos (10% - 27%) e de células epiteliais (0 % - 7%). No caso de leite com origem numa glândula com mastite a CCS pode estar acima de 1×10^6 células / ml, e os neutrófilos são o tipo de célula predominantemente, representando mais de 90% dos leucócitos totais (Sharma et al., 2011; Constable et al., 2017).

Parece, assim, razoável definir a mastite como uma doença caracterizada pela presença de um aumento significativo da concentração de células somáticas no leite das glândulas afetadas. O aumento da concentração das células somáticas é, em quase todos os casos, causado por um aumento da concentração dos neutrófilos, derivado de uma reação no tecido glandular lesionado.

Na maior parte das vezes esta inflamação é causada por organismos patogénicos que são principalmente de origem bacteriana, mas também podem incluir leveduras, fungos e algas (Smith, 2015). Com menor frequência, advém de traumas

provocados por agentes químicos, físicos, mecânicos ou térmicos, ou ainda devido a problemas metabólicos (Bradley & Green, 2005).

A presença de mastite é uma das principais causas de diminuição da produção leiteira devido à alteração da capacidade funcional das células epiteliais da glândula mamária responsáveis pela secreção do leite (Erskine, 2016b).

À semelhança das infeções que ocorrem noutros tecidos, a mastite começa com a invasão de um agente patogénico, seguida por um breve período latente e em seguida, a progressão para estados subclínicos ou clínicos ou resolução da infeção como resultado da resposta imune da vaca (Smith, 2015).

A forma mais comum de infeção é por via ascendente através de máquinas de ordenha infetadas ou do ambiente, devido a fracas medidas de higiene e sanidade na exploração, com exceção das infeções causadas pelos microrganismos *Mycoplasma* spp, que podem disseminar-se no efetivo leiteiro por transmissão de aerossol e invadir o úbere após a bacteriémia (Erskine, 2016a).

Lesões provocadas pela máquina de ordenha, hiperqueratose secundária do epitélio e excessiva dilatação do canal do teto devido a administrações medicamentosas intramamárias, são exemplos de traumatismos físicos. Estas lesões podem predispor a infeções secundárias por microrganismos (Teixeira *et al.*, 2008).

3.1. Classificação das Mastites

3.1.1. Subclínicas versus Clínicas

As infeções intramamárias (IIMs) são frequentemente apresentadas como mastite subclínica ou clínica. A mastite subclínica caracteriza-se pela presença de infeção sem sinais aparentes de inflamação local ou envolvimento sistémico. Embora possam aparecer episódios transitórios de leite anormal, a mastite subclínica é, na sua maior parte, assintomática (Bexiga *et al.*, 2005).

Por definição, o leite obtido da glândula mamária de vacas com mastite subclínica parece normal, mas contém um número anormal de células somáticas com ou sem a presença detetável de agentes causadoras de mastite (Smith, 2015).

Por outro lado, a mastite clínica evidencia-se pela presença de sinais clínicos notórios. Frequentemente, o leite e os úberes estão visivelmente alterados facilitando o seu diagnóstico num exame físico. Posto isto, a presença de alterações físicas e químicas do leite como a variação de cor, a presença de coágulos e o aumento do número de leucócitos, juntamente com a presença de tumefação, calor, dor e edema do

úbere são sinais sugestivos de mastite clínica, a qual, dependendo da sua intensidade, pode levar ao surgimento de sinais sistêmicos como febre ou até mesmo perda de apetite (Smith, 2015).

Uma vez que na mastite subclínica a infecção do úbere não evidencia sinais externos, estas são identificadas pelo aumento do número de células somáticas detetado através testes como o Teste Californiano de Mastite (TCM), entre outros (Teixeira et al., 2008).

A duração da fase subclínica de IIMs irá variar dependendo da etiologia. Na maioria das explorações há maior incidência de mastite subclínica causada por bactérias Gram-positivas do que por Gram-negativas. Normalmente, bactérias oportunistas Gram-negativos como *Escherichia coli* têm uma fase subclínica mais curta do que bactérias Gram-positivas como *S. aureus* ou a maioria dos IIMs causados por *Streptococcus* spp. Em geral, cerca de 25% a 35% das vacas que apresentam mastite subclínica crônica causada por agentes gram-positivos podem eventualmente exibir sintomas clínicos (Smith, 2015).

3.1.2. Aguda versus Crônica

As mastites são também designadas por agudas ou crônicas, dependendo da sua duração e prevalência no animal (Teixeira et al., 2008).

O surgimento súbito de sinais clínicos, normalmente com contornos mais exuberantes, dita a sua classificação como aguda. Este tipo de mastite provoca no animal a recusa do alimento, dor, dificuldade em levantar-se e desidratação. Podem surgir abscessos no úbere e em último caso, morte. O leite apresenta-se aquoso e de cor alterada (Teixeira et al., 2008).

Por outro lado, a mastite crônica caracteriza-se por ser um processo inflamatório persistente e sem exibição de sinais clínicos num longo período de tempo, a qual resulta no desenvolvimento progressivo de tecido fibroso, resultante de tecido necrótico e cicatricial aglomerado, característico de infecções crônicas por *St. aureus* (Nielsen, 2009). Se a infecção persistir por, pelo menos, dois meses, a infecção é considerada crônica (Erskine, 2016a).

3.2. Fatores De Risco

3.2.1. Fatores Individuais

Ao longo de décadas foi feita uma seleção genética intensiva de modo a aumentar a produção leiteira destes animais. Consequentemente aumentou a suscetibilidade de inflamação da glândula mamária, sendo a sua conformação uma característica altamente transmitida entre gerações. Características individuais do úbere, como a sua profundidade em relação ao jarrete, podem resultar num fator de risco, pois no caso de um úbere profundo os tetos encontram-se mais próximos do chão, o que pode constituir um reservatório ambiental de agentes patogénicos (Coentrão et al., 2008).

A maior parte das novas infeções por agentes ambientais ocorrem durante o período seco e no início da lactação. No entanto, as novilhas são mais suscetíveis à mastite no final da gestação, o que está provavelmente associado ao rápido desenvolvimento do úbere (Constable et al., 2017). Esta prevalência de mastite ambiental no período seco pode ser explicada, por exemplo, com as alterações pelas quais o úbere passa com a involução da glândula mamária antes do parto, que podem alterar as defesas naturais do teto, tais como a perda do tampão de queratina por abertura prematura do canal do teto (De Vliegher et al., 2012). Nesta fase há também uma secreção contínua de leite quando a vaca deixa de ser ordenhada, resultando no aumento da pressão interna do úbere e consequentemente dilatação natural do canal do teto facilitando a entrada de agentes na glândula mamária (Constable et al., 2017). Pode ainda existir igualmente uma maior incidência de mastites nos animais que libertam o leite entre ordenhas, pois estes animais mantêm o canal do teto aberto durante mais tempo, facilitando a entrada de microrganismos ambientais para a cisterna do teto (De Vliegher et al., 2012).

Além disto, a incidência de distúrbios reprodutivos, como distócia, hipocalcémia, retenção de placenta, metrite, piómetra e nascimentos de gémeos, foi positivamente associada com a alta prevalência de mastite. Esta situação, verifica-se devido à imunossupressão instalada em vacas com um período peri-parto prolongado. Associado à ausência de ordenha e perda do tampão de queratina no canal do teto criam fatores ideais para contaminação e instalação de agentes patogénicos na glândula mamária (De Vliegher et al., 2012). Outros distúrbios como cetose e claudicação, também são conhecidos por aumentar o risco de mastite clínica (Nielsen, 2009).

Vários estudos indicam que certas raças estão mais predispostas a mastite (Nielsen, 2009). Entre as várias raças com maior aptidão na produção leiteira, a raça Holstein-Friesian é aquela com maior risco de incidência de mastite (De Vliegher et al., 2012).

3.2.2. Fatores Ambientais e Maneio

As explorações devem cumprir uma série de requisitos para que seja respeitado o espaço individual de cada animal, favorecendo o seu bem-estar e, ao mesmo tempo, diminuir o grau de conspurcação do ambiente (Smith, 2014). Em situações de superlotação há maior exposição do canal do teto a agentes patogénicos ambientais (Constable *et al.*, 2017).

A má ventilação dos espaços, em conjunto com a humidade elevada e camas com acumulação de material orgânico, permitem o crescimento de agentes patogénicos e com isso aumentar a probabilidade de o animal desenvolver mastite (Smith, 2014). Manter um ambiente limpo e confortável numa exploração é de extrema importância, uma vez que a incidência de mastites está diretamente relacionada com o grau de contaminação do teto (Blowey & Edmondson, 2010).

A sala de ordenha e atividades realizadas no maneio dos animais antes, durante e depois da ordenha, também são fatores predisponentes para a mastite num efetivo. A máquina da ordenha deve ser sujeita a manutenção periódica para ser eficiente, de maneira a não deixar o leite residual e/ou não causar movimentação do leite entre tetinas, que consequentemente irá impulsionar os microrganismos para o interior da cisterna da glândula mamária (Constable *et al.*, 2017). Uma ordenha excessiva e uma força de vácuo não regulada podem provocar lesões no teto que funcionarão também como portas de entrada para os agentes patogénicos (Wilson et al., 2000).

Falhas em protocolos de higienização e desinfeção são importantes potenciadores na transmissão de agentes patogénicos entre animais, aumentando a incidência e prevalência de infeções intramamárias (Coentrão et al., 2008). É aconselhado mergulhar o teto em soluções antissépticas pré-*dipping* (higienização e desinfeção dos tetos antes da ordenha para o controlo de agentes ambientais de mastite), tal como em soluções desinfetantes pós-*dipping* (imediatamente após a ordenha estar concluída para o controlo de agentes contagiosos). No entanto, caso a concentração destas soluções não seja a correta, pode causar irritação local da pele, favorecendo o desenvolvimento de microrganismos (Picoli et al., 2014). A separação de

animais com mastites é imprescindível para reduzir a transmissão de agentes contagiosos, e estes devem ser ordenhados depois de todo o efetivo (Coentrão et al., 2008).

Outro fator importante é evitar que o animal se deite após a ordenha, de forma a que o esfíncter do teto tenha tempo de encerrar totalmente, o que tem uma duração de cerca de 20 minutos, caso contrário torna-se uma porta de entrada para a colonização do canal do teto por bactérias ambientais. Este risco é contornado através da disponibilização de alimento fresco logo após a ordenha (Constable *et al.*, 2017).

3.3. Agentes etiológicos de Mastites

3.3.1. Classificação dos agentes etiológicos

Apesar de existirem fungos, algas e vírus que possam provocar mastites, os microrganismos predominantes são de origem bacteriana existindo mais de 200 microrganismos diferentes capazes de infectar a glândula mamária (Teixeira *et al.*, 2008).

As mastites de origem bacteriana podem ser classificadas em dois tipos, tendo em consideração o agente etiológico presente: **mastites contagiosas** e **mastites de origem ambiental** (Constable *et al.*, 2017). Esta divisão envolve a epidemiologia dos agentes, considerando principalmente as superfícies/locais onde os agentes etiológicos podem ser isolados e a forma como estes se transmitem de vaca para vaca ou o modo como infectam o animal, descritos de seguida.

3.3.2. Mastites por Agentes ambientais e seu Controlo

Os agentes ambientais são aqueles que em condições normais não colonizam a glândula mamária, mas podem fazê-lo quando o ambiente, a máquina de ordenha ou úbere estão contaminados e oferecem condições de colonização. Estas condições permitem que estes agentes tenham acesso ao canal do teto e ascendam à cisterna da glândula provocando a mastite (Blowey & Edmondson, 2010).

A infeção por organismos desta classe advém quase sempre de uma deficiência tanto no manuseio da exploração, como da sala de ordenha (Constable *et al.*, 2017).

A transmissão ocorre quando os tetos são expostos a bactérias encontradas em fontes ambientais, como material fecal, cama, solo e água contaminada. A contaminação da pele do teto com agentes patogénicos ambientais aumenta a probabilidade de IIM, especialmente quando os mecanismos de defesa, por exemplo, a permeabilidade do esfíncter do teto, estão comprometidos (Smith, 2015).

Infeções intramamárias com agentes patogénicos ambientais também podem ocorrer quando os tetos são insuficientemente desinfetados antes de uma infusão de antibióticos, ou quando a própria preparação de infusão ou a cânula é usada estão contaminadas (Smith, 2015). Uma vez estabelecida a infeção num quarto da glândula mamária, a transmissão para outros quartos não infetados pode ocorrer.

As mastites ambientais ocorrem essencialmente no período seco, época do parto e início da lactação. As estratégias de controlo de mastite baseiam-se na redução da exposição a agentes ambientais com uma melhoria da higiene das vacas, tanto nas áreas de alojamento, como no processo de ordenha (Constable *et al.*, 2017). Para prevenir este tipo de infeção, é essencial realizar uma terapia de secagem entre 60 a 35 dias antes do parto, com administração intramamária de antibióticos em cada um dos quartos (tratar infeções existentes e prevenir novas infeções) e administração de um selante no canal do teto de modo a impedir a entrada de microrganismos na glândula mamária. É igualmente importante aplicar uma atenção especial à higiene e fatores de stress na fase final do período seco e no início da lactação que possam aumentar a predisposição a infeções, incluindo estados de hipercetonémia (Blowey & Edmondson, 2010).

Os organismos coliformes são uma causa comum de mastite clínica. Casos clínicos de infeção por coliformes são geralmente encontrados em níveis baixos na maioria dos efetivos e não costumam resultar em infeções crónicas (Constable *et al.*, 2017).

Bactérias Gram-negativas como *E. coli* e *Klebsiella spp.* estão entre os agentes patogénicos ambientais mais isolados, mas muitos organismos Gram-positivos como, por exemplo, *S. uberis* e *S. dysgalactiae* podem ser encontrados nos arredores dos locais onde a vaca se encontra, e a infeção inicial advém frequentemente de uma fonte ambiental (Smith, 2015).

Streptococcus ambientais tornaram-se uma das principais causas da mastite em bovinos leiteiros, sendo que as mais prevalentes são *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*. As infeções com esses organismos podem causar mastite clínica ligeira ou moderada, mas mais frequentemente, dão origem a uma infeção subclínica crónica com uma maior concentração de células somáticas no leite (Constable *et al.*, 2017).

Vários outros agentes patogénicos estão incluídos na classe ambiental de infeções. Estes agentes patogénicos invadem a glândula mamária, quando os mecanismos de defesa estão comprometidos ou quando eles são inadvertidamente inativados numa fase de terapia intramamária. Neste grupo de organismos oportunistas inclui-se *Pseudomonas spp.*, leveduras, *Prototheca spp.* e bactérias como *Serratia marcescens*, e *Nocardia spp.* (Constable *et al.*, 2017).

A diversidade de agentes ambientais da mastite tende a aumentar à medida que o manejo das explorações leiteiras se intensifica. Cabe ao médico veterinário criar soluções para que seja possível uma redução da exposição a estes organismos, a qual se baseia, normalmente, na melhoria da higiene das vacas, das áreas de alojamento e do processo de ordenha (Smith, 2015).

3.3.2.1. *Streptococcus dysgalactiae*

Streptococcus dysgalactiae é uma bactéria Gram-positiva, hemolítica e catalase negativa com capacidade em sobreviver tanto na glândula mamária como no ambiente do estábulo, classificando-se, muitas vezes, como agente simultaneamente ambiental e contagioso (Teixeira *et al.*, 2008).

Esta bactéria é encontrada no ambiente e pode permanecer nele durante um longo período de tempo, foi isolada na cavidade oral, amígdalas e vulva de vacas. Lesões nas extremidades dos quartos mamários, como também procedimentos inadequados de ordenha promovem a disseminação da bactéria no efetivo leiteiro. Mastite por *S. dysgalactiae* está associada a um mau estado de saúde dos tetos, sendo frequentemente isolado em tetos gretados ou feridos (Smith, 2015).

Os casos clínicos de *S. dysgalactiae* tendem a ser esporádicos e relativamente fáceis de tratar. Normalmente é mais frequente no início da lactação, devido a infeção durante o período seco e tendem a durar menos de um mês. A razão para a infeção começar no período seco poderá advir de este microrganismo poder estar presente nas amígdalas, o que faz com que os animais ao lamberem os tetos os infetem. É igualmente comum em mastites de novilhas pela mesma razão (Teixeira *et al.*, 2008; Smith, 2015).

Em alguns casos existe cura espontânea, no entanto é aconselhável o tratamento com antibióticos nos casos clínicos. O tratamento durante o período seco é normalmente eficaz e previne novas infeções no início da secagem (Constable *et al.*, 2017).

O controlo passa por melhorar as condições de higiene da sala de ordenha e camas, e por técnicas de manejo que visem a conservação da integridade dos tetos. O agente responde bem a penicilinas, cloxacilina e cefalosporinas (Rebhun, 1995).

3.3.2.2. *Streptococcus uberis*

Streptococcus uberis são cocos Gram-positivos e catalase-negativos, ubiqüitários nas explorações pecuárias. A identificação deste microrganismo pode ser feita pela visualização do seu crescimento em meios como agar sangue e/ou agar Edwards a uma temperatura de incubação entre 30 e 37 °C, durante 24 a 48 horas. As colónias em meio agar sangue apresentam uma dimensão entre um e dois milímetros, são lisas, translúcidas e convexas. Normalmente são não-hemolíticas ou parcialmente alfa-hemolíticas (Biggs, 2009). Em meio agar Edwards há crescimento de colónias castanhas, uma vez que há hidrólise da esculina em glucose e aesculetina (Blowey & Edmondson, 2010).

O trato gastrointestinal, pele, solo e material de cama servem como reservatórios naturais de *S. uberis* (Zadoks et al., 2001). Pode ser isolado em vários locais do animal, no entanto, em situações normais, poucas vezes atinge a glândula mamária (Teixeira et al., 2008).

Smith, (2015) refere que *S. uberis* é encontrado na flora vaginal de vacas, mas as secreções do trato genital provavelmente não desempenham um papel significativo na transmissão da infeção.

Trata-se de um agente comum de mastite clínica e subclínica, geralmente de natureza ambiental. Contudo, também pode apresentar-se de forma contagiosa, disseminada entre os animais ou mesmo pelos ordenhadores e equipamentos. Podem ser caracterizados como intermediários entre contagiosa e ambiental (Zadoks et al., 2001).

A infeção pode ocorrer a qualquer momento durante o período de lactação e geralmente com curta duração (Zadoks et al., 2003). Atualmente, *S. uberis* é o agente mais comum de infeções intramamárias que ocorrem no período seco, verificando-se os casos clínicos no início da lactação. As mastites causadas por *S. uberis* dão origem a quartos edemaciados, quentes e rígidos. O animal pode apresentar temperatura elevada durante 24 horas (Constable et al., 2017).

A maioria dos casos responde bem à antibioterapia com penicilina, no entanto tem havido um aumento recente de casos crónicos, em que o tratamento é ineficaz. A

implementação de um protocolo para pré-*dipping* e pós-*dipping* dos tetos em soluções antissépticas e desinfetantes na ordenha, secagem ou refugo de vacas cronicamente infectadas é normalmente eficaz no controlo deste agente (Zadoks & Schukken, 2003).

3.3.2.3. Coliformes

Os coliformes são bacilos Gram-negativos, oxidase negativos, fermentadores da lactose. Os gêneros classificados como coliformes são *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter*. No entanto, existem outras bactérias Gram-negativas frequentemente isoladas de infeções intramamárias que são incluídas neste grupo erradamente como *Serratia*, *Pseudomonas* e *Proteus* (Hogan & Smith, 2003). São organismos bastante fáceis de identificar através de cultura em placas de meio ágar MacConkey resultando no crescimento de colónias rosa características (Smith, 2015). São considerados agentes patogénicos ambientais e oportunistas que ocupam vários lugares no ambiente comum de bovinos. *Escherichia coli* é um habitante normal do trato gastrointestinal de animais de sangue quente. Tanto a *Klebsiella* spp. quanto a *Enterobacter* spp. povoam o solo, água e o trato intestinal dos animais. *Serratia marcesens* compartilha o mesmo ambiente que *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp. e *Proteus* spp., ambas podem ser isoladas na água e solo, estão fortemente associadas à contaminação de fontes de água, por vezes, utilizada na lavagem de úberes antes da ordenha (Hogan & Smith, 2003; Kawai et al., 2017).

O aumento da temperatura ambiente juntamente com o aumento da humidade influenciam o crescimento destes microrganismos e, somando com o confinamento dos animais durante longos períodos, contribuem para a multiplicação e persistência do agente no ambiente (Smith, 2015).

Os coliformes provocam principalmente mastites clínicas, com maior incidência após o parto ou no início da lactação (Hogan & Smith, 2003). Estas mastites podem ser o resultado de infeções intramamárias adquiridas durante o período seco. No entanto, as infeções por coliformes podem ser adquiridas a qualquer momento durante a lactação, particularmente se a exposição for grande e os mecanismos de defesa primária estiverem comprometidos como, por exemplo, a permeabilidade do esfíncter do teto (Smith, 2015).

A infeção subclínica é igualmente comum, mas de curta duração. No caso de mastites clínicas, a maioria das vezes a gravidade é moderada, existindo, no entanto, devido a libertação de endotoxinas pela apoptose das próprias bactérias, casos

bastantes graves podem ocorrer. Sinais sistêmicos como anorexia, febre, diarreia e queda acentuada na produção de leite são característicos destas situações (Hogan & Smith, 2003). Os casos graves ocorrem mais frequentemente no período peri-parto e no início da lactação (Smith, 2015).

Um fator de risco para o desenvolvimento de mastites por coliformes é o síndrome da vaca caída, devido à imunossupressão causada e à elevada contaminação a que o úbere e os tetos estão sujeitos por contato prolongado com as fezes ou com o material orgânico contaminado (Constable et al., 2017).

O tratamento consiste em controlar os sinais de toxémia inerentes à infecção, com fluidoterapia intensa, ordenha dos quartos afetados com maior frequência, e a utilização de antimicrobianos deve servir apenas de suporte para assegurar a eliminação da infecção, evitar a ocorrência de casos crônicos e de situações de septicémia (Erskine, 2016b). O uso de selante de teto interno combinado com antibióticos intramamários apropriados demonstrou resultar na redução da frequência de novas IIM causadas por bactérias coliformes (Smith, 2015).

3.3.2.3.1. *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa, coliforme que pode ser hemolítica, ou não, dependendo da estirpe, e fermentadora da lactose (Teixeira et al., 2008). Habita o trato gastrointestinal das vacas leiteiras e é classificada como agente ambiental da mastite (Hogan & Smith, 2003).

É um agente muito disseminado no ambiente, particularmente nas fezes, sendo um dos mais prevalentes nas explorações e, por isso mesmo, o agente ambiental que mais provoca mastites sobretudo em explorações onde os cuidados de higiene e limpeza são insuficientes (Teixeira et al., 2008).

A *E. coli* penetra no canal do teto, mas não se fixa às suas paredes, facilitando a sua eliminação no leite e fazendo com que seja rara a cronicidade deste tipo de mastites (Rinaldi et al., 2010). A duração média das infecções intramamárias por *E. coli* durante a lactação é inferior a 10 dias (Hogan & Smith, 2012). De facto, um número bastante alto (80 a 90%) de infecções torna-se autolimitante (Blowey & Edmondson, 2010).

No entanto, Smith (2015) indica que cerca de 10% dos casos de *E. coli* podem resultar em infecções persistentes, pois estas estirpes demonstram ter um mecanismo

de sobrevivência, capaz de invadir e replicar dentro das células epiteliais mamárias, e a capacidade de sobreviver num reservatório intracelular, provocando, mastite clínica recorrente no mesmo quarto mamário ou outro inicialmente saudável.

A maioria dos casos de mastite clínica causada por *E. coli* são precedidos por valores baixos de CCS, com rápido retorno a níveis relativamente normais dentro de semanas após a ocorrência de um caso clínico (Smith, 2015).

Normalmente, a reação inflamatória é local e restringe-se aos quartos afetados com um aumento local de temperatura, rubor e uma produção de leite com um aspeto aquoso. Esporadicamente, a reação inflamatória pode dar origem a um quadro generalizado, provocando uma toxémia, através da libertação para a circulação sanguínea de uma endotoxina por lise bacteriana, que poderá, em casos hiperagudos e sem tratamento provocar a morte do animal em poucas horas (Teixeira *et al.*, 2008, Blowey & Edmondson, 2010). As mastites provocadas por *E. coli* podem ocorrer em mais do que um quarto, mas por ser um agente ambiental, é mais frequente afetar os quartos posteriores, devido aos seus respetivos tetos serem normalmente mais compridos e possuírem um maior diâmetro da sua extremidade. Juntamente com a sua maior aptidão na produção de leite tornando-os mais suscetíveis a manter o canal do teto aberto aumentando assim o risco de entrada destes organismos na cisterna e a desenvolver mastite (Blowey & Edmondson, 2010).

O sucesso do tratamento depende da gravidade dos sintomas, da resistência da vaca e da prontidão do tratamento (Hogan & Smith, 2012).

3.3.2.3.2. *Klebsiella* spp.

Klebsiella oxytoca e *Klebsiella pneumoniae* são as duas espécies mais comuns associadas à mastite bovina (Smith, 2015). Trata-se de um agente ambiental comum de mastite clínica e subclínica em bovinos nas explorações leiteiras (Langoni *et al.*, 2015). Esse organismo é frequentemente encontrado em serrim húmido, que é normalmente utilizado em camas e cubículos (Smith, 2015; Constable *et al.*, 2017).

A infeção intramamária pode ser inicialmente ambiental, mas a transmissão entre vacas pode ocorrer durante os períodos de infeção subclínica através de eliminação fecal em vacas leiteiras infetadas (Constable *et al.*, 2017).

3.3.2.4. *Serratia* spp.

Serratia marcescens e *Serratia liquefaciens* são as espécies mais comumente associadas à mastite bovina. A maioria das estirpes do género *Serratia* spp. produzem colónias vermelhas brilhantes em ágar sangue, mas são facilmente superadas por outros agentes patogénicos. Muitas vezes a sua prevalência pode ser subestimada. De modo a evitar esta subestimação é necessário usar meios de cultura especiais e temperatura de incubação a 20°C (Smith, 2015).

IIM causada por *Serratia* spp. pode ter origem em reservatórios ambientais como material orgânico de cama, e é frequentemente associada à imersão de tetos com clorexidina contaminada (Hogan & Smith, 2012).

Em contraste com a mastite causada por outros coliformes, IIM causada por *Serratia* spp. frequentemente persiste numa forma subclínica por vários meses, de modo, que raramente resultam em sinais clínicos graves (Smith, 2015). A duração média de infeção intramamária por *Serratia* spp é de 55 dias, podendo prolongar-se por 6 a 10 meses. O refugo é recomendado em vacas com casos recorrentes de mastite clínica ou CCS persistentemente elevadas (Smith, 2015).

3.3.2.5. *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas spp. são bacilos Gram-negativos, aeróbios, oxidase positivos e catalase negativos, muito comuns no meio ambiente. Originam-se em águas contaminadas, como por exemplo, em tanques de água parada e águas utilizadas na preparação e limpeza dos úberes antes da ordenha, que se encontram a uma temperatura ambiente. Por vezes também podem ser encontradas na água dos furos (Blowey & Edmondson, 2010).

As infeções intramamárias causadas por *Pseudomonas* spp. são geralmente infeções crónicas que podem persistir em múltiplas lactações (Hogan & Smith, 2003).

O tratamento é por vezes ineficaz, o que se deve, em parte, à produção de fatores anti-fagocitários que inibem as defesas do hospedeiro, como a capacidade de produzir biofilme que reduz a eficácia do tratamento. No entanto, alguns antibióticos são utilizados, como cefalosporinas de 3ª geração (ceftiofur), ou aminoglicosídeos e fluoroquinolonas para tentar resolver estes casos (Smith, 2015).

O uso de soluções antissépticas e desinfetantes no teto antes e após a ordenha em vez de lavagem com água, reduz o risco de infecções causadas por fontes de água contaminadas. A mastite causada por *Pseudomonas* spp. é atribuída ao uso de produtos de infusão intramamária contaminados, higienização inadequada da extremidade do teto, antes de administração de fármacos, lenços utilizados na limpeza dos tetos contaminados e exposição dos animais a água estagnada (Smith, 2015).

Vacas com uma CCS persistentemente alta, ou episódios repetidos de mastite clínica devem ser eliminadas, ou em alternativa, as glândulas individuais podem ser secas (Blowey & Edmondson, 2010).

3.3.3. Mastites por Agentes Contagiosos

Os Agentes patogénicos mais comuns da mastite contagiosa são bactérias adaptadas ao hospedeiro que causam infecções subclínicas de longo prazo, ou seja, não demonstram sinais de infeção, aumentando o problema nas explorações uma vez que que as glândulas mamárias com infecções subclínicas crónicas são o principal reservatório de microrganismos responsáveis por causar mastites contagiosas. A transmissão ocorre quando os tetos de vacas saudáveis são expostos a agentes contagiosos presentes no leite que veio de uma glândula infetada, que na maioria das vezes ocorre na ordenha (Smith, 2015).

A principal fonte de transmissão são as próprias glândulas mamárias infetadas de outras vacas no efetivo. No entanto, vários objetos contaminados com gotículas de leite infetadas podem ser uma fonte de transmissão destes agentes. Alguns exemplos são tetinas da máquina de ordenha, mãos dos técnicos de ordenha, panos de limpeza de úberes na pré-ordenha, tubagem da máquina e o próprio material presente, através de gotículas de leite que vazam dos tetos entre ordenhas (Constable *et al.*, 2017).

Em alguns casos a própria máquina de ordenha pode ser um reservatório de agentes contagiosos. Por vezes, devido às flutuações abruptas de vácuo dentro do grupo de ordenha (gradientes de pressão reversa), estas podem impulsionar agentes contagiosos do leite de uma glândula infetada para o canal do teto de uma glândula saudável. Outras vezes, devido a microrganismos presentes na tubagem que por desinfeção insuficiente não foram eliminados, possibilitando a infeção de vacas saudáveis na próxima ordenha (Smith, 2015).

Existem programas com o objetivo de controlar o contágio da doença. A maioria envolve ações que promovem uma melhoria na higienização e desinfeção de todos os

objetos que têm contacto com os úberes das vacas, visando interromper o modo de transmissão entre vacas infetadas e vacas saudáveis. Além disso, existem programas de terapia antimicrobiana preventiva feita no dia de secagem de vacas, e o refugio de vacas cronicamente infetadas (Constable *et al.*, 2017).

Os métodos moleculares demonstraram que os agentes de mastite estão continuamente a evoluir em resposta às medidas de controlo e mudanças na maneio da exploração. Embora as categorias tradicionais ainda forneçam uma base razoável para iniciar programas de controlo, os veterinários devem estar cientes das possibilidades de rotas adicionais de transmissão e da necessidade de programas de controlo abrangentes que podem exceder as recomendações típicas.

3.3.3.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva, hemolítica, coagulase positiva, anaeróbia facultativa e catálase positiva. O *Staphylococcus aureus* é considerado um dos principais agentes de mastite devido ao seu impacto na CCS e na prevalência generalizada, sendo frequentemente isolado em vacas no período de secagem. Este microrganismo entra na glândula mamária via canal do teto e multiplica-se no interior da cisterna, onde ocorre adesão às células epiteliais e tecido intersticial. A maioria das IIMs causadas por *S. aureus* são crónicas e subclínicas, com episódios periódicos de mastite clínica leve (Teixeira *et al.*, 2008; Smith, 2015).

No entanto, a mastite clínica causada por *S. aureus* pode resultar em sinais sistémicos devido à produção de várias enzimas e exotoxinas que danificam as células mamárias provocando zonas de necrose e fibrose de tecido cicatricial na glândula mamária, podendo encontrar-se gangrenosa e fria devido à supressão de circulação sanguínea provocada pela necrose dos tecidos (Taponen & Pyörälä, 2009). Este tecido cicatricial permite que a bactéria se “esconda”, reduzindo a eficiência do tratamento uma vez que os medicamentos/antibióticos usados no seu tratamento não se distribuem por todo o quarto afetado. Para piorar a situação este microrganismo é ainda produtor de β -lactamases, neste caso penicilinasas, o que faz com que seja resistente a antibióticos beta-lactâmicos como penicilina e amoxicilina (Teixeira *et al.*, 2008; Smith, 2015).

Tem ainda vários mecanismos anti-fagocíticos, impossibilitando a fagocitose por neutrófilos (Taponen & Pyörälä, 2009). Por essas razões, as IIMs por *S. aureus* raramente se resolvem espontaneamente e são difíceis de tratar com antibióticos (Smith, 2015).

Em situações agudas, o animal pode apresentar, para além dos quartos quentes e inflamados, sinais de toxémia (Teixeira *et al.*, 2008). Existe uma taxa relativamente alta de vacas que após estarem infetadas com *S. aureus* não recuperam das mastites que resultam em infeções crónicas e incuráveis. A prevalência de mastites causadas por estas bactérias pode estar relacionada com mecanismos de resistência, redução da suscetibilidade a antimicrobianos e ao baixo percentual de cura durante a lactação. Por vezes a medida mais indicada é o refugio destes animais (Smith, 2015).

3.3.3.3. *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN)

Em relação às características fenotípicas, estes agentes crescem em ágar sangue, formando colónias brancas de 3 a 4 mm, normalmente não hemolíticas, catalase positivos e negativos à coagulase (Biggs, 2009).

Os *Staphylococcus* coagulase negativos constituem um grupo bastante heterogéneo com mais de 45 espécies e subespécies de microrganismos, onde aproximadamente uma dúzia são encontradas no leite e associadas a infeções da glândula mamária em bovinos (De Vliegher *et al.*, 2012; Smith, 2015). As mais frequentemente encontradas são *Staphylococcus chromogenes* e *Staphylococcus simulans*, e ocasionalmente *Staphylococcus epidermicus* e *Staphylococcus hyicus* (Pyörälä *et al.*, 2009). São comumente encontrados no ambiente dos estabelecimentos de ordenha, em equipamentos de ordenha e na pele dos quartos mamários (Smith, 2015).

A infeção por estes agentes é mais frequente em animais de primeira lactação, e está principalmente associada aos casos subclínicos de mastite, sendo que a maioria das infeções causadas por SCN permanecem subclínicas com CCS inferiores a 500.000 células / mL. No entanto, quando as infeções por SCN persistem, podem ser caracterizadas por aumento elevado de CCS ou mastites clínicas moderadas (Taponen & Pyörälä, 2009).

Vários estudos relatam a existência de cura espontânea, e o uso de antibióticos β -lactâmicos intramamários em casos de mastite clínica resulta em taxas de cura bacteriológica que excedem 80%, sendo igualmente eficazes quando usados em períodos de secagem (Smith, 2015).

3.3.3.3. *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae é uma bactéria Gram-positiva, não hemolítica e catalase negativa. É considerado um agente obrigatório do úbere, sem capacidade para sobreviver por longos períodos fora da glândula mamária (Smith, 2015). No entanto, podemos encontrá-lo em superfícies que tiveram contacto recente com o leite, tais como tetinas, panos de ordenha e mãos do ordenhador (Teixeira *et al.*, 2008). Crescem em meio de agar sangue e ágar Edwards com colónias com 1-2mm, lisas, translúcidas e convexas (Biggs, 2009).

Estes agentes infetam a cisterna e o sistema de ductos da glândula mamária, onde causam a inflamação. Inicialmente há uma rápida multiplicação de *S. agalactiae* nos ductos galactóforos, seguida da passagem da bactéria para os vasos linfáticos e gânglios linfáticos supramamários. Nesta fase a migração de neutrófilos para os ductos da glândula mamária e a acumulação de detritos bacterianos intensifica a resposta inflamatória, o que resulta na destruição do tecido glandular e consequentemente diminui a produção de leite, podendo chegar ao estado de agalaxia (Constable *et al.*, 2017). A produção de leite diminui quando os dutos ficam bloqueados com células e detritos e os alvéolos associados evoluem. A mastite causada por *S. agalactiae* é geralmente subclínica, por vezes intercalada com episódios de mastite clínica leve e, se não tratada, pode persistir por meses ou anos (Smith, 2015).

A quebra de produção de leite numa vaca associada a mastites devido a *Streptococcus agalactiae* é de cerca de 25% durante a lactação, numa vacaria onde o agente está presente a perda de leite é de cerca de 10-15% da produção esperada (Langoni *et al.*, 2017). Estas bactérias apresentam-se em grande número no leite infetado e uma só vaca infetada pode elevar a CCS no tanque em mais de 100.000 bactérias por ml. O tratamento precoce pode resultar no aumento da produção de leite, porque a natureza superficial da infeção resulta em dano mínimo para as células secretoras do leite. No entanto, podem ocorrer danos aos tecidos, fibrose e diminuição permanente da produção de leite, se a infeção se tornar crónica (Smith, 2015).

A dificuldade no combate a este agente não está particularmente na sua resistência a antibióticos, mas sim, na dificuldade no controlo da sua rápida disseminação (Teixeira *et al.*, 2008). Registam-se taxas de cura de cerca de 90% com penicilinas, eritromicina, cloxacilina e cefalosporinas. Todos os casos subclínicos devem ser tratados imediatamente, uma vez que a resposta à terapêutica é boa e reduz o risco de propagação ao resto do efetivo (Constable *et al.*, 2008).

As infecções que sejam incorretamente tratadas poderão desenvolver cronicidade o que acrescentará uma dificuldade no seu combate. Deste modo é necessário aplicar programas de controlo para *S. agalactiae* baseados na erradicação por meio da identificação, tratamento, refugo e biossegurança, de forma a reduzir o risco de entrada deste patogeneo na exploração (Smith, 2015).

3.3.3.4. *Corynebacterium bovis*

Este agente é um bacilo Gram-positivo e caracteriza-se por fermentação negativa, catalase e oxidase positivo, classificado como agente contagioso (Costa et al., 1985). *C. bovis* pode ser cultivado em meio de cultura ágar sangue, com visualização das colónias após 48 horas de incubação (Constable et al., 2017).

Este microrganismo causa mastite subclínica e possui baixa patogenicidade, sendo considerado por alguns investigadores como comensal das glândulas mamárias. *C. bovis* pode ser um contaminante frequente em amostras de leite e o DNA deste organismo é frequentemente identificado em associação com outras bactérias quando o teste de PCR é usado em amostras de leite (Smith, 2015).

Coloniza principalmente o canal do teto e a presença do mesmo tem servido como indicador de falta de higiene na ordenha (Watts, 2000; Henrique et al., 2016). Surge normalmente associado a vacas que não foram alvo de uma correta terapia durante o período de secagem (Teixeira *et al.*, 2008).

Huxley (2003) sugere que esta bactéria pode ter algum efeito de proteção contra os agentes “maiores” como o *Staphylococcus aureus*, provavelmente devido à inibição por competitividade, a efeitos antagonistas ou à produção de substâncias antimicrobianas. No entanto, esta hipótese é descartada por outros autores que reforçam o potencial de *C. bovis* como agente de mastite devido ao seu isolamento tanto nos casos de mastite clínica quanto nos casos de mastite subclínica com alto CCS (Langoni et al., 2016).

Apesar de não possuir grande importância clínica é relativamente comum, estando associado a mastites com aumentos moderados das CCS e perdas de produção baixas, sendo sensível às penicilinas, ampicilina, amoxicilina e eritromicina (Langoni et al., 2016; Constable et al., 2017).

Este organismo pode ser transmitido de vaca para vaca na hora da ordenha. Medidas preventivas, como uma eficiente desinfecção do teto juntamente com um correto

tratamento antimicrobiano das vacas no período seco, são normalmente suficientes para controlar esta infecção (Hogan & Smith, 2012).

3.3.3.5. *Mycoplasma* spp.

Diversas estirpes do género *Mycoplasma* são consideradas patogénicas em efetivos bovinos, mas as espécies mais comuns associadas à mastite incluem *M. bovis*, *M. californicum* e *M. bovis genitalium* (Smith, 2015).

M. bovis é a espécie mais comum associada à mastite bovina. *Mycoplasma* spp. pode ser isolado de uma variedade de superfícies mucosas de bovinos normais e doentes, mas evidências crescentes sugerem que *M. bovis* é uma causa importante de pneumonia crónica não responsiva em bovinos (Smith, 2015). Os animais infetados podem permanecer assintomáticos ou podem desenvolver broncopneumonia, mastite e/ou artrite, muitas vezes como sequela associada à infeção respiratória ou mastítica (Nicholas & Ayling, 2003).

M. bovis também foi associada a ceratoconjuntivite, endometrite, salpingite, ooforite, aborto e seminovesiculite, todas reproduzidas experimentalmente (Nicholas & Ayling, 2003).

Animais portadores assintomáticos podem infetar coabitantes no efetivo eliminando os organismos nas secreções nasais e/ou vaginais, fezes, leite e também por transmissão de aerossol. Na maioria dos casos, a disseminação do agente no organismo é via descendente, afetando primeiramente o pulmão ou outros órgãos e, posteriormente, por via sanguínea, alcança a glândula mamária após a bacteriemia (Pfützner & Sachse, 1996; Erskine, 2016^a).

Os micoplasmas não possuem parede celular e têm um tamanho intermédio entre os vírus e as bactérias. Devido a esse género bacteriano não possuir parede celular rígida, apresenta uma maior suscetibilidade à dessecação, calor, detergentes e aos desinfetantes. No entanto, a maioria dos antibióticos aprovados para uso veterinário não são eficazes no tratamento, nem no controlo da mastite micoplasmática. Embora possam ser usados para evitar infeções bacterianas secundárias (Nicholas & Ayling, 2003).

Embora algumas IIMs possam resolver-se espontaneamente, as vacas infetadas devem ser consideradas permanentemente infetadas (Smith, 2015).

A principal forma de transmissão de infeções intramamárias causadas por micoplasmas é através das mãos dos ordenhadores, equipamentos de ordenha e o uso de cânulas para tratamento (Pfützner & Sachse, 1996).

São microrganismos de crescimento fastidioso, o que faz com que o método de cultura microbiológica habitual para os outros agentes não seja suficiente para isolar este agente. Além de ser aconselhável repetições de colheita em várias ocasiões, uma vez que este microrganismo é excretado de forma intermitente e a sensibilidade na detecção baseada em cultura depende da excreção contínua do agente (Byrne et al., 2000).

Mycoplasma spp. tem requisitos de crescimento únicos e devem ser cultivados usando meios apropriados e incubação sob condições específicas, como 10% de CO₂. As placas devem ser incubadas por até 7 a 10 dias, porque algumas colônias crescem muito lentamente. O congelamento prolongado de amostras de leite reduz a concentração de organismos viáveis e pode resultar em diagnósticos falso-negativos (Smith, 2015).

Uma vaca que apresente sinais recorrentes de mastite subclínica e que os seus resultados de cultura a partir de amostras de leite sejam repetidamente negativos, deverá ser suspeita e sujeita a exame microbiológico para isolamento de micoplasmas (Teixeira et al., 2008)

São agentes com um grande grau de disseminação e de difícil tratamento. O controlo da mastite micoplasmática num efetivo é possível sem uma taxa de refugo agressiva, se forem implementadas medidas de segregação dentro do efetivo, biossegurança efetiva e excelentes técnicas de ordenha (Pfützner & Sachse, 1996; Byrne et al., 2000).

É importante ressaltar que a principal forma de entrada deste agente na propriedade é através da compra de animais infetados de outros efetivos, daí a importância de realizar exames laboratoriais periodicamente nos animais do efetivo e principalmente nos recém-adquiridos (Smith, 2015).

3.4. Detecção e Diagnóstico de Mastites

O diagnóstico inicial de mastite clínica, é feito por definição durante o exame físico através sinais clínicos visíveis. Em contrapartida, a mastite subclínica só pode ser detetada por exames complementares de diagnóstico. Por esta razão é de grande importância o contínuo desenvolvimento destes exames complementares de modo a se obter uma boa relação entre o custo e o benefício para o seu uso nas explorações. A maioria dos exames disponíveis no campo detetam apenas a presença de inflamação e não propriamente infecção intramamária, mas tornaram-se valiosos testes de triagem (Constable *et al.*, 2017).

3.4.1. Sinais Clínicos

Os sinais clínicos apenas são visíveis na mastite clínica, e são detetados com base no exame clínico e verificação de alterações do úbere e sinais de envolvimento sistémico ou avaliação do leite (Lévesque, 2004).

Os sinais clínicos indicativos de mastite clínica podem ser aumento da sensibilidade ao toque (indicativo de dor), hiperémia, aumento da temperatura, edema, alteração da consistência do tecido mamário ou presença de nódulos, sendo sugestivo de formação de tecido conjuntivo cicatricial fibroso ou abscessos (Langoni, 2013).

A palpação do úbere depois da ordenha pode ser muito útil na deteção de abscessos provocados por *Staphylococcus aureus*, assim como a presença de tecido cicatricial é indicativa de uma lesão permanente da glândula mamária. Sinais sistémicos de inflamação podem incluir aumento da temperatura retal, alterações comportamentais, anorexia e apatia (Langoni, 2013).

O aspeto do leite deve ser também avaliado quanto à sua viscosidade e aparência, e cada quarto mamário deve ser examinado individualmente quanto à presença de coágulos, flocos, sangue e secreções aquosas. A rejeição dos primeiros jatos permite a fácil deteção de coágulos no leite, os quais aparecem no início (fase aguda) das mastites clínicas (Islam *et al.*, 2012).

3.4.2. Contagem de Células Somáticas (Contraste leiteiro)

A contagem de células somáticas (CSS) no leite tornou-se um teste amplamente utilizado pois fornece um indicador sensível e específico da saúde do úbere e da qualidade do leite, uma vez que as CS estão envolvidas na proteção da glândula mamária de infeções como parte do sistema imunológico inato (Talukder & Ahmed, 2017).

Esta contagem pode ser feita através de uma amostra retirada no tanque de leite comum ou através de leite recolhido individualmente em cada vaca. A CCS está aumentada principalmente, mas não exclusivamente, devido a mastites subclínicas. E em explorações com uma elevada CCS no tanque normalmente têm níveis de produção significativamente mais baixos que a média da exploração e torna-se uma medida indireta da prevalência de mastite num efetivo leiteiro (Constable *et al.*, 2017).

Não excluindo que as CCS nos primeiros dias da lactação são frequentemente altas, tal não tem necessariamente relação com uma infeção intramamária, uma vez que em vacas não infetadas as contagens tendem a baixar para níveis mais baixos após duas semanas depois do parto e permanecem baixas durante a lactação. Os fatores que afetam a CCS no leite incluem número de quartos infetados, classe de bactérias, idade das vacas (vacas mais velhas têm contagens mais altas), fase de lactação (as contagens são mais altas nos primeiros dias após o parto e no final da lactação) e produção média do efetivo com a contagem de células reduzindo conforme a produção de leite aumenta, por efeito de diluição (Constable *et al.*, 2017).

Quartos saudáveis têm uma CCS abaixo de 100.000 células / mL, este valor deve ser usado como indicador de ausência de infeção. No entanto apenas valores acima de 200.000 células / ml é considerado um úbere com mastite. Quando o tanque de leite comum apresenta uma CCS com mais de 400.000 células / ml, é considerado impróprio para consumo humano na União Europeia (EU) (Schwarz *et al.*, 2011).

Em Portugal, esta prática é levada a cabo através do contraste leiteiro, um serviço disponibilizado de forma não gratuita a produtores que adiram a este serviço. Os produtores recebem informação acerca dos níveis de produção, do teor proteico e butiroso, ureia e da CCS de cada indivíduo ordenhado no dia da colheita mensal, e das variações destes parâmetros a nível individual e do efetivo em relação aos meses anteriores.

3.4.3. Teste Californiano de Mastites

O TCM é um dos testes mais confiáveis e baratos para detetar mastite subclínica. No entanto, a sua melhor aplicação é provavelmente na identificação de quartos infectados em vacas já identificadas com infeção com base na CSS individual (Bradley & Green, 2005).

O teste é feito através de um reagente com uma ação detergente que desnatura a membrana das células somáticas reagindo com o DNA dos núcleos celulares criando um gel através de um aumento de viscosidade no leite. É também um indicador de pH, normalmente roxo bromocresol que muda para violeta quando o pH do leite é superior a 6,8, ou seja quando entra em contacto com leite mastítico, sendo o pH de leite normal 6,6. O TCM é misturado com amostras de um quarto de leite previamente recolhidas, posteriormente agitadas suavemente e após 15 segundos está pronto para ser avaliado. O resultado varia entre negativo, traço, 1, 2 ou 3, dependendo do grau de viscosidade apresentado. Estes resultados podem ser ainda relacionados com a CSS do leite, como mostrado na Tabela 1 (Constable *et al.*, 2017).

Tabela 1– Relação entre o resultado do TCM e a CCS e como interpretá-los (Constable *et al.*, 2017).

Resultado	Viscosidade	CCS	Interpretação
0 (negativo)	<i>Ausente</i>	<i>0–200,000 cells/ml</i>	<i>Quarto saudável</i>
T (traços)	<i>Leve</i>	<i>200,000–400,000 cells/ml</i>	<i>Mastite subclínica</i>
1+ (fraco positivo)	<i>Leve / Moderada</i>	<i>400,000–1,200,000 cells/ml</i>	<i>Mastite subclínica</i>
2+ (positivo)	<i>Moderada</i>	<i>1,200,000–5,000,000 cells/ml</i>	<i>Mastite subclínica</i>
3+ (forte positivo)	<i>Intensa</i>	<i>> 5,000,000 cells/ml</i>	<i>Mastite subclínica</i>

3.4.4. Teste de NAGase

O teste NAGase é baseado na medição da atividade de uma enzima associada à célula (N-acetil- β -D-glucosaminidase) no leite, com uma alta atividade enzimática indicando uma alta contagem de células. NAGase é uma enzima lisossomal intracelular derivada principalmente de células epiteliais mamárias danificadas com uma pequena contribuição de neutrófilos. A sua concentração no leite está elevada na presença de uma mastite, mas não só, podendo estar igualmente elevada no início e no final da lactação, como ocorre com a concentração de células somáticas (Constable *et al.*, 2017).

É um teste rápido e preciso, facilmente utilizada em múltiplas amostras devido à sua facilidade de execução. Pode ser feito em leite fresco tanto do tanque, como de um quarto mamário do animal. No entanto, como a maior parte da atividade da NAGase é intracelular, as amostras devem ser congeladas e descongeladas de modo a potencializar a sua atividade máxima. É considerado o mais preciso dos testes indiretos quando possível e deve ser utilizado em conjunto com a CCS de modo a aumentar ainda mais a precisão do diagnóstico de mastite (Constable *et al.*, 2017).

3.4.5. Teste Whiteside

O princípio do WST desse teste é a reação entre uma amostra de leite e hidróxido de sódio a 4% numa lâmina de vidro, que na sua mistura reagem caso o leite seja proveniente de uma glândula mastítica.

Neste teste, são colocadas 4 ou 5 gotas da amostra de leite numa lâmina de vidro e uma gota de hidróxido de sódio a 4 %. De seguida são misturadas com uma vareta de vidro durante 20 segundos. Caso não haja alteração da consistência do leite o resultado é considerado negativo (-). No caso de haver um leve grau de aglomeração e alguma perda de opacidade, mas ainda com aspeto leitoso é considerado um Fraco Positivo (+), Quando o fundo é mais aquoso e grandes aglomerados de materiais coagulados estão presentes, ou quando a amostra é semelhante a soro leite com um fundo de lâmina muito aquoso e existência de massas de material coagulado em forma de filamentos tem uma interpretação de Distinto (++) ou Forte Positivo respetivamente (Islam et al., 2012; Rahman et al., 1970).

3.4.6. Teste de Mastite de Wisconsin

O Wisconsin Mastitis Test é um aperfeiçoamento do TCM, realizado em tubo graduado com a finalidade de eliminar a subjetividade da interpretação dos resultados do segundo (Wani et al., 2018).

Este teste utiliza o mesmo reagente do TCM diluído em água destilada em proporções iguais ou seja 1:1. Utilizam-se 2 ml deste e 2 ml da amostra do leite. É realizado em tubos apropriados, que apresentam um orifício nas suas extremidades com 1,15 mm de diâmetro. A homogeneização deverá ser realizada com movimentos de rotação do tubo de seguida e invertido o tubo mantendo-o assim durante 15 segundos para depois voltar a inverter para retomar à posição original. O reagente irá agir sobre as células somáticas do leite formando um gel viscoso na presença de alterações como a mastite. Após um minuto em que o tubo retoma a posição inicial, a quantidade de fluido restante no tubo é medida. Quanto maior o conteúdo celular, maior a viscosidade e o volume de mistura que permanece no tubo (Langoni, 2000).

Como o tubo é graduado, o resultado será expresso em milímetros, de acordo com a maior ou a menor viscosidade da reação usadas para prever o número médio de células somáticas presentes no leite. Há relação a pontuação do WMT e a CCS (Tabela 2) (Wani et al., 2018).

Tabela 2- Correlação de resultados no WMT com valores de CCS. Tabela adaptada de Wani et al., (2018).

WMT (mm)	CCS (cells/ml)	WMT (mm)	CCS (cells/ml)
3	140,000	17	730,000
4	165,000	18	790,000
5	195,000	19	855,000
6	225,000	20	920,000
7	260,000	21	990,000
8	300,000	22	1,050,000
9	340,000	23	1,130,000
10	380,000	24	1,280,000
11	420,000	25	1,360,000
12	465,000	26	1,440,000
13	515,000	27	1,525,000
14	565,000	28	1,610,000
15	620,000	29	1,700,000
16	675,000	30	1,800,000

3.4.7. Cultura Microbiológica

A principal característica de um exame microbiológico é a capacidade em oferecer resultados rápidos e seguros na cultura de amostras de leite recolhidas em vacas quando existe suspeita de infecção intramamária. É uma etapa de diagnóstico imprescindível, uma vez que tem a capacidade de identificar o agente causador da mastite e assim aplicar um tratamento específico de combate contra esse agente. Esta amostra pode ser recolhida de leite proveniente de um só quarto mamário ou ser composta por leite de vários quartos suspeitos. A recolha de amostras deve ser feita assepticamente e colocada em frascos estéreis para que não haja contaminação, consequentemente tornando-a inviável. Os primeiros três jatos de leite devem ser rejeitados e durante a colheita o frasco deve ser mantido obliquamente em relação ao solo de modo a minimizar a entrada de contaminantes. Imediatamente após a colheita, as amostras devem ser congeladas ou colocadas a uma temperatura 4-5°C no caso de cultura ser feita até um máximo de 24 horas (Brito, 2005).

A cultura é feita normalmente em meio ágar-sangue com coloração de Gram, e com uma avaliação da morfologia do microrganismo e testes específicos, permitem a identificação do agente. Placas de meio de cultura seletiva, como biplacas (ágar MacConkey e ágar sangue com 1% de esculina), triplas (ágar MacConkey, ágar sangue e ágar TKT) podem ser usadas para diferenciar agentes patogénicos Gram-positivos e Gram-negativos. Uma amostra de leite é considerada contaminada quando três ou mais espécies de bactérias são isoladas. Um quarto é considerado curado quando as bactérias, isoladas na amostra inicial, não estão presentes em nenhuma amostra 14, 21 ou 28 dias depois (Constable *et al.*, 2017).

3.4.8. Teste da Condutividade Elétrica

A prova baseia-se no princípio em que o aumento da condutividade elétrica do leite é diretamente proporcional ao aumento da inflamação do úbere e da CCS. O aumento de iões sódio e cloro, e o consequentemente o aumento da condutividade elétrica são características do leite mastítico (Teixeira *et al.*, 2008).

Uma vez que está definido que as alterações eletrolíticas do leite são as primeiras a ocorrer na mastite, testar a condutividade elétrica no leite permite ainda a identificação de mastites subclínicas muito antes de qualquer outro teste, e o teste é atraente por esse motivo (Constable *et al.*, 2017).

No entanto, para conseguir este diagnóstico com algum grau de precisão, é necessário comparar os valores de condutividade em cada quarto mamário da vaca e comparar esses valores de condutividade ao longo do tempo. Este teste torna-se realmente útil quando a sua leitura é automatizada através da incorporação do leitor em robôs de ordenha de modo a ser realizada em todas as ordenhas, com registo imediato na base de dados da exploração. Deste modo alcança o seu potencial máximo na deteção de infeções intramamárias (Constable *et al.*, 2017).

3.5. *Prototheca* spp.

3.5.1. História da Taxonomia

Wilhelm Krüger isolou pela primeira vez, em 1894, uma alga do género *Prototheca*, a partir do fluxo de seiva de uma árvore, identificando duas espécies, *Prototheca moriformis* Krüger e *P. zopfii* Krüger (Krüger W., 1894) e descreveu-as como microrganismos unicelulares semelhantes às algas do género *Chlorella*, embora fossem diferenciadas principalmente pela ausência de clorofila na sua composição. Mais tarde, foram associados à mastite bovina em 1952 por Lerche (Bexiga & Vilela, 2003).

Desde então, a mastite prototecal é reconhecida em todo o mundo, em países como os Estados Unidos (Anderson e Walker, 1988), Bélgica (Lagneau, 1996), Dinamarca (Aalbaek *et al.*, 1998), Portugal (Bexiga & Vilela, 2003), Itália (Buzzini *et al.*, 2004), Alemanha (Möller *et al.*, 2007), Brasil (Bueno *et al.*, 2006), Japão (Osumi *et al.*, 2008), Canadá (Pieper *et al.*, 2012) e Polónia (Jagielski *et al.*, 2019).

Em Portugal, foram descritos alguns casos de mastite bovina por *Prototheca* spp. no centro do país, nas ilhas dos Açores (Bexiga & Vilela, 2003), e foi notificada uma elevada incidência de casos no Norte do país (Thompson *et al.*, 2009; S. Marques *et al.*, 2006). Esses últimos achados sugerem que a mastite causada por *Prototheca* spp. foi subdiagnosticada no país durante muito tempo (Marques, 2010).

Na Polónia, a ocorrência de mastite por algas *Prototheca* foi demonstrada pela primeira vez no início dos anos 2000 (Malinowski *et al.*, 2002; Jagielski *et al.*, 2019).

A maioria dos autores considera cinco espécies atribuídas a este género, que inclui *P. zopfii*, *P. wickerhamii*, *P. blaschkeae*, *P. stagnora* e *P. ulmea* (Marques, 2010) e mais recentemente *P. cútis* (Satoh *et al.*, 2010). Existe ainda uma sexta espécie, *P. moniformis*, a qual, no entanto, não é geralmente aceite por toda a comunidade científica. Todos os autores concordam que *P. zopfii*, *P. wickerhamii*, *P. blaschkeae* são as únicas espécies patogénicas para humanos e animais (Costa *et al.*, 1998; Marques *et al.*, 2015). *P. wickerhamii* está geralmente associada à patologia humana, *Prototheca zopfii* associada a infeções em animais e principalmente à mastite bovina, *Prototheca blaschkeae* foi recentemente isolada em amostras de leite mastítico (Mohabeer *et al.*, 1997; Sara Marques *et al.*, 2008).

P. zopfii é responsável pela grande maioria dos casos relatados. Possui dois genótipos: genótipo 1 e 2, e apenas o segundo foi associado à mastite bovina (Thompson *et al.*, 2010; Pieper *et al.*, 2012).

Pieper et al. (2012) realizaram um estudo de campo onde recolheram amostras de leite de 2428 vacas leiteiras em 23 explorações leiteiras aleatórias, e mais 23 explorações de controlo. Houve 64 amostras positivas para *Prototheca* spp. entre as quais 58 foram identificadas como *Protothecas zopfii*. Posteriormente houve diferenciação entre genótipos 1 e 2, através de PCR e espectrometria de fluxo /ionização a laser assistida por matriz. Todos os isolados foram identificados como genótipo 2 de *Prototheca zopfii* (Pieper et al., 2012).

Um estudo recente que analisou o rRNA 18S sugeriu que *P. blaschkeae* está mais intimamente relacionada com *P. zopfii* do que com outras espécies e que essa espécie também pode estar associada à mastite bovina e não apenas à onicomicose humana como considerado anteriormente (Guillamon et al., 1998).

3.5.2. Epidemiologia

Prototheca spp. está presente em diferentes ambientes em todo o mundo, sendo encontrada com mais frequência em ambientes com alta humidade e matéria orgânica, onde as condições climáticas são propícias para uma rápida multiplicação deste agente patogénico. Estas microalgas já foram isoladas numa grande variedade de fontes, como água potável e marinha, seiva de árvores, lama, fezes de animais domésticos ou animais selvagens, lodo, leite de vaca, produtos à base de carne ou peixe, material usado em camas de animais, tetinas e sistema de ordenha (Uwe Roesler et al., 2003; Bexiga & Vilela, 2003; Pieper et al., 2012).

Em vacas, *Prototheca* foi isolada na glândula mamária, gânglios linfáticos supramamários, útero, trato gastrointestinal e rins (Gonzalez, 1996).

Jagielski et al., (2019), publicaram um estudo, durante o qual isolaram estes microrganismos a partir de amostras colhidas em vacas saudáveis, identificando este agente nas fezes, boca, nariz, reto e vulva. Os autores concluíram que a *Prototheca* spp. coloniza o trato gastrointestinal e urogenital de bovinos sem causar danos ao hospedeiro, nem sinais de infeção (Jagielski et al., 2019). Estas algas são resistentes à digestão devido à esporopolenina incluída na parede celular (Costa et al., 1997), permitindo, assim, a sua eliminação pelas fezes de animais sem que estes evidenciem sinais de infeção ou de multiplicação endógena (Bexiga & Vilela, 2003), levando à reinfeção e promovendo a sua disseminação no meio ambiente (Costa et al., 1997).

Prototheca spp. encontram-se disseminadas em todos os ambientes de efetivos leiteiros, até mesmo em explorações leiteiras sem histórico de mastite prototecal (Uwe Roesler et al., 2003; Jagielski et al., 2019).

Apesar de *Prototheca* spp ser uma microalga, em sistemas aquáticos é apenas um habitante transitório e não indígena, pois não consegue manter taxas de reprodução significativas neste tipo de ambiente (Pore et al., 1983). *Prototheca* spp. também pode colonizar transitoriamente a pele humana, unhas, trato respiratório e sistema digestivo (Morandi et al., 2016). Essas algas omnipresentes são extremamente resistentes, sendo também isoladas de uma grande variedade de valores de pH e concentrações de sal, como em água pré-tratada com cloro e em leite pasteurizado (Melville et al., 1999). A ultrapasteurização é o único procedimento industrial capaz de garantir que o leite fique livre desses agentes, uma vez que a sua inibição total de crescimento só é alcançada a 100° C (Melville et al., 1999; S. Marques et al., 2010).

3.5.3. Patogénese e Sinais Clínicos

A patogenicidade e virulência de *Prototheca* spp. é moderada. Estes microrganismos são considerados agentes oportunistas raros, com capacidade de causar doença em qualquer animal, desde que ocorram fatores predisponentes (Marques, 2010). A infeção ocorre através da contaminação da extremidade do teto com ascensão pelo ducto da glândula mamária até ao tecido mamário (Hodges et al., 1985; Taniyama et al., 1994).

Os animais infetados podem desenvolver mastite subclínica ou clínica na forma aguda ou crónica, sendo esta última a forma predominante (Malinowski et al., 2002; Bexiga & Vilela, 2003). A maioria dos casos clínicos é de gravidade leve ou moderada. As vacas infetadas podem tornar-se cronicamente infetadas e apresentar aumento persistente de células somáticas e baixa produção de leite (Smith, 2015). Geralmente não são observados sinais sistémicos (Malinowski et al., 2002; Bexiga & Vilela, 2003; Uwe Roesler & Hensel, 2003).

Na mastite subclínica, a contagem de células somáticas pode ser superior a 10⁶/mL. Além disso, pode ocorrer mastite seropurulenta em casos agudos com grande número de algas no leite, na camada epitelial alveolar, nos macrófagos e no interstício. A mastite pode progredir para uma infeção granulomatosa crónica com linfadenite regional levando à atresia do quarto mamário infetado e perda da produção de leite (Jánosi et al., 2001; Malinowski et al., 2002; Uwe Roesler & Hensel, 2003).

Apesar de menos frequentes, estão referidos casos de mastites clínicas (Bexiga & Vilela, 2003). O quadro clínico agudo ocorre principalmente em surtos da enfermidade e caracteriza-se pela acentuada redução da produção de leite, que pode cessar abruptamente. A secreção glandular pode apresentar grumos, flocos, aspeto sero-

purulento ou aquoso (Bexiga & Vilela, 2003; János et al., 2001; V. F. F. Bueno et al., 2006).

As alterações comumente observadas no quadro clínico crônico consistem no aumento da consistência do tecido glandular e alterações do leite, como aparência aquosa, presença de grumos de caseína e flocos de fibrina ou pus (Langoni et al., 1995; Gomes et al., 1999). Além disso, o aumento referido de CCS pode não ser contínuo, pois uma vaca infetada também pode apresentar baixos níveis de CCS no leite e a eliminação do agente no leite ocorrer de forma intermitente aumentando a dificuldade no seu diagnóstico (Bexiga & Vilela, 2003; Marques, 2010).

Os achados histopatológicos são geralmente caracterizados por mastite intersticial progressiva associada à atrofia alveolar. As algas podem ser encontradas no lúmen alveolar e no interstício, bem como nos macrófagos mas não no interior das células epiteliais mamárias (V. Bueno et al., 2006). Essas algas podem causar a destruição dos vasos sanguíneos, ácinos e tecido conjuntivo intersticial do úbere, levando à atrofia dos alvéolos. Noutros órgãos, essas algas também podem causar lesões inflamatórias destrutivas e necróticas.

Casos de prototecose disseminada têm sido descritos em vacas com mastite necrótica maciça, edema renal, trombose das artérias pulmonares e colite (Marques, 2010).

3.5.4. Diagnóstico de Prototecose (mastite)

O diagnóstico de mastite prototecal é geralmente baseado na identificação de mastite através de indicadores específicos como, por exemplo, a monitorização de CCS ou através do Teste Californiano de Mastites (TCM), com posterior recolha de leite asséptico de vacas potencialmente infetadas. Por sua vez é feita a cultura das amostras de leite em meio indicado, ágar Sabouraud dextrose ou ágar sangue, seguido de análise macro ou microscópica de montagens húmidas com coloração azul algodão lactofenol (Marques, 2010).

A identificação deve ser feita com base nas características morfológicas macro e microscópicas ou por comparação em padrões de assimilação de diversos substratos. Pode ser utilizado o sistema API 20 C Aux, sabendo que *Prototheca zopfii* apenas assimila glucose e glicerol, e os restantes testes são negativos (Bexiga & Vilela, 2003).

Em ágar sangue e ágar Sabouraud dextrose o crescimento é bastante idêntico, após 24 horas e até um máximo de 72 horas de incubação a 25 a 37 ° C. Em meio de cultura ágar sangue, essas algas geralmente apresentam colónias brancas a

acinzentadas, opacas, pastosas, não hemolíticas, com um diâmetro de 0,5 a 1 cm. Em ágar Sabouraud dextrose, as colônias têm uma coloração que pode ir de creme a branco, relativamente secas e com consistência cremosa e superfície granular. Este crescimento é muito semelhante ao crescimento de leveduras nestes meios, sendo facilmente mal identificadas (Marques, 2010). Existem meios seletivos e de enriquecimento para este agente, como o PIM - *Prototheca isolation medium* (Pore, 1973) - ou o meio PEM - *Prototheca enrichment médium*, contém fltalato que inibe bactérias e 5-fluorocitosina para suprimir leveduras. São úteis quando existe contaminação da amostra de modo tornar possível a sua recuperação. Para a maioria das espécies de *Prototheca* spp., são adequadas as Incubações a 30 ° C durante 72 horas (Pore et al., 1987; Bexiga & Vilela, 2003; Smith, 2015).



Figura 1 - Crescimento de algas *Prototheca zopfii* em placa de ágar Sabouraud dextrose após 96 horas de incubação a 28 ° C (Marwa & Lamiaa, 2013).

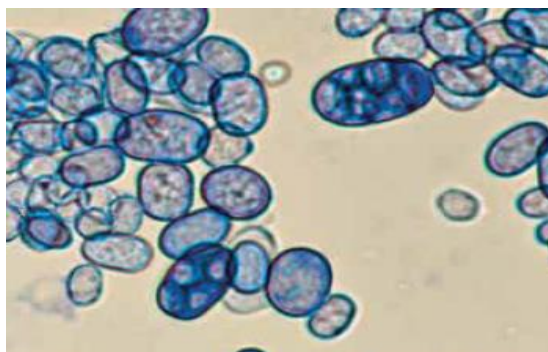


Figura 2 - Visualização microscópica de algas *Prototheca* spp. através de microscopia de luz (MB 40x) (Bozzo et al., 2014).

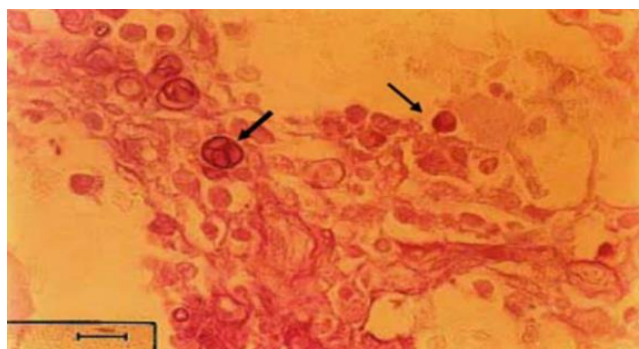


Figura 2 - Células de *Prototheca zopfii* na parede epitelial do alvéolo mamário (seta fina) e no espaço interalveolar (seta grossa). Microscopia óptica de espécime corado com PAS. 1000x. Barra = 10µm (V. F. F. Bueno et al., 2006).

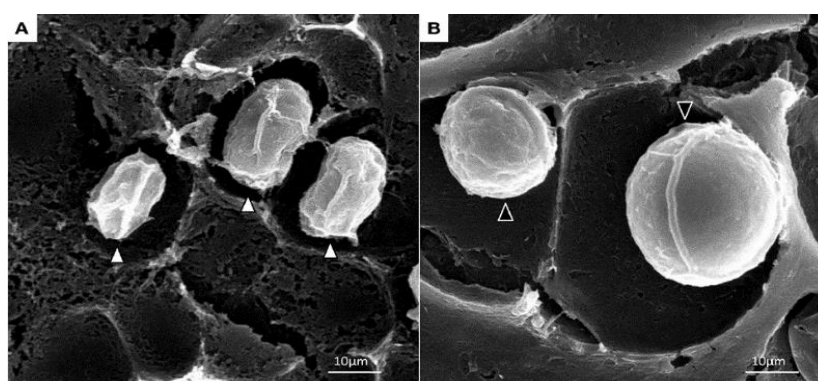


Figura 3 - Micrografias eletrônicas por varredura de células do genótipo I (A) e II (B) de *Prototheca zopfii*. Indicando a diferença no tamanho e forma esporangiais dos genótipos I e II (Shahid et al., 2017).

Foram desenvolvidos diversos métodos diagnósticos alternativos para a detecção da mastite bovina por *Prototheca*, como a citologia aspirativa por agulha fina (FNAC) ou o ELISA baseado na detecção de IgG anti-prototecal no soro (Roesler et al., 2001; Elizabeth et al., 2004; Kano et al., 2016).

Roesler et al., (2001) e Kano et al (2016) demonstraram que o sistema de detecção ELISA para IgG anti-prototecal no soro foi específico e sensível o suficiente para permitir o diagnóstico de mastite prototecal, mostrando sensibilidade e especificidade confiáveis na distinção entre animais infetados e não infetados. A identificação sorológica de vacas em lactação infetadas com *P. zopfii* é uma ferramenta útil para erradicar estes agente em efetivos infetados (Rösler & Hensel, 2003).

A técnica de citologia aspirativa por agulha fina (FNAC) pode ser utilizada para o diagnóstico da mastite subclínica, com identificação deste agente no material aspirado do parênquima mamário através de procedimentos de coloração (Gram, Giemsa e Shor) ou por microscopia eletrônica de varredura, permitindo um diagnóstico rápido e correto aliado à fácil execução e baixo custo (Costa et al., 2004).

3.5.5. Tratamento

A patogénese da infeção por *Prototheca* e as respostas imunes associadas ainda precisam ser esclarecidas, o que dificulta o desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra essa infeção. Ao longo do tempo foram feitas tentativas de obtenção da cura de mastite bovina causada por *P. zopfii* que não obtiveram êxito, existindo uma grande necessidade de testar vários princípios ativos com vários mecanismos de ação. Os mais testados até agora foram os inibidores de crescimento e compostos com ação algicida, na tentativa de encontrar um tratamento eficaz e útil em explorações leiteiras (Marques, 2010).

Em testes de sensibilidade *in vitro* antifúngicos como nistatina e anfotericina B produziram efeito inibitório no seu crescimento, que poderá ser explicado pela presença de componentes fosfolipídios neste organismo. Por outro lado, *In vivo* não houve o mesmo efeito inibitório quando testado em amostras de leite recolhidas de glândulas mamárias previamente tratadas com nistatina e sulfato de estreptomicina (Segal et al., 1976; Spalton, 1985).

Um outro estudo testou a suscetibilidade de isolados do genótipo 1 e do genótipo 2 de *P. zopfii* contra anfotericina B, gentamicina, canamicina e itraconazol. Os resultados mostraram uma maior suscetibilidade *in vitro* a organismos do genótipo 1 de *P. zopfii*. (Marques, 2010). Apesar da variabilidade observada, os agentes mais eficazes determinados em vários estudos foram anfotericina B, nistatina, gentamicina, aminosidina e polmixina B, entre outros (Bexiga & Vilela, 2003; Sobukawa et al., 2011).

Testes de sensibilidade *in vitro* com estirpes de *P. zopfii* isoladas em leite mastítico demonstraram resistência do microrganismo aos antimicrobianos como: ampicilina, cefoperazona, danofloxacin, cloranfenicol, estreptomicina, gentamicina, lincomicina, neomicina, nitrofurantoina, oxacilina, penicilina, polimixina B, sulfazotrin, tiamulina, e tetracilina (Vargas et al., 1998). Casal et al. (1984) demonstraram a existência de uma beta-lactamase em *P. zopfii* que é capaz de inativar vários compostos antibacterianos.

Bexiga et al., (2003) testaram vários agentes antibacterianos existentes no mercado português para aplicação intramamária, e o resultado é demonstrado na seguinte tabela:

Tabela 3- Diâmetros médios observados nos testes de sensibilidade a antibacterianos de *Prototheca zopfii* isolados (Bexiga & Vilela, 2003).

Quimioterápicos	Diâmetro de referência	Diâmetro observado MH	Diâmetro observado MH2	Resultado
Aminosidina	≥ 15	22 (19-25)	19 (17-20)	Sensível
Amoxicilina/Ác. clav.	≥18	0	0	Resistente
Ampicilina	ND	0	0	Resistente
Cefazolina	> 18	0	0	Resistente
Cefalônio	ND	0	0	Resistente
Cefoperazona	≥ 21	0	0	Resistente
Cefquinoma	> 18	0	0	Resistente
Cloxacilina	ND	0	0	Resistente
Colistina	≥11	0	0	Resistente
Estreptomicina	> 15	0	0	Resistente
Gentamicina	≥ 15	12 (11-15)	9 (6-12)	Resistente
Kanamicina	> 18	11 (8-13)	9 (8-11)	Resistente
Lincomicina	ND	0	0	Resistente
Neomicina	ND	0	0	Resistente
Penicilina G	ND	0	0	Resistente
Polimixina B	≥ 12	14 (13-16)	13 (12-14)	Sensível
Rifaximina	> 19	0	0	Resistente
Sulfa/Trimetoprima	≥ 16	0	0	Resistente

ND – não disponível na bibliografia. MH – agar Mueller Hinton; MH2 – agar Mueller-Hinton suplementado com 5 % de sangue desfibrinado de carneiro.

Melville et al. (2003) analisaram a suscetibilidade *in vitro* de *P. zopfii* ao sulfato de cobre (efeito algicida), nitrato de prata (agente cauterizante das glândulas mamárias) e clorexidina (anti-séptico). O nitrato de prata induziu uma diminuição na espessura da parede celular, enquanto a clorexidina mostrou capacidade de degradação de organelos intracelulares e, por outro lado, o sulfato de cobre induziu a uma fibrilação da camada interna da parede celular.

Num estudo recente foi determinado que baixas concentrações de hipoclorito de sódio (0,039% - 0,156%) e iodo (0,156% - 0,625%) foram eficazes contra isolados de *P. zopfii*, o que indica que o uso desses antissépticos pode ser benéfico em rotinas de higiene, na imersão dos tetos pré e pós-ordenha, assim como na secagem terapêutica da glândula mamárias em vacas infectadas por *P. zopfii*, evitando a sua disseminação (Salerno et al., 2010).

Marques (2010) refere outro estudo, desta vez com o objetivo em determinar a suscetibilidade a diferentes desinfetantes comerciais, Biocitroc (ácido ascórbico, bioflavonóides cítricos e outros ácidos orgânicos), eucaliptol, Combicid® (ácido descalcificante), Eco Plus® (solução alcalina clorada) e Prodip (digluconato de

clorexidina). Destes, apenas o Biocitro e Plus® se mostraram eficientes para todas as espécies de *Prototheca*.

A atividade algicida de óleos naturais contra *Prototheca spp* também foi testada *in vitro*, onde se obtiveram bons resultados com óleos de *Melaleuca alternifolia*, *Citrus bergamia*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Thymus vulgaris* de modo que foram verificados efeitos inibitórios sobre estas algas (Nardoni et al., 2018). Ao mesmo tempo, os óleos essenciais de *Mentha piperita* e *Satureja hortensis* foram eficazes na redução significativa dos sinais clínicos de inflamação e fibrose *in vivo*, em um modelo de ratos murino com prototecose cutânea induzida por *P. zopfii* (Nardoni et al., 2018).

A atividade inibitória de flavonóides contra *Prototheca spp.* também foi comprovada *in vitro*, tendo apresentado halos de inibição de crescimento com diâmetros de 14,5, 17,8 e 20,7 mm, para apenas três dos 12 compostos testados contra *Prototheca spp.* (Pietro Buzzini et al., 2008).

Nardoni et al, (2018) avaliaram a ação algicida de 30 óleos essenciais quimicamente definidos contra *P. zopfii* e *P. blaschkeae* isolados no leite de vacas leiteiras com mastite, mostrando que alguns desses OE, em particular o *Citrus paradisi*, têm um bom impacto na atividade antialgal contra *P. zopfii* e *P. blaschkeae*. Este achado pode contribuir para ampliar a visão informativa sobre o tratamento não convencional de vacas mastíticas em ambientes leiteiros.

Alves et al, (2017) relataram pela primeira vez o poder de ação algicida da guanidina em estirpes de *P. zopfii* de origem animal, também *in vitro*, indicando uma possível utilidade de desinfetante ou antisséptico alternativo para limpeza tanto do ambiente leiteiro, como nos equipamentos de ordenha em efetivos com prototecose. Além disso, o efeito algicida da guanidina em baixas concentrações é evidenciado, podendo ser usado para terapia química na secagem ou no tratamento clínico de glândulas infetadas por essas microalgas, devido ao seu baixo potencial irritante e à sua não toxicidade comprovada na utilização em mucosas e conjutivas em humanos, no tratamento prototecose (Yamada et al. 2009; Alves et al., 2017).

A atividade antimicrobiana da lactofenina bovina tem sido testada em vários microrganismos, nomeadamente em algas da espécie *P. zopfii*. Neste estudo houve alguma variabilidade nos resultados, no entanto, em várias amostras os isolados da *Prototheca* mostraram-se extremamente suscetíveis e apresentaram inibição completa do crescimento com 1 pg / mL e 7 pg / mL de lactofenina bovina (Lee et al., 2004).

Na determinação da suscetibilidade a tampões borato e fosfato *in vitro* de algumas estirpes de *P. zopfii* e *P. blaschkeae*, ambos em pH 9, os resultados mostraram que todos os isolados testados cresceram na presença de tampão fosfato, no entanto, verificou-se que na presença de tampão borato, todos os isolados foram inibidos com o

tempo, tendo as estirpes de *P. zopfii* sido completamente inibidas após uma semana de incubação (Marques, 2010).

No que diz respeito à suscetibilidade à temperatura da *Prototheca spp.*, vários estudos têm demonstrado que estas algas apresentam suscetibilidades altamente variáveis e que resistem à pasteurização convencional e a outros tratamentos térmicos. como 62-65° C / 30 min, 72-75 ° C / 15 segundos e 72- 75 ° C / 20 segundos (Marques et al., 2010). A única temperatura observada como efetiva na inativação de isolados de *P. zopfii* e *P. blaschkeae*, foi de 100° C durante 1 segundo, o que demonstra uma alta capacidade de resistência dessas algas e o seu potencial risco para a saúde pública (Marques et al., 2010).

Embora os isolados de *P. zopfii* sejam sensíveis a inúmeros agentes terapêuticos *in vitro*, as diversas tentativas de tratamento intramamário não têm sido tão bem-sucedidas. Devido a esta situação o tratamento da mastite causada por *Prototheca* ainda não é recomendado, portanto o refugo destes animais continua a ser o método mais indicado para o controlo da infeção na exploração. O abate de vacas infetadas deve ser associado à identificação e prevenção de locais ambientais contaminados, limpeza de camas e dispositivos de irrigação juntamente com protocolos adequados de ordenha que garantam a limpeza dos tetos e minimizem a propagação da infeção (Smith, 2015).

É fundamental o diagnóstico imediato, pois as medidas de prevenção e controlo devem ser implementadas o mais rapidamente possível (Costa et al., 1996; Milanov et al., 2016).

3.5.6. Controlo e Prevenção

Uma vez que a *Prototheca* pode ser amplamente disseminada no ambiente de efetivos leiteiros e que é extremamente resistente à maioria dos agentes antimicrobianos, o meio mais promissor de redução da sua incidência é melhorar as medidas de prevenção e controlo em efetivos leiteiros e incluir este agente no diagnóstico diferencial da mastite bovina de modo a identificar as vacas infetadas. Um diagnóstico precoce, separação no alojamento e na ordenha, com um refugo precoce das vacas infetadas são as medidas consideradas eficazes contra a prototecose (Rösler & Hensel, 2003).

É extremamente importante prevenir a contaminação, minimizando a exposição da extremidade do teto ao agente, mantendo todos os ambientes da exploração limpos

e secos, como o parque de vacas secas, novilhas, áreas de parto, vacas em lactação e sala de ordenha. A redução da humidade, juntamente com a utilização de materiais inorgânicos nos parques, camas e/ou em zonas de descanso, pode ser uma das formas mais indicadas para controlar a multiplicação de agentes patogénicos ambientais incluindo as algas do género *Prototheca* spp. Em efetivos leiteiros com grande prevalência de mastite, a limpeza sistemática com água quente em alta pressão ou pulverização com algicidas poderá mostrar-se essencial (Marques, 2010).

A sala de ordenha é um local muito importante para o controlo de mastites ambientais em geral e *Prototheca* não é exceção. A higiene adequada da sala, úberes das vacas e equipamentos utilizados antes, durante e depois da ordenha, é uma das medidas preventivas mais importantes (Marques, 2010).

Considerando que o agente pode sobreviver na água, a qualidade desta deve ser avaliada quando utilizada na sala de ordenha. A correta realização da imersão dos tetos em solução desinfetante com ação algicida, antes e depois da ordenha, contribui para a redução de novas infeções (Ribeiro, 1996; Nardoni et al., 2018). Além disso, disponibilizar comida palatável e recém-servida aos animais após a ordenha, de modo a evitar que se deitem imediatamente, permite que o esfíncter do canal do teto tenha tempo de fechar corretamente, antes que esteja em contacto com microrganismos patogénicos (Costa et al., 1998).

Não existe uma relação direta no benefício de suplementação de vitaminas ou minerais com o aumento de resistência a prototecose bovina, porém vários estudos referem que dietas suplementadas com vitamina E e selénio têm influência na resistência sobre outros agentes, podendo auxiliar na redução da suscetibilidade às infeções por *Prototheca* (Marques, 2010).

A utilização de leite de vacas com mastite na alimentação de vitelos não é aconselhável, uma vez que estes animais tornam-se disseminadores deste agente. Costa et al, isolaram *P. zopfii* a partir de zaragatoas retais em vitelos alimentados com leite de vacas com mastite por *P. zopfii* (Costa et al., 2000b).

Como os animais infetados se tornam portadores, o refugio é indicado como o melhor método de controlo da infeção na exploração. É fundamental o diagnóstico imediato, pois os meios de prevenção e controlo devem ser implementados o mais rapidamente possível (Costa et al., 1996; Milanov et al., 2016). Até serem refugadas, as vacas devem ser isoladas e ordenhadas apenas no final da ordenha (Gonzalez, 1996; Bexiga & Vilela, 2003).

Costa et al. (1999) obtiveram êxito no controlo da mastite bovina num efetivo com surto de mastite por *P. zopfii*. As medidas iniciais consistiram no descarte dos

animais infectados por *P. zopfi* e na cauterização química com solução de nitrato de prata a 0,75% dos quartos afetados em animais de primeira e segunda lactação com apenas um quarto afetado. As demais medidas de controle focaram-se nas instalações, manejo e higiene de ordenha. Após a efetivação das medidas de prevenção e controle não ocorreram novos casos de mastite por esta alga no período de dois anos da avaliação.

Rösler & Hensel., (2003) levaram a cabo uma experiência numa exploração e conseguiram erradicar por completo este agente. Através de uma estratégia de diagnóstico agressivo, por uso de técnica de cultura de amostras de leite ao mesmo tempo com realização de pesquisa serológica com sistemas ELISA. As vacas com resultado positivo para *Prototheca* spp. foram separadas do efetivo e refugadas o mais rápido possível. Em dois anos, a prevalência e a incidência de mastite por *Prototheca* spp. diminuiu para zero, indicando que a estratégia de erradicação usada foi bem-sucedida (Rösler & Hensel, 2003).

O objetivo deste trabalho foi estudar a ocorrência de mastite numa exploração leiteira e a prevalência de *Prototheca* spp. e outros agentes infecciosos no efetivo.

Os objetivos específicos incluíram os seguintes pontos:

1. Estudar a prevalência de mastite subclínica por vaca e por quarto mamário na exploração no ano de 2019;
2. Estudar a distribuição na frequência de mastite subclínica por trimestre e por mês no ano de 2019;
3. Analisar a frequência de mastites subclínicas por agente etiológico no ano 2019;
4. Analisar a frequência de mastites subclínicas por agentes ambientais e contagiosos por trimestre do ano;
5. Analisar a frequência de mastites subclínicas por agentes ambientais e contagiosos por grupo de quartos posteriores e quartos anteriores;
6. Analisar a frequência de mastites subclínicas por número de lactações;
7. Analisar a frequência de mastites subclínicas por quarto mamário e tipo de quarto mamário;
8. Correlacionar a ocorrência de mastite subclínica por *Prototheca* spp. com o número de lactações;
9. Correlacionar a ocorrência de mastite subclínica por *Prototheca* spp. com os quartos mamários afetados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Caracterização da Exploração

A exploração está localizada na região Oeste de Portugal, que se caracteriza por uma influência costeira. Esta proximidade do oceano confere a esta região características particulares que permitem considerar um subtipo climático – Atlântico setentrional – exercendo um efeito moderador da temperatura nas terras do litoral e, ao mesmo tempo, conferindo-lhes humidade atmosférica. Segundo registos do IPMA (2020) a temperatura anual varia entre 8°C a 26°C e raramente é inferior a 4°C ou superior a 33°C, com a temperatura média de 15,4°C estabelecida em 2020. Os valores médios de precipitação anual são próximos dos 750 mm e a estação de maior precipitação dura 7,6 meses, de 26 de setembro a 15 de maio, com probabilidade acima de 16% a ocorrer precipitação. A estação seca dura 4,4 meses, de 15 de maio a 26 de setembro e os meses de julho e agosto são os meses mais secos.

A exploração possui um efetivo que excede os 1000 animais, constituído mensalmente, em média, por 550 vacas lactantes, 105 vacas secas, sendo o restante efetivo composto por animais improdutivos com menos de 2 anos. A substituição do efetivo encontra-se assegurada a partir do elevado número de novilhas e novos nascimentos. Além das fêmeas, a exploração possui ainda dois touros destinados à cobertura das novilhas.

A estabulação dos animais nos parques de produção é em cubículos. As condições do piso, corredores e espaços destinados ao movimento dos animais são revestidos a betão riscado de modo a diminuir a frequência de quedas e traumatismos nos animais. A limpeza dos corredores centrais nos parques dos pavilhões é efetuada por sistema de rodos hidráulicos, que funcionam duas vezes por dia em cada parque. As camas são limpas duas vezes por dia e renovadas com aplicação de serrim de madeiras duas vezes por semana. Não existe ventilação mecânica na exploração, no entanto os pavilhões têm uma boa ventilação natural.

O plano nutricional existente na exploração para as vacas em produção é rigoroso, através de um sistema *unifeed*, e é acompanhado periodicamente por um engenheiro agrónomo e um nutricionista.

4.1.1. Protocolos de ordenha

A ordenha na exploração é feita com o auxílio de um sistema em carrossel e realizada duas vezes por dia. A primeira ordenha do dia inicia às 06h00 e a segunda por volta das 17h00, com uma duração média de 4 horas. Este sistema proporciona maior velocidade de ordenha e mão de obra reduzida. Na higienização dos tetos é realizada uma pré-lavagem dos tetos (*pré-dipping*) e é feita a desinfecção dos tetos após ordenha (*pós-dipping*).

Os ordenhadores usam luvas, toca, avental e panos de limpeza para remover o *pré-dipping* antes da colocação das tetinas. É utilizado um pano individual por quarto mamário. Os panos são lavados e secos a 60 °C (máquina própria de secagem de tecidos) no período entre ordenhas para serem reutilizados na próxima ordenha.

O tratamento dos animais com mastites é realizado durante a ordenha em vacas que apresentem alterações visíveis no leite (farrapos), sinais clínicos visíveis no úbere ou diminuição acentuada de produção. Em caso de dúvida é realizado um Teste Californiano das Mastites (TCM) sendo posteriormente assinaladas no úbere com tinta, de modo a não colocar em risco a qualidade do leite no tanque devido a presença de antimicrobianos no leite.

O protocolo de tratamento de mastites é diferenciado consoante a gravidade da mastite. Mastites ligeiras e moderadas são tratadas através de aplicação intramamária de iodohidrato de penetamato (Mamyzin, Boehringer Ingelheim) ou hidróclorido de lincomicina (Lincocin, zoetis) em primeira linha e cefquinoma (Cobactan VL 75mg, MSD Animal Health) aplicado de 12 em 12 horas durante 4 dias em segunda linha. Mastites severas são tratadas com aplicação tratamento intramamário de cefquinoma de 12 em 12 horas durante 5 dias. Nas duas formas de tratamento é sempre administrado sistemicamente um anti-inflamatório não esteroide (AINE).

À saída da ordenha, é levado a cabo semanalmente um protocolo de pedilúvio, alternando na diluição de formaldeído ou sulfato de cobre em água, num pedilúvio uma vez por dia.

4.1.2. Identificação dos animais com mastite subclínica e colheita de amostras estéreis de leite

A identificação e seleção dos animais com mastite foi efetuada com base na análise do contraste leiteiro mensal, nomeadamente dos animais que apresentavam CCS acima das 400.000 cel/mL. A presença de mastite subclínica foi confirmada por realização do teste californiano de mastites (TCM) uma vez por mês, consecutivamente, ao longo de 12 meses. Um total de 244 vacas foram identificadas com CCS superiores a 400.000 células / ml no leite e subsequentemente amostradas. Foi efetuada a colheita asséptica de amostras de leite a partir dos quartos com testes de resultado de TCM igual a 1+ (Viscosidade Leve a Moderada), seguindo o protocolo descrito por Radostitis *et al.* (2007). Nestes quartos, os tetos foram desinfetados com álcool a 70°, utilizando algodão, o qual foi posteriormente descartado. Os primeiros jatos de leite foram eliminados, sendo recolhidos cerca de 15 ml para um recipiente estéril. Obtiveram-se assim 414 amostras de quartos individuais. As amostras foram refrigeradas durante o transporte e processadas no mesmo dia ou num período inferior a 24 horas.

4.1.3. Cultivo e isolamento

Todas as amostras foram sujeitas a um processamento que consiste na inoculação das amostras com aros calibrados de 10 µl, em agar MacConkey (Merck®), em agar Columbia suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro (BioMérieux BioMérieux®, agar Columbia) e em meio líquido, *brain heart infusion broth* (Difco®, BHIB). A incubação foi feita em estufa a 37°C, em condições de aerobiose, durante 48 horas. As colónias cujas morfologias macro e microscópica sugeriam a presença de *Prototheca* spp. foram posteriormente isoladas para agar Saboraud dextrose (Difco®) e as placas incubadas a 37°C durante 48 horas em atmosfera de aerobiose. A observação microscópica foi realizada a fresco, com azul de algodão. (Bexiga & Vilela, 2003).

4.1.4. Parâmetros em estudo

Todos os parâmetros estudados foram calculados através do método utilizado para identificação dos animais com mastite subclínica, colheita de amostras e cultura microbiológica utilizada. Ou seja, CCS > 400,000 células/ml, TCM com resultado 1+ e cultura realizada em condições de aerobiose com uma incubação a 37°C, durante 48 horas.

- Foi calculada a **prevalência anual de mastite subclínica por vaca e por quarto mamário** com base nas seguintes fórmulas:

$$x = \frac{\text{Número de vacas identificadas com mastite subclínica}}{\text{População em risco (N = 550)}}$$

- Onde a população em risco consiste de 550 vacas em ordenha, durante o ano de 2019 (N=550 vacas).

$$x = \frac{\text{Número de quartos identificados com mastite subclínica}}{\text{Número total de quartos das vacas em ordenha durante os meses analisados (N=2200)}}$$

- Onde o número total de quartos mamários em estudo é a multiplicação do número de vacas à ordenha por 4 (N=2200).

- Foi estudada a **frequência de mastite subclínica por trimestre e por mês**:

$$x = \frac{\text{Nº de quartos identificados com mastite subclínica no período estudado (mês ou trimestre)}}{\text{Número total de quartos identificados no período estudado (N=414)}}$$

- Onde o número total de quartos cultivados no período do estudo é N=414

- Foi analisada a **frequência de mastite subclínica por agente etiológico**:

$$x = \frac{\text{Número de amostras identificadas por cada agente}}{\text{Número total de quartos identificados no período estudado (N=414)}}$$

- Foi analisada a **frequência de mastite subclínica por número de lactações**:

$$\chi = \frac{\text{Número de quartos identificados com mastite subclínica em cada grupo de lactação}}{\text{Número total de quartos em estudo analisados (N=414)}}$$

- Número de lactações: 1: uma lactação; 2: duas lactações; 3: três lactações; 4+: quatro ou mais lactações.

- Foi estudada a **frequência de mastite subclínica por quarto mamário**:

$$\chi = \frac{\text{Número quartos identificados com mastite subclínica em cada grupo de quarto mamário}}{\text{Número total de quartos em estudo (N=414)}}$$

- Quarto mamário: PD: posterior direito; PE: posterior esquerdo; AD: anterior direito; AE: anterior esquerdo.

- Foi analisada a **frequência de mastite subclínica causada por agentes ambientais e agentes contagiosos por trimestre**:

$$\chi = \frac{\text{Número de quartos indetificados com agentes do tipo ambiental ou contagioso}}{\text{Número total de quartos identificados por trimestre.}}$$

Foram considerados agentes ambientais os seguintes patógenos:

- *Streptococcus uberis*;
- *Streptococcus dysgalactiae*;
- *Escherichia coli*;
- *Klebsiella spp.*;
- *Leveduras*;
- *Prototheca spp.*;
- *Serratia spp.*;
- *Enterobacteriaceae*;
- *Enterococcus faecalis*;

Foram considerados agentes contagiosos os seguintes patógenos:

- *Staphylococcus aureus*;
 - *Streptococcus agalactiae*;
 - SCN;
 - *Corynebacterium spp.*;
 - *Enterobacter aerogenes*;
-
- Foi estudada a **frequência de quartos mamários positivos para *Prototheca spp.*** entre os restantes agentes etiológicos, trimestre, número de lactação, quarto mamário e tipo de quarto mamário:

$$x = \frac{\text{Número de amostras identificadas com } Prototheca \text{ spp. num determinado trimestre}}{\text{Número total de amostras identificadas com } Prototheca \text{ spp. (N=118)}}$$

- Trimestre: 1º Trimestre, de janeiro a março: (n=89); 2º Trimestre, de abril a junho: (n=98); 3º Trimestre, de julho a setembro: (n=129); 4º Trimestre, de outubro a dezembro: (n=98)

$$x = \frac{\text{Número de amostras identificadas com } Prototheca \text{ spp. num determinado "Grupo de lactação".}}{\text{Número total de amostras identificadas com } Prototheca \text{ spp. (N=118)}}$$

- Número de lactações: 1 (n=74); 2 (n=168); 3 (n=120); 4+ (52).

$$x = \frac{\text{Número de amostras identificadas com } Prototheca \text{ spp. num determinado "Grupo Quarto"}}{\text{Número total de amostras identificadas com } Prototheca \text{ spp. (N=118)}}$$

- Quarto mamário: PD (n=126); PE (n=117); AD (n=95); AE (n=75).

4.1.5. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do programa IBM SPSS ® Versão 19.0. O teste do qui-quadrado para avaliar a associação existente entre duas variáveis qualitativas (Marôco, 2011), considerando-se que um evento é estatisticamente significativo quando o *p value* é menor ou igual a 5% (valor estipulado para um intervalo de confiança de 95%). Um evento estatisticamente significativo indica que podemos afirmar com grande grau de certeza que estes resultados irão repetir-se em outros estudos numa amostra idêntica à utilizada neste estudo.

No teste Qui-quadrado de Pearson em que um dos valores esperados numa célula de era inferior a 5%, foi usado o teste de Fisher (Petrie & Watson, 2006).

5. RESULTADOS

5.1. Prevalência de mastite

Efetuuou-se um estudo em 244 vacas com suspeita de mastite num total de 414 quartos. Esta amostra resultou na identificação de 75 vacas (31%) diagnosticadas com mastite clínica ou subclínica causada por *Prototheca* spp. Os resultados referem-se a um período de um ano, entre janeiro a dezembro de 2019. A prevalência anual de mastite subclínica na população em risco (550 vacas) foi 44% quando consideradas 244 vacas identificadas com mastite subclínica. A prevalência de mastite subclínica por quarto mamário nos 2200 quartos em estudo durante todo o ano foi de 18% (N=414).

A Tabela 4 apresenta os dados relativos à frequência absoluta e relativa prevalência de mastite subclínica nos trimestres estudados.

Trimestre	Frequência Relativa e Absoluta por Trimestre
Janeiro-Março	22% (n=89)
Abril-Junho	24% (n=98)
Julho-Setembro	31% (n=129)
Outubro-Dezembro	24 % (n=98)
Total	100% (n=414)

Tabela 4 - Frequência trimestral de quartos analisados com mastites no ano 2019.

Mensalmente verifica-se uma maior prevalência de mastite subclínica no mês de julho (14%, n=57). Dezembro foi o mês em que se registou uma menor ocorrência de mastite (4%, n=15) (Tabela 5).

Tabela 5 - Prevalência de mastites subclínicas por mês no ano 2019, em 414 quartos mamários testados (N=2200).

Mês em estudo	Frequência Relativa e Absoluta por Mês
Janeiro de 2019	9% (n=36)
Março de 2019	13% (n=54)
Abril de 2019	13% (n=54)
Maio de 2019	10% (n=43)
Julho de 2019	14% (n=57)
Agosto de 2019	9% (n=38)
Setembro de 2019	8% (n=34)
Outubro de 2019	11% (n=47)
Novembro de 2019	9% (n=36)
Dezembro de 2019	4% (n=15)
Total	100% (n=414)

Quando analisados os 414 quartos mamários cultivados, os agentes etiológicos de mastite isolados com maior frequência durante o período em estudo foram: *Prototheca* spp. com 29% (n=118), *Streptococcus uberis* com 11% (n=47), *Streptococcus agalactiae* com 10% (n=40), *Corynebacterium* spp. 9% (n=37), Leveduras com 7% (n=31), *Enterococcus faecalis* com 5% (n=22), SCN com 4% (n=17), *Enterobacteriaceae* com 2% (n=10), *Staphylococcus aureus* com 2% (n=7), *Escherichia coli* com 1% (n=6), *Klebsiella* spp. com 1% (n=4), *Streptococcus dysgalactiae* com 1% (n=6), por fim *Serratia* spp. foi o agente isolado com menor frequência com 0% (n=2) de casos registados no ano 2019 (Gráfico 2).

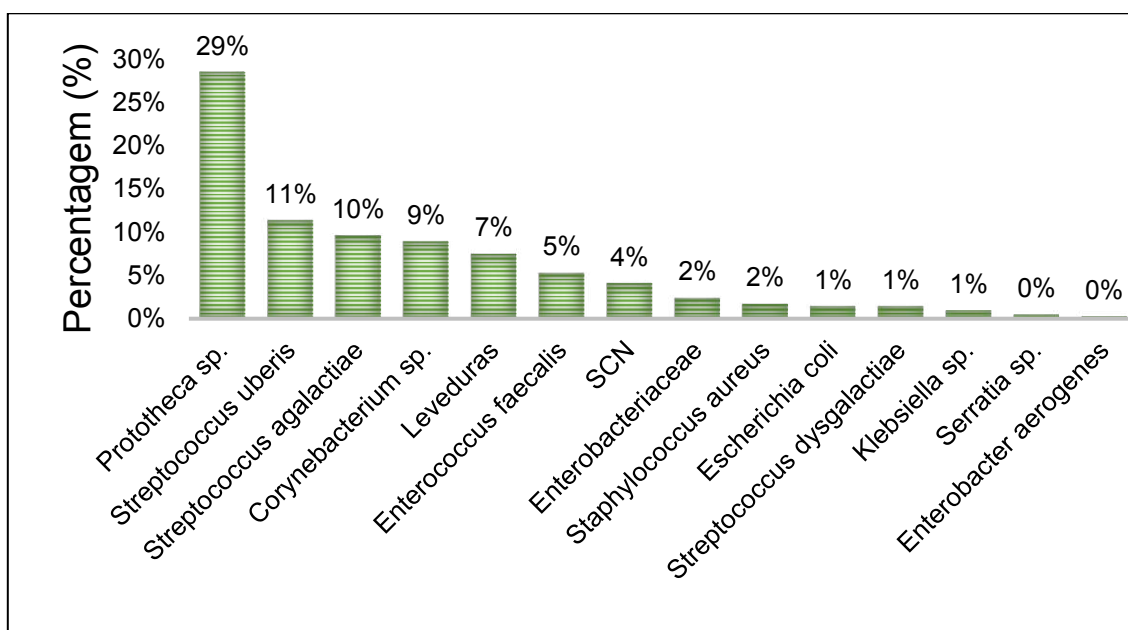


Gráfico 2 – Frequência relativa de isolamento por teto dos agentes etiológicos de mastite durante o período do estudo (ano 2019).

Ao analisarmos por trimestre (Tabela 6), verificamos que no primeiro trimestre o agente com maior frequência foi *Streptococcus agalactiae* (28.1%; n=25), não se tendo verificado qualquer caso de *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, ou *Staphylococcus aureus*.

No segundo trimestre o agente com maior frequência foi *Prototheca spp.* (24.5%; n=24) e não se verificou nenhum caso de *Enterobacter aerogenes*, *Serratia spp.*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus spp.*

No terceiro trimestre o agente com maior frequência foi *Prototheca spp.* (34.9%; n=45), não se verificando nenhum caso de *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus dysgalactiae* ou de *Streptococcus spp.* O agente que demonstrou maior frequência no quarto trimestre foi novamente *Prototheca spp.* (25.5%; n=25) e não foram detetados quaisquer casos de *Serratia spp.* e de *Streptococcus spp.*

A diferença encontrada entre a frequência dos agentes nos diferentes trimestres verificou-se estatisticamente significativa ($F=94.91$; $p < 0.05$).

Tabela 6- Frequência trimestral por agente de quartos mamários cultivados com mastite subclínica.

Agente	Frequência de cultivo de agentes etiológicos por Trimestre			
	Primeiro Trimestre	Segundo Trimestre	Terceiro Trimestre	Quarto Trimestre
<i>Corynebacterium spp.</i>	5.6% (n=5)	10.2% (n=10)	10.9% (n=14)	8.2% (n=8)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0% (n=0)	0% (n=0)	0% (n=0)	1.0% (n=1)
<i>Enterobacteriaceae</i>	0% (n=0)	5.1% (n=5)	0.8% (n=1)	4.1% (n=4)
<i>Enterococcus faecalis</i>	4.5% (n=4)	5.1% (n=5)	4.7% (n=6)	7.1% (n=7)
<i>Escherichia coli</i>	0% (n=0)	3.1% (n=3)	0.8% (n=1)	2.0% (n=2)
<i>Klebsiella spp.</i>	0% (n=0)	1.0% (n=1)	1.6% (n=2)	1% (n=1)
<i>Leveduras</i>	7.9% (n=7)	7.1% (n=7)	7.8% (n=10)	7.1% (n=7)
<i>Prototheca spp.</i>	27.0% (n=24)	24.5% (n=24)	34.9% (n=45)	25.5% (n=25)
SCN	5.6% (n=5)	3.1% (n=3)	2.3% (n=3)	6.1% (n=6)
<i>Serratia spp.</i>	0% (n=0)	0% (n=0)	1.6% (n=2)	0% (n=0)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0% (n=0)	2.0% (n=2)	2.3% (n=3)	2.0% (n=2)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	28.1% (n=25)	12.2% (n=12)	0.8% (n=1)	2.0% (n=2)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	4.5% (n=4)	0% (n=0)	0% (n=0)	2.0% (n=2)
<i>Streptococcus uberis</i>	3.4% (n=3)	11.2% (n=11)	15.5% (n=20)	13.3% (n=13)
Amostra contaminada	3.4% (n=3)	1.0% (n=1)	2.3% (n=3)	7.1% (n=7)
Sem crescimento	10.1% (n=9)	14.3% (n=14)	14.0% (n=18)	11.2% (n=11)
Total	100% (n=89)	100% (n=98)	100% (n=129)	100% (n=98)

Nota: Entenda-se “Amostra contaminada” como inconclusiva e; “Sem crescimento” como sem detecção de qualquer crescimento de colônias microbiológicas.

Relativamente à origem das mastites subclínicas por trimestre (Gráfico 3), verificou-se que em todos os trimestres, agentes ambientais foram aqueles identificados com maior frequência.

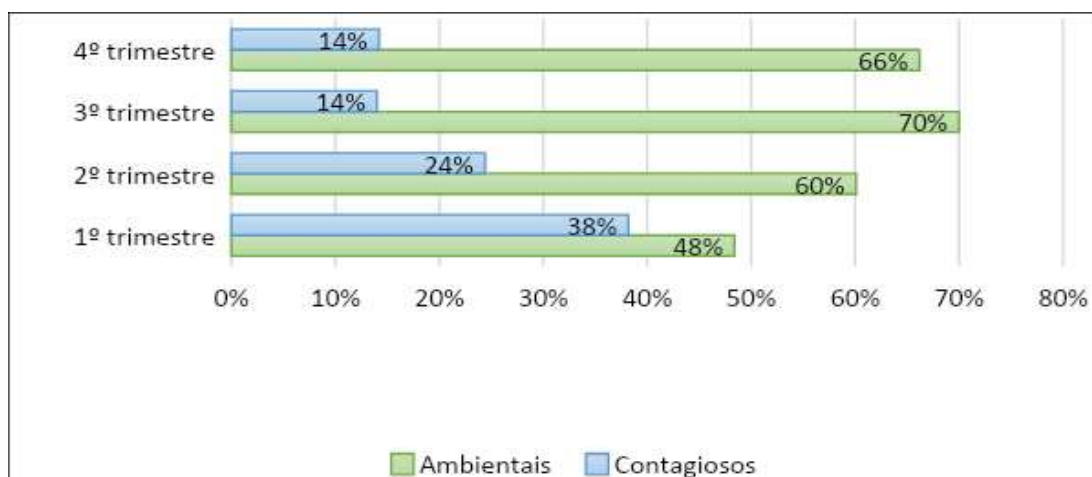


Gráfico 3 - Distribuição frequência de casos de mastite por agente ambientais e contagiosos por trimestre durante o ano 2019 (n=414).

O Gráfico 4 apresenta a distribuição da frequência relativa e absoluta de quartos identificados com *Prototheca* spp. face aos restantes agentes identificados em cada trimestre.

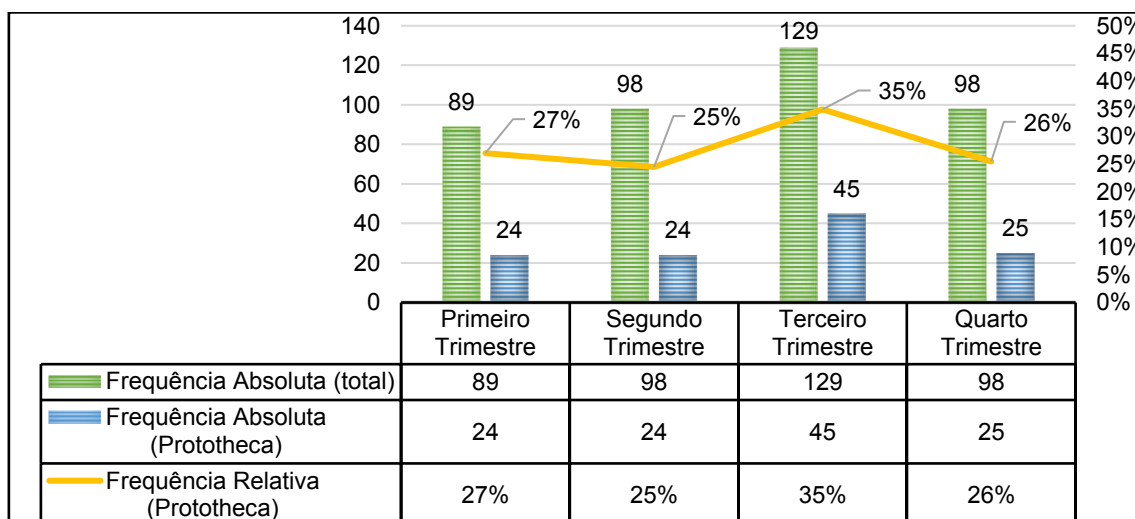


Gráfico 4 - Distribuição do número total de casos de mastite (verde) e número de casos de mastite por *Prototheca* spp. (Azul) por trimestre durante o ano 2019.

5.2. Agentes e número de lactações

A Tabela 7 apresenta as frequências de crescimento de agentes etiológicos por número de lactações.

O agente com maior ocorrência no grupo de 1 lactação foi *Streptococcus uberis* (18.9%, n=74). *Prototheca* spp. foi isolado em 5.4% dos casos deste grupo. Foi neste

grupo que se verificou uma maior percentagem de quartos mamários sem crescimento (24.3%; n=18).

Em todos os outros grupos de número de lactações (2, 3 e 4+) verificou-se uma maior prevalência de *Prototheca spp.*, seguido de 20 casos (11.9%) de *C. bovis* no grupo de 1 lactação, 19 casos (15.8%) de *S. agalactiae* no grupo de 2 lactações e 5 casos (9.6%) de *S. agalactiae* e 5 casos (9.6%) de *S. uberis* no grupo de 4+ lactações.

Staphylococcus aureus não foi isolado no grupo de 3 e 4+ lactações.

A diferença encontrada entre o agente infeccioso e o número de lactações foi estatisticamente significativa ($F=116,35$; $p< 0.05$).

Tabela 7– Frequência de agentes detetados nos quartos afetados por número de lactação da vaca.

Agente	Frequência de cultivo de agentes etiológicos por Número de Lactações			
	Uma lactação	Duas lactações	Três lactações	Quatro ou mais lactações
<i>Corynebacterium spp.</i>	5.4% (n=4)	11.9% (n=20)	7.5% (n=9)	7.7% (n=4)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1.4% (n=1)	0% (n=0)	0% (n=0)	0% (n=0)
<i>Enterobacteriaceae</i>	4.1% (n=3)	2.4% (n=4)	1.7% (n=2)	1.9% (n=1)
<i>Enterococcus faecalis</i>	5.4% (n=4)	3.6% (n=6)	7.5% (n=9)	5.8% (n=3)
<i>Escherichia coli</i>	2.7% (n=2)	1.8% (n=3)	0% (n=0)	1.9% (n=1)
<i>Klebsiella spp.</i>	2.7% (n=2)	0.6% (n=1)	0.8% (n=1)	0% (n=0)
<i>Leveduras</i>	2.7% (n=2)	8.3% (n=14)	11.7% (n=14)	1.9% (n=1)
<i>Prototheca spp.</i>	5.4% (n=4)	36.3% (n=61)	24.2% (n=29)	46.2% (n=24)
SCN	16.2% (n=12)	1.8% (n=3)	1.7% (n=2)	0% (n=0)
<i>Serratia spp.</i>	1.4% (n=1)	0.6% (n=1)	0% (n=0)	0% (n=0)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.7% (n=2)	3.0% (n=5)	0% (n=0)	0% (n=0)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	5.4% (n=4)	7.1% (n=12)	15.8% (n=19)	9.6% (n=5)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1.4% (n=1)	0.6% (n=1)	0.8% (n=1)	5.8% (n=3)
<i>Streptococcus uberis</i>	18.9% (n=14)	8.3% (n=14)	11.7% (n=14)	9.6% (n=5)
Amostra contaminada	0% (n=0)	1.8% (n=3)	8.3% (n=10)	1.9% (n=1)
Sem crescimento	24.3% (n=18)	11.9% (n=20)	8.3 (n=10)	7.7% (n=4)
Total	100% (n=74)	100% (n=168)	100% (n=120)	100% (n=52)

Nota: Entenda-se “Amostra contaminada” como inconclusiva e; “Sem crescimento” como sem detecção de qualquer crescimento de colônias microbiológicas

O Gráfico 5 apresenta a distribuição da frequência relativa e absoluta de quartos identificados com *Prototheca* spp. face aos restantes agentes identificados nos diferentes grupos de lactação.

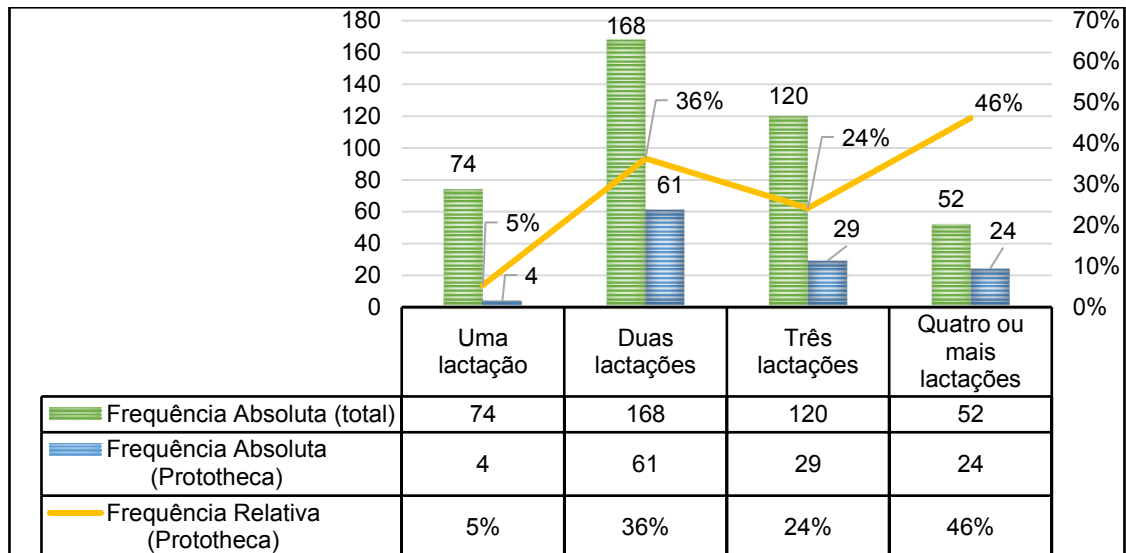


Gráfico 5 - Distribuição da frequência absoluta e frequência relativa de quartos mamários positivos para *Prototheca* spp. (azul) entre os restantes agentes etiológicos (verde) e grupos de lactação (p-value < 0.05).

5.3. Prevalência e Quarto Mamário

Neste estudo, verificou-se que os quartos posteriores direitos são os que apresentam uma maior prevalência de mastite (30.3%; n=105) e que a *Prototheca spp.* é o agente com maior prevalência em todos os quartos mamários: AD = 33.7% (n=32); AE = 26.7% (n=20); PD = 28.6% (n=36); e PE = 25.6% (n=30). Não se verificou, no entanto, uma diferença estatisticamente significativa entre a ocorrência de mastite e o quarto mamário cultivado (p-value=0,810), nem tão pouco entre o agente e o quarto mamário (p-value=0,929).

Tabela 8 - Valores absolutos e relativos de agentes detetados por grupo de tipo de teto.

Agente	Frequência de cultivo de agentes etiológicos por Quarto Mamário			
	AD	AE	PD	PE
<i>Corynebacterium spp.</i>	7.4% (n=7)	8.0% (n=6)	9.5% (n=12)	10.3% (n=12)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.0% (n=0)	1.3% (n=1)	0.0% (n=0)	0.0% (n=0)
<i>Enterobacteriaceae</i>	1.1% (n=1)	1.3% (n=1)	4.0% (n=5)	2.6% (n=3)
<i>Enterococcus faecalis</i>	4.2% (n=4)	5.3% (n=4)	6.3% (n=8)	5.1% (n=6)
<i>Escherichia coli</i>	0.0% (n=0)	4.0% (n=3)	1.6% (n=2)	0.9% (n=6)
<i>Klebsiella spp.</i>	2.1% (n=2)	2.7% (n=2)	0.0% (n=0)	0.0% (n=1)
<i>Leveduras</i>	7.4% (n=7)	6.7% (n=5)	8.7% (n=11)	6.8% (n=0)
<i>Prototheca spp.</i>	33.7% (n=32)	26.7% (n=20)	28.6% (n=36)	25.6% (n=30)
SCN	6.3% (n=6)	4.0% (n=3)	2.4% (n=3)	4.3% (n=5)
<i>Serratia spp.</i>	1.1% (n=1)	0.0% (n=0)	0.8% (n=1)	0.0% (n=0)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.0% (n=0)	2.7% (n=2)	2.4% (n=3)	1.7% (n=2)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	11.6% (n=11)	10.7% (n=8)	7.1% (n=9)	9.4% (n=11)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2.1% (n=2)	2.7% (n=2)	0.8% (n=1)	0.9% (n=1)
<i>Streptococcus uberis</i>	10.5% (n=10)	8.0% (n=6)	11.1% (n=14)	14.5% (n=17)
Amostra contaminada	4.2% (n=4)	4.0% (n=3)	3.2% (n=4)	2.6% (n=3)
Sem crescimento	8.4% (n=8)	12.0% (n=9)	13.5% (n=17)	15.4% (n=18)
Total	100% (n=95)	100% (n=75)	100% (n=126)	100% (n=117)

Nota: Entenda-se “Amostra contaminada” como inconclusiva e; “Sem crescimento” como sem detecção de qualquer crescimento de colónias microbiológicas

O Gráfico 6 apresenta a distribuição da frequência relativa e absoluta de quartos identificados com *Prototheca* spp. face aos restantes agentes identificados nos diferentes grupos de quartos mamários.

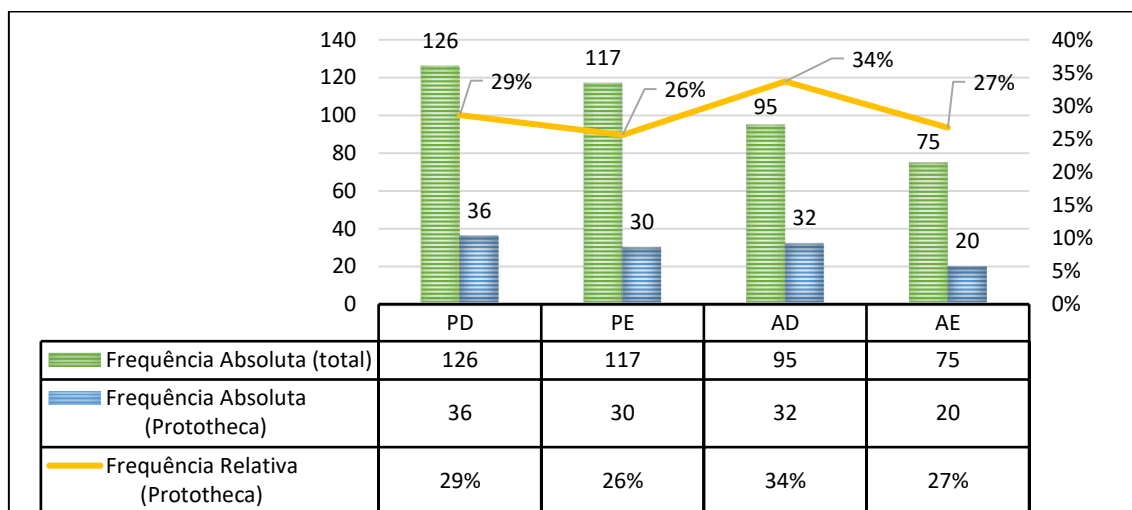


Gráfico 6 - Distribuição da proporção dos casos de *Prototheca* spp. (azul) entre os restantes agentes etiológicos (verde) e tipo de quarto afetado (p-value > 0.05).

Relativamente ao tipo de agente etiológico (ambiental *versus* contagioso), verificou-se tanto nos quartos Anteriores (67.1%; N=115) como nos Posteriores (68.3%; N=167), uma maior frequência de agentes ambientais, embora nenhum destes resultados seja estatisticamente significativo (p-value > 0.05), pois não se verificou existir uma relação entre o tipo de agente e grupo de quartos mamários. Os Quartos Posteriores foram os que demonstraram maior suscetibilidade para ocorrência de mastite com um total de 58% (n=202) amostras positivas e das quais, 167 amostras com resultado positivo para agentes ambientais e 35 para agentes contagiosos. No entanto estes resultados não são estatisticamente significativos no tipo de agente face à localização dos quartos mamários pois (p-value > 0.05; com p=0,354)

Tabela 9 - Frequências relativas e absolutas de mastites ambientais e contagiosas nos grupos de quartos anteriores e posteriores.

Tipo de Agente	Quartos Anteriores	Quartos Posteriores
<i>Agente Ambiental</i>	67% (n=114)	68% (n=167)
<i>Agente Contagioso</i>	19% (n=32)	14% (n=35)
<i>Sem crescimento</i>	10% (n=17)	14% (n=35)
Amostra contaminada	4% (n=7)	3% (n=7)
Total	100% (n=170)	100% (n=244)

5.4. Ocorrência de *Prototheca* spp.

5.4.1. Trimestre Anual

Em relação à prevalência de *Prototheca* spp. registou-se um total de 75 vacas diagnosticadas com mastite subclínica causada por *Prototheca* spp, com 118 quartos mamários positivos correspondendo a 29% de todos os quartos analisados.

Como se pode observar no Gráfico 7, o maior número de casos de vacas diagnosticadas com mastite por *Prototheca* spp. ocorreu no terceiro trimestre, com 45 quartos confirmados, representando 38% de todos os quartos testados. O primeiro, segundo e quarto trimestres apresentam uma frequência muito semelhante com 20% (n=24), 20% (n=24) e 21% (n=25), respetivamente.

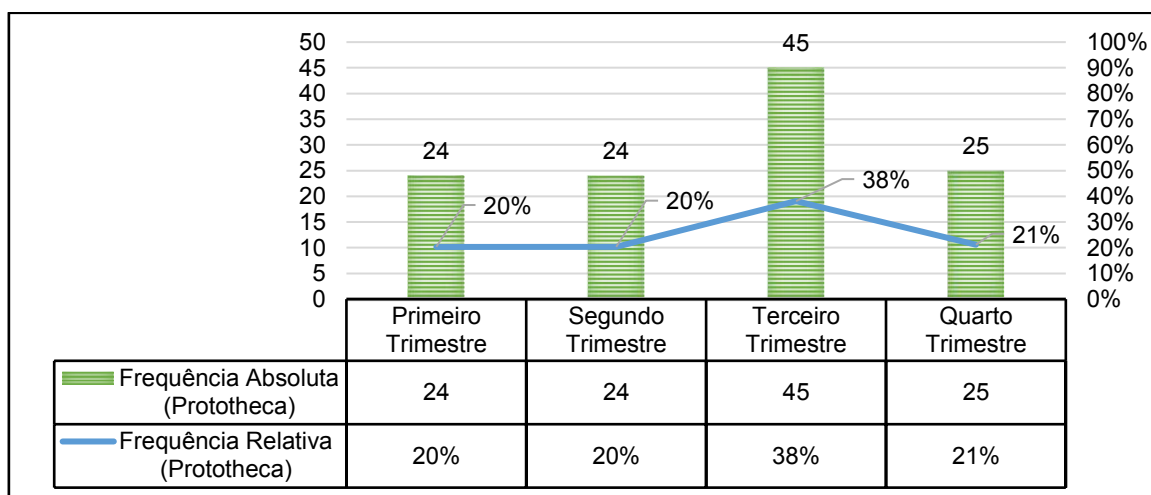


Gráfico 7 - Distribuição da frequência absoluta e frequência relativa de quartos mamários positivos por *Prototheca* spp. por trimestre durante o ano 2019 (n=118).

5.4.2. Número de Lactação

Ao analisar a distribuição de casos positivos para *Prototheca* spp. entre os quatro grupos de lactação verificou-se claramente uma maior ocorrência no grupo de 2 lactações com 52% (n=61), seguida do grupo de 3 lactações com 25% (n=29), 4+ lactações com 20% (n=24), grupo de 1 lactação com 3% (n=4) dos casos, sendo este último o grupo com menor ocorrência registada de casos positivos (Gráfico 8).

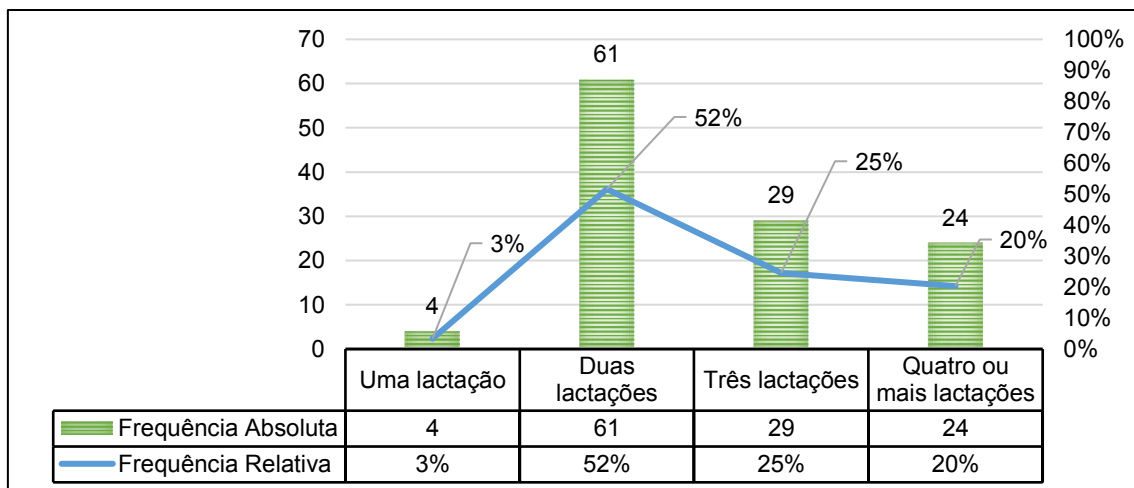


Gráfico 8 - Distribuição do número casos de mastite por *Prototheca* spp. por Grupo de lactação durante o ano 2019 ($n=118$).

5.4.3. Prevalência e tipo Quarto mamário

O Gráfico 9 representa a distribuição da frequência de *Prototheca* spp. entre os tipos de quartos mamários, onde se verifica uma frequência com pouca oscilação entre grupos. Anterior direito = 27% ($n=32$); Anterior esquerdo = 17% ($n=20$); Posterior direito = 31% ($n=36$); Posterior esquerdo 25% ($n=30$).

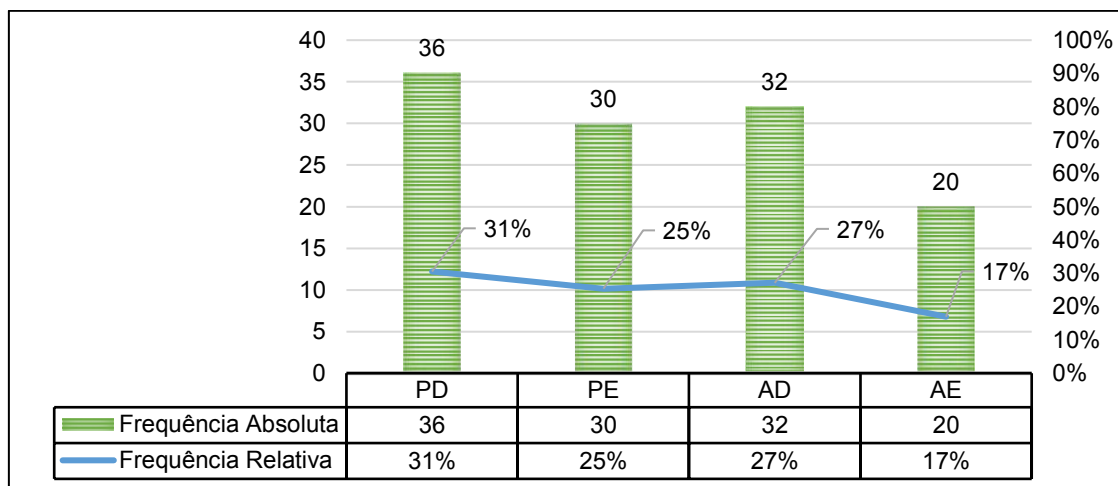


Gráfico 9 - Distribuição do número de casos de mastite por *Prototheca* spp. por quarto afetado durante o ano 2019 ($N=118$).

6. DISCUSSÃO

A prevalência anual de vacas com mastite subclínica na exploração, teve um resultado de 44% e quando calculada em quartos mamários, obteve um valor de 18%.

A prevalência está possivelmente subestimada, devido ao facto, de o critério de inclusão para identificação de vacas com mastite subclínica, ser uma CCS superior a 400.000 cel/ml, e devido ao número total de quartos mamários em risco, ter sido calculado através da multiplicação do número de vacas no estudo por 4. Estes critérios excluem todas as potenciais infeções intramamárias subclínicas com CCS entre 200.000 cel/ml e 400.000 cel/ml e podem induzir uma margem de erro, no cálculo da prevalência de mastite subclínica, visto que algumas vacas poderiam não ter todos os quartos funcionais, aumentando assim o número real de quartos mamários estudados.

Apesar de esta prevalência de mastites subclínicas, apenas contabilizar as mastites dentro do parâmetro escolhido na metodologia, conseguimos ter uma visualização do estado epidemiológico presente, que por sua vez, mostra-nos que a exploração está com uma elevada pressão de agentes patogénicos ambientais. Esta situação já era conhecida pelos proprietários, que resultou num investimento em Serviço de Consultoria na Área da Qualidade do Leite. Consequentemente, foram realizadas alterações nas rotinas de ordenha, manejo da exploração e formação de funcionários, tornando-os mais sensíveis e aptos para a função de ordenhador.

As várias medidas foram implementadas com base em evidência científica e, muito provavelmente, tiveram um papel importante na redução de ocorrência de mastites contagiosas nesta exploração, nas quais:

- A separação de vacas infetadas de vacas saudáveis, tanto nos parques como na ordenha. As vacas previamente identificadas com mastite são ordenhas em último lugar. Esta separação, evita que o leite contaminado entre em contacto com os úberes de vacas não infetadas, estabelecendo uma sequência de ordenha que contribui para a redução da disseminação de IIM entre vacas durante a ordenha (Blowey & Edmondson, 2010).
- A proibição de realizar lavagem de úberes através de jatos de água. A lavagem dos tetos e/ou dos úberes na sala de ordenha, por meio de jatos de água de dispersão automática está confirmada em vários estudos que se torna um fator de risco na incidência e prevalência de novas mastites (Schukken et al., 1991; Zadoks et al., 2001). A água em contacto com a pele contaminada pode escorrer do úbere e contaminar as tetinas, que por sua vez aumenta o risco de infeção intramamária (Blowey & Edmondson, 2010).

- A eliminação e inspeção dos primeiros (2-3) jatos de leite, o “pré-dipping” dos tetos em soluções antissépticas e a secagem dos tetos antes da acoplagem tetinas, utilizando um pano individual por quarto ou folhas de papel descartável. A inspeção dos primeiros jatos de leite em cada vaca, antes da ordenha é um procedimento exigido pela UE aos produtores de leite de todos os estados membros (Hillerton & Berry, 2004). Esta prática permite o diagnóstico precoce das mastites clínicas, aumentando assim a segurança e ainda auxilia na descida do leite, como também evita a entrada de leite alterado (Langoni, 2013). A eficácia do pré-*dipping* já foi demonstrada por vários investigadores, que reduz a prevalência e incidência de mastites ambientais (Gleeson et al., 2009). A secagem dos tetos, com folhas de papel descartável ou de panos individuais por quarto, tem por objetivo não só evitar que resíduos da solução usada no pré-*dipping* entrem no tanque de leite, mas também de estimular o reflexo para a descida do leite e minimizar a contaminação da tetinas (Gleeson et al., 2009).
- A utilização de pós-*dipping* em todas as vacas após a ordenha. Este procedimento pós-ordenha é bastante eficaz na redução de novas infeções, elimina bactérias aderidas à pele após a ordenha, e mantém a proteção do orifício do teto contra a invasão de agentes ambientais, uma vez que depois da ordenha o esfíncter do teto está relaxado favorecendo a penetração de microrganismos (Langoni, 2013). No entanto, Peeler et al., (2000) demonstraram que esta última prática pode contribuir para uma maior incidência de mastites clínicas em explorações com CCS baixas, uma vez que a aplicação contínua de soluções desinfetantes poderá conduzir a uma redução de agentes «menores» que normalmente colonizam o canal do teto, e poderão estar associados à prevenção de infeções intramamárias por agentes «maiores».

A análise dos resultados dos vários agentes etiológicos identificados neste estudo, demonstraram que *Prototheca* spp. é a causa mais comum de mastite subclínica na exploração com 29% e 118 quartos mamários identificados. Seguidamente, foi a *Streptococcus uberis* com 11% e 47 quartos mamários identificados.

A elevada prevalência de agentes ambientais poderá indicar uma elevada contaminação ambiental da exploração (Costa et al., 1998; P Buzzini et al., 2004). O que se verificou quando foram analisadas as condições dos parques da exploração, desta forma constatou-se a existência de um parque sem cubículos ou camas

individuais, com toda a área coberta de palha, que mesmo ao ser substituída 2 vezes por semana, por vezes verificou-se que estava em sobrelotação encontrando-se com zonas muito húmidas e conspurcadas, que possibilita a criação de um ambiente ideal para o crescimento destes organismos (Ward et al., 2002).

A baixa ocorrência de agentes contagiosos é um indício que são cumpridos os protocolos de higienização com base nas boas práticas de ordenha, de modo a controlar este tipo de agentes como já referido. Uma vez que estes apenas se multiplicam dentro da glândula mamária infetada e, a partir daí, pode ser transmitido de vaca para vaca durante a ordenha, através da própria máquina de ordenha, das mãos de ordenhadores ou até mesmo de panos de limpeza comuns (Todd et al., 2018).

Langoni et al., (2015) referem que esta situação se verifica em explorações a nível mundial, onde existem grandes infraestruturas com procedimentos de higiene e controlo de mastites rigorosos, originando um controlo mais eficiente da mastite contagiosa, que pode predispor a um aumento da prevalência de mastite ambiental. Os autores ainda realçam que a maioria destas explorações têm controlado principalmente as mastites causadas por *S. agalactiae* e *S. aureus*. Deste modo, poderá haver nesta exploração, uma subvalorização na prevalência de mastites subclínicas por agentes contagiosos, devido ao referido por Langoni et al., (2015), como também devido aos parâmetros usados na identificação de vacas com mastite subclínica através da CCS > 400.000/ml no contraste leiteiro e ausência de dados relativos à identificação etiológica em mastites clínicas.

Por outro lado, Bozzo et al., (2014) publicaram um estudo em que mostra que a ocorrência de mastites por *Prototheca* spp. está relacionada com problemas de higiene nos parques, como também está relacionada com as condições higiénicas do equipamento de ordenha. Apesar da fonte primária de um surto ser o meio ambiente, as glândulas infetadas têm um papel importante na disseminação do agente no efetivo leiteiro (Todd et al., 2018).

Streptococcus uberis pode ser disseminado entre os animais ou mesmo pelos ordenhadores e equipamentos de ordenha (Zadoks et al., 2002). Podemos assumir que tanto *Streptococcus uberis* como *Prototheca* spp. podem movimentar-se do ambiente para a vaca e posteriormente de vaca para vaca, comportando-se de forma contagiosa (Costa et al., 1997; Zadoks et al., 2002; Smith, 2015; Todd et al., 2018).

Embora exista uma maior ocorrência de agentes ambientais em relação aos agentes contagiosos em todos os trimestres, Costa et al., (1998) sugerem uma influência sazonal na ocorrência de mastite ambiental durante os meses de Setembro a Fevereiro devido ao clima húmido e quente nestes meses no hemisfério sul. A temperatura e a humidade são dois dos fatores que influenciam a multiplicação dos

microrganismos nos materiais de cama (Ward et al., 2002). A maior ocorrência entre Julho-Setembro é esperada, uma vez que a *Prototheca* spp. é encontrada com maior frequência em ambientes quentes, com bastante humidade e presença de matéria orgânica, estas condições que favorecem a sua multiplicação que por sua vez aumentam a o risco de infeção (Jánosil et al., 2001; Costa et al., 1998).

De acordo com Tenhagen et al. (1999), o risco de mastite aumenta com o aumento do número da paridade em vacas em lactação. Neste estudo, o grupo “quatro ou mais lactações” teve o menor registo de casos analisados com 12% dos casos (n=52), seguindo o grupo “uma lactação” com 18% (n=74), grupo “três lactações” com 29% (n=120) e por fim o grupo com maior frequência de casos analisados, grupo “duas lactações” com 40% (n=168). Concluimos que houve uma maior identificação de mastite subclínica no grupo de vacas em segunda lactação. Esta incongruência com o estudo de Tenhagen et al. (1999) poderá ser explicada pelo número médio de lactações no efetivo da exploração ser de duas lactações e o refugo prematuro de vacas cronicamente infetadas, que diminuí estatisticamente a ocorrência de infeções em animais mais velhos (Rösler & Hensel, 2003).

No estudo da prevalência de mastite sobre o quarto mamário verificou-se que os quartos posteriores são os que apresentam uma maior prevalência de mastite subclínica. Está em concordância com a literatura, uma vez que os quartos posteriores têm um risco maior de incidência de mastite (Blowey & Edmondson, 2010). *Prototheca* spp. foi o agente com maior ocorrência em todos os quartos mamários com pouca oscilação na distribuição da sua frequência.

7. CONCLUSÃO

Durante a realização deste estudo podemos concluir que existe uma maior ocorrência de mastites subclínicas ambientais não agudas do que mastites subclínicas contagiosas.

O que significa que a exploração adotou a maioria das práticas recomendadas para controlo de agentes contagiosos. No entanto, melhorias significativas podem ser alcançadas em relação ao controlo de agentes ambientais como a *Prototheca* spp.

Verificou-se uma relação entre a época do ano e agentes ambientais, mais especificamente as mastites por *Prototheca* spp, que teve uma maior frequência de casos isolados entre o início de Julho e o final de Setembro.

Neste estudo não se verificou um aumento de risco de mastite relacionado com o aumento da paridade nos animais testados. Contrariando o referido na revisão bibliográfica. Animais com duas lactações mostraram ter uma maior ocorrência de mastite subclínica. No entanto não podemos afirmar que esta situação é representativa da população uma vez que estes valores irão sempre depender do número de lactações média presentes no efetivo leiteiro da exploração.

Na relação entre os grupos de quartos mamários e os agentes etiológicos, não houve uma correlação estatisticamente significativa. Os quartos posteriores apresentaram um ligeiro aumento no número de casos isolados perante os quartos anteriores. Verificando-se a mesma situação quando feita a relação entre casos isolados com *Prototheca* spp. e os grupos de quartos.

A realização de um estudo com uma amostra maior, incluindo dados de mastites clínicas e com uma metodologia mais abrangente na identificação mastites subclínicas, seria de extrema importância. A metodologia utilizada limitou o estudo epidemiológico nesta exploração, uma vez que desprezou dados importantes, que poderiam alterar a prevalência de alguns agentes e que seriam úteis para estabelecer pontos críticos de intervenção como identificar fatores de risco presentes.

8. BIBLIOGRAFIA

- Bexiga, R., Cavaco, L. M., & Vilela, C. L. (2005). Mastites subclínicas bovinas na zona do Ribatejo-Oeste Subclinical bovine mastitis in the Ribatejo-Oeste area. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 100, 39–44.
- Bexiga, R., & Vilela, L. C. C. L. (2003). Isolamento de *Prototheca zopfii* a partir de leite bovino Isolation of *Prototheca zopfii* from bovine milk. *Medicina*, 98, 33–37.
- Blowey, R., & Edmondson, P. (2010). Mastitis control in dairy herds. (2a edição). In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9).
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Bozzo, G., Bonerba, E., Di Pinto, A., Bolzoni, G., Ceci, E., Mottola, A., Tantillo, G., & Terio, V. (2014). Occurrence of *Prototheca* spp. in cow milk samples. *New Microbiologica*, 37(4), 459–464.
- Bueno, V. F. F., De Mesquita, A. J., Neves, R. B. S., De Souza, M. A., Ribeiro, A. R., Nicolau, E. S., & De Oliveira, A. N. (2006). Epidemiological and clinical aspects of the first outbreak of bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii* in Goiás State, Brazil. *Mycopathologia*, 161(3), 141–145. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0145-8>
- Bueno, V., Mesquita, A., Neves, R., Souza, M., Ribeiro, A., Nicolau, E., & Oliveira, A. (2006). Epidemiological and Clinical Aspects of the First Outbreak of Bovine Mastitis Caused by *Prototheca zopfii* in Goiás State, Brazil. *Mycopathologia*, 161, 141–145. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0145-8>
- Buzzini, P., Turchetti, B., Facelli, R., Baudino, R., Cavarero, F., & Mattalia, L. (2004). *First large-scale isolation of Prototheca zopfii from milk produced by dairy herds in Italy*. 427–430.
- Buzzini, Pietro, Menichetti, S., Pagliuca, C., Viglianisi, C., Branda, E., & Turchetti, B. (2008). Antimycotic activity of 4-thioisosteres of flavonoids towards yeast and yeast-like microorganisms. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18(13), 3731–3733. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.05.048>
- Byrne, W. J., Ball, H. J., Brice, N., McCormack, R., Baker, S. E., Ayling, R. D., & Nicholas, R. A. J. (2000). Application of an indirect ELISA to milk samples to identify cows with *Mycoplasma bovis* mastitis. *Veterinary Record*, 146(13), 368–369. <https://doi.org/10.1136/vr.146.13.368>
- Casal, M., Solis, F., & Gonzalez, J. M. (1984). *Department o/Microbiology, Cordoba University, School oJ Medicine, Cordoba (Spain)*. 359–362.
- Coentrão, C. M., Souza, G. N., Brito, J. R. F., Paiva E Brito, M. A. V., & Lilenbaum, W.

- (2008). Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60(2), 283–288.
<https://doi.org/10.1590/S0102-09352008000200001>
- Constable, P. D., Hinchcliff, K. W., Done, S. H., & Grünberg, W. (2017). Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses, 11th edition. In *British Veterinary Journal* (Vol. 145, Issue 5).
[https://doi.org/10.1016/0007-1935\(89\)90064-x](https://doi.org/10.1016/0007-1935(89)90064-x)
- Costa, E. O., Melville, P. A., Ribeiro, A. R., Watanabe, E. T., & Parolari, M. C. F. F. (1997). Epidemiologic study of environmental sources in a *Prototheca zopfii* outbreak of bovine mastitis. *Mycopathologia*, 137(1), 33–36.
<https://doi.org/10.1023/A:1006871213521>
- Costa, E. O., Ribeiro, A. R., Watanabe, E. T., & Melville, P. A. (1998). Infectious Bovine Mastitis Caused by Environmental Organisms. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 45(2), 65–71. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1998.tb00768.x>
- Costa, E. O., Carvalho, V. M., Coutinho, S. D., Castilho, W., & Caramori, L. F. L. (1985). *Corynebacterium bovis* e sua importância na etiologia da mastite bovina no Estado de São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 5(4), 117–120.
- Da Costa, Elizabeth Oliveira, Ribeiro, M., Ribeiro, A. R., Rocha, N. S., & Júnior, G. D. N. (2004). Diagnosis of clinical bovine mastitis by fine needle aspiration followed by staining and scanning electron microscopy in a *Prototheca zopfii* outbreak. *Mycopathologia*, 158(1), 81–85.
<https://doi.org/10.1023/B:MYCO.0000038423.49445.ff>
- De Vlieghe, S., Fox, L. K., Piepers, S., McDougall, S., & Barkema, H. W. (2012). Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *Journal of Dairy Science*, 95(3), 1025–1040.
<https://doi.org/10.3168/jds.2010-4074>
- Erskine, R. J. (2016b). Overview of Mastitis in Large Animals - Reproductive System - Veterinary Manual. Obtido a 7 de Julho de 2020, de <https://www.msdsvetmanual.com/reproductive-system/mastitis-in-largeanimals/overview-of-mastitis-in-large-animals#resourcesInArticle>
- Gonzalez, R. N. (1996). *Prototheca*, Yeast, and *Bacillus* as a Cause of Mastitis. *National Mastitis Council Annual Meeting*, 8, 82–90.
- Guillamon, J. M., Sabat, J., Barrio, E., Cano, J., & Querol, A. (1998). Isolation Rapid Identification of Wine Yeasts using RFLP analysis. *Arch. Microbiol.*, 387–392.
- Henrique, P., Gasparotto, G., & Bicalho, B. (2016). Principais Gêneros Bacterianos Causadores De Mastite Isolados No Laboratório De Microbiologia Veterinária Na Clínica Escola De Medicina Veterinária Do Centro Universitário Luterano De Ji-

- Paraná-Ro. *Revista Veterinária Em Foco*, 14(1), 60–74.
- Hodges, R. T., Holland, J. T. S., Neilsont, F. J. A., & Wallace, N. M. (1985). Prototheca zopfii mastitis in a herd of dairy cows. *New Zealand Veterinary Journal*, 33(7), 108–111. <https://doi.org/10.1080/00480169.1985.35187>
- Hogan, J., & Smith, K. L. (2003). Coliform mastitis. *Veterinary Research*, 34(5–6), 507–519. <https://doi.org/10.1051/vetres>
- Hogan, J., & Smith, K. L. (2012). Managing Environmental Mastitis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 28(2), 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.009>
- IPMA. (2018). IPMA - Mapa sismicidade. Obtido a 14 de Outubro de 2018, de <http://www.ipma.pt/pt/oclima/normais.clima/>
- Islam, M., Rahman, A., Rony, S., & Islam, M. (2012). Prevalence and Risk Factors of Mastitis in Lactating Dairy Cows At Baghabari Milk Shed Area of Sirajganj. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 8(2), 157–162. <https://doi.org/10.3329/bjvm.v8i2.11200>
- Jagielski, T., Roeske, K., Bakula, Z., Piech, T., Wlazlo, Ł., Bochniarz, M., Woch, P., & Krukowski, H. (2019). A survey on the incidence of Prototheca mastitis in dairy herds in Lublin province, Poland. *Journal of Dairy Science*, 102(1), 619–628. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15495>
- Jánosi, S., Rátz, F., Szigeti, G., Kulcsár, M., Huszenicza, G., Kerényi, J., Katona, F., & Laukó, T. (2001). Review of the microbiological, pathological, and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga prototheca zopfii. *Veterinary Quarterly*, 23(2), 58–61. <https://doi.org/10.1080/01652176.2001.9695082>
- Jánosil, S., Szigeti, G., Rátz, F., Tenk, M., Kerényi, J., Laukó, T., Katona, F., Huszenicza, A., Kulcsár, M., & Huszenicza, G. (2001). Prototheca zopfii mastitis in dairy herds under continental climatic conditions. *Veterinary Quarterly*, 23(2), 80–83. <https://doi.org/10.1080/01652176.2001.9695087>
- Krüger W. (1894). Kurze Charakteristik einiger niederer Organismen im Saftflusse. *Hedwigia*, 33, 241–266.
- Langoni H, Guimarães F.F, Salina A., Ribeiro M.G, Baio P.V.P, Ramos J.N, Mota H.F, Vieira V.V, and M.-G. A. L. (2016). Molecular Characterization of Corynebacterium bovis causing Clinical Mastitis and Increasing Somatic-Cell Count. *International Journal of Advanced Veterinary Science and Technology*, 5(1), 248–255. <https://doi.org/10.23953/cloud.ijavst.172>
- Langoni, H. (2013). *Qualidade do leite : utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina 1*. 33(5), 620–626.
- Langoni, H., Guiduce, M. V. S., Nóbrega, D. B., Da Silva, R. C., Richini-Pereira, V. B.,

- Salina, A., & Guimarães, F. D. F. (2015). Research of *Klebsiella pneumoniae* in dairy herds. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 35(1), 9–12.
<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000100003>
- Langoni, H., Salina, A., Oliveira, G. C., Junqueira, N. B., Menozzi, B. D., & Joaquim, S. F. (2017). Considerações sobre o tratamento das mastites1. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 37(11), 1261–1269. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2017001100011>
- Lee, N. Y., Kawai, K., Nakamura, I., Tanaka, T., Kumura, H., & Shimazaki, K. I. (2004). Susceptibilities against bovine lactoferrin with microorganisms isolated from mastitic milk. *Journal of Veterinary Medical Science*, 66(10), 1267–1269.
<https://doi.org/10.1292/jvms.66.1267>
- Malinowski, E., Lassa, H., & Kłossowska, A. (2002). Isolation of *Prototheca zopfii* from inflamed secretion of udders. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 46(2), 295–299.
- MARQUES, S. A. D. B. C. (2010). *Protothecosis: Agent Characterization and*.
- Marques, S., Silva, E., Carvalheira, J., & Thompson, G. (2006). Short communication: In vitro antimicrobial susceptibility of *Prototheca wickerhamii* and *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 89(11), 4202–4204.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72465-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72465-1)
- Marques, S., Silva, E., Carvalheira, J., & Thompson, G. (2010). Short communication: Temperature sensibility of *Prototheca blaschkeae* strains isolated from bovine mastitic milk. *Journal of Dairy Science*, 93(11), 5110–5113.
<https://doi.org/10.3168/jds.2010-3249>
- Marques, Sara, Silva, E., Kraft, C., Carvalheira, J., Videira, A., Huss, V. A. R., & Thompson, G. (2008). Bovine mastitis associated with *Prototheca blaschkeae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(6), 1941–1945.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00323-08>
- Marwa, M. N. E., & Lamiaa, M. T. A. L. I. E. (2013). *INCIDENCE OF PROTOTHECA SPP. IN MILK PRODUCED BY DAIRY HERDS IN ASSIUT CITY*. 59(137), 171–179.
- Melville, P. A., Benites, N. R., Sinhorini, I. L., & Costa, E. O. (2003). Susceptibility and features of the ultrastructure of *Prototheca zopfii* following exposure to copper sulphate, silver nitrate and chlorexidine. *Mycopathologia*, 156(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1023/A:1021313118632>
- Melville, Priscilla A., Watanabe, E. T., Benites, N. R., Ribeiro, A. R., Silva, J. A. B., Garino, F., & Costa, E. O. (1999). Evaluation of the susceptibility of *Prototheca zopfii* to milk pasteurization. *Mycopathologia*, 146(2), 79–82.
<https://doi.org/10.1023/A:1007005729711>

- Mohabeer, A. J., Kaplan, P. J., Southern, J., & Gander, R. M. (1997). Algaemia due to *Prototheca wickerhamii* in a patient with myasthenia gravis. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(12), 3305–3307. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.12.3305-3307.1997>
- Morandi, S., Cremonesi, P., Capra, E., Silvetti, T., Decimo, M., Bianchini, V., Alves, A. C., Vargas, A. C., Costa, G. M., Ribeiro, M. G., & Brasca, M. (2016). Molecular typing and differences in biofilm formation and antibiotic susceptibilities among *Prototheca* strains isolated in Italy and Brazil. *Journal of Dairy Science*, 99(8). <https://doi.org/10.3168/jds.2016-10900>
- Nicholas, R. A. J., & Ayling, R. D. (2003). *Mycoplasma bovis*: Disease, diagnosis, and control. *Research in Veterinary Science*, 74(2), 105–112. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(02\)00155-8](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(02)00155-8)
- Pfützner, H., & Sachse, K. (1996). *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 15(4), 1477–1494. <https://doi.org/10.20506/rst.15.4.987>
- Picoli, T., Zani, J. L., Da Silva Bandeira, F., Roll, V. F. B., Ribeiro, M. E. R., Vargas, G. D. Á., Hübner, S. O., De Lima, M., Meireles, M. C. A., & Fischer, G. (2014). Maneio de ordenha como fator de risco na ocorrência de micro-organismos em leite cru. *Semina: Ciências Agrárias*, 35(4), 2471–2480. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n4Suplp2471>
- Pieper, L., Godkin, A., Roesler, U., Polleichtner, A., Slavic, D., Leslie, K. E., & Kelton, D. F. (2012). Herd characteristics and cow-level factors associated with *Prototheca* mastitis on dairy farms in Ontario, Canada. *Journal of Dairy Science*, 95(10), 5635–5644. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5106>
- Pitkälä, A., Haveri, M., Pyörälä, S., Myllys, V., & Honkanen-Buzalski, T. (2004). Bovine mastitis in Finland 2001 - Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *Journal of Dairy Science*, 87(8), 2433–2441. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73366-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73366-4)
- Pore, R. S., Barnett, E. A., Barnes, W. C., & Walker, J. D. (1983). *Prototheca* ecology. *Mycopathologia*, 81(1), 49–62. <https://doi.org/10.1007/BF00443909>
- Riekerink, R. G. M. O., Barkema, H. W., Kelton, D. F., & Scholl, D. T. (2008). Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 91(4), 1366–1377. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0757>
- Rinaldi, M., Li, R. W., Bannerman, D. D., Daniels, K. M., Evock-Clover, C., Silva, M. V. B., Paape, M. J., Van Ryssen, B., Burvenich, C., & Capuco, A. V. (2010). A sentinel function for teat tissues in dairy cows: Dominant innate immune response elements define early response to *E. coli* mastitis. *Functional and Integrative*

- Genomics*, 10(1), 21–38. <https://doi.org/10.1007/s10142-009-0133-z>
- Roesler, U., Scholz, H., & Hensel, A. (2001). Immunodiagnostic identification of dairy cows infected with *Prototheca zopfii* at various clinical stages and discrimination between infected and uninfected cows. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2), 539–543. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.2.539-543.2001>
- Roesler, Uwe, & Hensel, A. (2003). Longitudinal analysis of *Prototheca zopfii*-specific immune responses: Correlation with disease progression and carriage in dairy cows. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(3), 1181–1186. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.3.1181-1186.2003>
- Roesler, Uwe, Scholz, H., & Hensel, A. (2003). Emended phenotypic characterization of *Prototheca zopfii*: A proposal for three biotypes and standards for their identification. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(4), 1195–1199. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02556-0>
- Rösler, U., & Hensel, A. (2003). Eradication of *Prototheca zopfii*-infection in a dairy cattle herd. *DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 110, 374–377.
- Salerno, T., Ribeiro, M. G., Langoni, H., Siqueira, A. K., Costa, E. O. da, Melville, P. A., Bueno, V. F. F., Yamamura, A. A. M., Roesler, U., & Silva, A. V. da. (2010). In vitro algacide effect of sodium hypochlorite and iodine based antiseptics on *Prototheca zopfii* strains isolated from bovine milk. *Research in Veterinary Science*, 88(2), 211–213. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.08.001>
- Schwarz, D., Diesterbeck, U. S., König, S., Brügemann, K., Schlez, K., Zschöck, M., Wolter, W., & Czerny, C. P. (2011). Flow cytometric differential cell counts in milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science*, 94(10), 5033–5044. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4348>
- Shahid, M., Wang, J., Gu, X., Chen, W., Ali, T., Gao, J., Han, D., Yang, R., Fanning, S., & Han, B. (2017). *Prototheca zopfii* induced ultrastructural features associated with apoptosis in bovine mammary epithelial cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(JUL), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00299>
- Smith, B. P. (2015). *Large animal internal medicine / editor in chief, Bradford P. Smith.—Fifth edition.*
- Sobukawa, H., Kano, R., Ito, T., Onozaki, M., Makimura, K., Hasegawa, A., & Kamata, H. (2011). In vitro susceptibility of *Prototheca zopfii* genotypes 1 and 2. *Medical Mycology*, 49(2), 222–224. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.511285>
- Taniyama, H., Okamoto, F., Kurosawa, T., Furuoka, H., Kaji, Y., Okada, H., & Matsukawa, K. (1994). Disseminated Protothccosis Caused by *Prototheca zopfii* in a Cow. *Veterinary Pathology*, 31(1), 123–125.

<https://doi.org/10.1177/030098589403100120>

- Taponen, S., & Pyörälä, S. (2009). Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis-Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Veterinary Microbiology*, 134(1–2), 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.011>
- Teixeira, P., Ribeiro, C., & Simões, J. (2008). *Prevenção de Mastites em Exploração de Bovinos Leiteiros Da Teoria à Prática*. 60.
- Tenhagen, B. A., Kalbe, P., Klünder, G., Heuwieser, W., & Baumgärtner, B. (1999). [Individual animal risk factors for Prototheca mastitis in cattle]. *DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 106(9), 376–380.
<http://europepmc.org/abstract/MED/10547928>
- Thompson, G., Silva, E., Marques, S., Mller, A., & Carvalheira, J. (2009). Algaemia in a dairy cow by *Prototheca blaschkeae*. *Medical Mycology*, 47(5), 527–531.
<https://doi.org/10.1080/13693780802566341>
- Todd, J. R., Matsumoto, T., Ueno, R., Murugaiyan, J., Britten, A., King, J. W., Odaka, Y., Oberle, A., Weise, C., Roesler, U., & Pore, R. S. (2018). Medical phycology 2017. *Medical Mycology*, 56(1), S188–S204. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx162>
- Wilson, D. J., Gonzalez, R. N., Southwick, L. H., & Guard, C. L. (2000). Evaluation of an experimental milking pulsation system for effects on milking and udder health. *Journal of Dairy Science*, 83(9), 2004–2007. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75078-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75078-8)
- Zadoks, R. N., Allore, H. G., Barkema, H. W., Sampimon, O. C., Gröhn, Y. T., & Schukken, Y. H. (2001). Analysis of an outbreak of *Streptococcus uberis* mastitis. *Journal of Dairy Science*, 84(3), 590–599. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74512-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74512-2)
- Zadoks, R. N., Gillespie, B. E., Barkema, H. W., Sampimon, O. C., Oliver, S. P., & Schukken, Y. H. (2003). Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. *Epidemiology and Infection*, 130(2), 335–349. <https://doi.org/10.1017/S0950268802008221>

9. APÊNDICES

Apêndice 1 - Entidades clínicas acompanhadas durante o estágio.

Afeção clínica		Frequência Absoluta	Frequência Relativa
Sistema Urinário			
	Onfalites	2	1%
	Hérnias Umbilicais	4	2%
	Cetonúria	5	2%
Sistema Reprodutivo / Obstetrícia / Mamário			
	Metrite Puerperal	8	3%
	Retenção Placentária	4	2%
	Prolapso Uterino	5	2%
	Laceração vulvar pós-parto	3	1%
	Mastites Clínicas	14	6%
	Piômetra	11	4%
Sistema Digestivo			
	Deslocamento de abomaso à direita (DAD)	1	0%
	Deslocamento de abomaso à esquerda (DAE)	4	2%
	Diarreia Neonatal	41	16%
	Úlcera Abomasal	2	1%
	Timpanismo Ruminal	1	0%
	Clostridiose	2	1%
Sistema Metabólico			
	Hipocalcémia	11	4%
	Cetose	2	1%
	Toxémia de gestação	2	1%
	Síndrome da vaca caída	4	2%
Sistema Musculo / Esquelético e Podologia			
	Panarício	5	2%
	Dermatites (digital e interdigital)	28	11%
	Úlcera da Pinça	11	4%
	Úlcera da Sola	14	6%
	Tiloma	4	2%
	Abcessos	6	2%
	Doença da Linha Branca	9	4%
Sistema Respiratório			
	Pneumonia em Vitelos	34	14%
	Pneumonia em Vacas	8	3%
	Reticulopericardite Traumática	2	1%
Total		247	100%

Apêndice 2 - Atividades desenvolvidas durante o estágio.

Atividades Práticas	Frequência
Exame clínico	>100
Administração de fármacos e fluidos por via oral, endovenosa, subcutânea, intramuscular e tópica	>100
Colheita de sangue para hemograma e pesquisa de endoparasitas	>100
Colocação de cateteres	>10
Entubação oroesofágica	>10
Entubação nasoesofágica	>1
Alimentação de recém-nascidos (coloostro)	>50
Punção e drenagem de abscessos	>10
Tratamento de traumatismos cutâneos / Aplicação de pensos	>25
Aparagem funcional e curativa de úngulas	>50
Amputação da Unha	>1
Descorna química (pasta), física (com fio de serra)	>50
Aplicação de brincos	>50
Abomasopexia (DAE)	>1
Inseminação artificial	>10
Diagnóstico de Gestação	>100
Protocolo para Sincronização de estro	>100
Resolução de partos distócicos	>50
Vacinação (vitelos e vacas)	>100
Colheita de sangue	>100
Teste tuberculina	>10
Análise e interpretação de resultados do contraste leiteiro	>10
Teste Californiano de Mastites (TCM)	>50
Recolha e processamento laboratorial de amostras de leite para pesquisa de agentes patogênicos de mastite	>25
Análise coloostro	>25
Ordenha	>1
Eutanásia	>1
Necrópsia	>1