

**MARIANA AUGUSTA DE BRITO DE ABREU
PEREIRA COUTINHO**

**AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE CONTAGENS DE
CÉLULAS SOMÁTICAS E OS AGENTES MAIS
PREVALENTES DE MASTITE EM EXPLORAÇÕES
LEITEIRAS DA REGIÃO DE ENTRE DOURO E VOUGA**

Orientador: Professor Doutor João Cannas da Silva

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

**Lisboa
2014**

**MARIANA AUGUSTA DE BRITO DE ABREU
PEREIRA COUTINHO**

**AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE CONTAGENS DE
CÉLULAS SOMÁTICAS E OS AGENTES MAIS
PREVALENTES DE MASTITE EM EXPLORAÇÕES
LEITEIRAS DA REGIÃO DE ENTRE DOURO E VOUGA**

**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**

**Orientador: Professor Doutor João Cannas da Silva
Co-Orientadora: Mestre Diana Margarida Jacinto**

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

Lisboa

2014

« The efficient production of wholesome milk is the primary mission of a dairy farm. Mammary gland health is essential for maximizing milk production and farm profitability. »

Bradford P. Smith

Ao avô Zeca, que Deus o tenha.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, por todo o apoio e paciência ao longo dos anos de faculdade e nesta recta final.

À “família” Proleite por tão bem me receberem, em especial ao Dr. António Esteves, Dr. Manuel Pinheiro, Dr. Júlio Nascimento, Dr. José Vilela, Sr. Nobre, Sr. Dias, Sr. Leonel e Patrícia. Muito obrigada!

À tia Delfina, tia Mafalda, tio Zé Guilherme e primos por me aturarem.

À tia Lai e ao tio Zezinho.

À Maria, por me receber tão bem.

Ao Nuno, pela paciência e força que me tem dado.

Aos meus amigos que sempre me apoiam.

Aos meus companheiros de faculdade Xico Maia, Ana Cláudia, Ana Ferreira de Lemos, Béu e Ita.

À professora Diana Jacinto por todo apoio e paciência.

Ao professor Mauro Bragança pela preciosa ajuda.

Ao professor doutor João Cannas da Silva por ter aceitado ser meu orientador.

A todos os professores que sempre, com muita paciência, me ensinaram a ser Médica Veterinária.

RESUMO

Quando um microrganismo patogénico invade a glândula mamária, através do canal do teto, pode ocorrer infecção intramamária, desencadeando uma resposta inflamatória – a mastite. Esta possui diversas etiologias, sendo normalmente de origem bacteriana. Na resposta inflamatória, actuam as células somáticas presentes no leite.

O presente estudo teve como principal objectivo avaliar a relação entre as contagens de células somáticas e os agentes causadores de mastite em amostras de leite.

Foram utilizados dados referentes aos resultados de análises de leite para diagnóstico de mastite realizadas em amostras de explorações de Entre Douro e Vouga. Os resultados consistem em identificação dos agentes e respectivo antibiograma, CCS, sendo ainda registado o objectivo da análise (Secagem ou Tratamento).

Determinaram-se as prevalências dos agentes, avaliando de seguida a relação entre as seguintes variáveis: agentes e CCS; CCS e objectivo da análise; e entre agentes e objectivo da análise.

Concluiu-se que os *Staphylococcus* coagulase-negativa são os mais prevalentes, 14,5%, seguindo, *Streptococcus uberis*, 7,6%; *Escherichia coli*, 6,3%; *Lactococcus garviae*, 5,8% e *Staphylococcus aureus*, 4,1%. Concluiu-se ainda, a existência de diferenças estatisticamente significativas nas análises realizadas, confirmando a relação entre as demais variáveis.

Palavras-chave: Mastites, CCS, Entre Douro e Vouga

ABSTRACT

When a pathogen invades the mammary gland through the teat canal, intramammary infection may occur, triggering an inflammatory reaction – the mastitis. It may have several etiologies, but the bacterial origin is usually the most common. In the inflammatory response, the somatic cells present in milk take action, trying to protect the mammary gland.

The aim of this study was to evaluate the relation between somatic cell counts and the causative agents of mastitis in milk samples.

There was used data referring to the results of milk analysis to diagnose mastitis performed on samples from farms of the Entre Douro e Vouga region. The results consist in identifying agents and their antibiotic sensitivity, CCS, yet being registered the purpose of the analysis (Drying therapy or Treatment).

The prevalence of the agents was first determined, and after, assessed the relation among agents and CCS; CCS and analysis's objective; and between agents and analysis's objective.

It was concluded that the coagulase-negative Staphylococci are the most prevalent bacteria, 14.5%, followed by, *Streptococcus uberis*, 7.6%, *Escherichia coli*, 6.3%; *Lactococcus garviae*, 5.8% and *Staphylococcus aureus* 4.1%. In addition, it was, also, concluded, the existence of statistically significant differences, confirming the relationship between the variables.

Key-words: Mastitis, SCC, Entre Douro e Vouga

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS – Albumina Sérica Bovina
DNA – Ácido desoxirribonucleico
ASB – Amilóide A Sérica
ATP – Adenosina Trifosfato
CCS – Contagem de células somáticas
CE – Condutividade elétrica
Cél/ml – Células por mililitro de leite
C3 – componente do complemento C3
C3b – componente do complemento C3b
C5a – componente do complemento C5a
GM-CSF – Factor estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos
H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio
IgG₂ – Imunoglobulina G₂
IgM – Imunoglobulina M
IIM – Infecção intramamária
IL-1 β – Interleucina 1 β
IL-8 – Interleucina 8
LPS – Lipopolossacarídeos
NAGase – N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase
NIDR – National Institute for Research in Dairyng
NK – Natural Killer
NMC – National Mastitis Council
PCR – Polymerase Chain Reaction
PCR-SSCP – Polymerase Chain Reaction - Single Strand Conformation Polymorphism
SOA - Sistema de ordenha automática
VR – Valor de referência
TCM – Teste Californiano de Mastites
TIV – Termografia Infravermelha
TNF- α – Factor de necrose tumoral α

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. ANATOMIA E FISIOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA	12
1.1.1. Mecanismos de defesa da glândula mamária	14
1.2. MASTITE - Definição	14
1.2.1. Patogénese e fisiopatologia	15
1.3. ETIOLOGIA	17
1.3.1. Agentes contagiosos	18
1.3.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	18
1.3.1.2. <i>Streptococcus agalactiae</i>	19
1.3.1.3. <i>Mycoplasma</i> spp.....	19
1.3.1.4. <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa	20
1.3.2. Agentes ambientais.....	20
1.3.2.1. <i>Streptococcus uberis</i>	20
1.3.2.2. <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	21
1.3.2.3. Coliformes.....	21
1.4. FACTORES DE RISCO PARA A OCORRÊNCIA DE MASTITE.....	22
1.4.1. Factores de risco associados ao animal	22
1.4.1.1. Idade e número de partos	22
1.4.1.2. Período de lactação.....	22
1.4.1.3. Morfologia do úbere e tetos	22
1.4.1.4. Genética.....	23
1.4.2. Factores de risco associados ao meio ambiente.....	23
1.4.2.1. Condições de estabulação e ocorrência de mastite.....	23
1.4.2.2. Práticas de ordenha.....	24
1.5. DIAGNÓSTICO	25
1.5.1. Contagem de células somáticas	25

1.5.1.1.	Tipo de amostra.....	26
1.5.1.2.	Métodos de contagem.....	26
1.5.1.3.	Valor de referência	26
1.5.1.4.	Factores que influenciam a CCS	27
1.5.2.	Cultura microbiológica	29
1.5.2.1.	Tipo de amostra.....	29
1.5.2.2.	Interpretação dos resultados	31
1.5.3.	Teste californiano de mastites	32
1.5.4.	Condutividade eléctrica	32
1.5.5.	Enzimas	33
1.5.5.1.	N-cetyl-β-D-Glucosaminidase	33
1.5.6.	Proteínas da fase aguda da inflamação	34
1.5.6.1.	Albumina sérica bovina e antitripsina.....	34
1.5.6.2.	Haptoglobina e Amiloide A sérica	34
1.5.7.	Outros indicadores de inflamação	35
1.5.7.1.	Adenosina Trifosfato.....	35
1.5.7.2.	Lactose	35
1.5.8.	Polymerase chain reaction (PCR).....	35
1.5.9.	Termografia infravermelha.....	36
1.6.	Tratamento	37
1.7.	CONTROLO E PREVENÇÃO DA MASTITE	38
1.7.1.	Plano de controlo do NMC.....	39
1.8.	IMPACTO ECONÓMICO DA MASTITE	42
2.	OBJECTIVOS	44
3.	MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1.	RECOLHA DE DADOS	45
3.1.1.	Fonte de dados.....	45

3.1.2.	Informatização dos dados	45
3.2.	SELECÇÃO DA AMOSTRA	45
3.3.	ANÁLISE DA AMOSTRA EM ESTUDO	46
3.3.1.	Prevalência dos agentes	46
3.3.2.	Relações entre CCS e os agentes e entre CCS e objectivo da análise	46
3.4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
4.	RESULTADOS	47
4.1.	PREVALÊNCIAS	47
4.2.	RELAÇÃO ENTRE CCS E OS AGENTES	47
4.3.	RELAÇÃO ENTRE CCS E O OBJECTIVO DA ANÁLISE	48
4.4.	RELAÇÃO ENTRE OS AGENTES E O OBJECTIVO DA ANÁLISE	49
5.	DISCUSSÃO DE RESULTADOS	51
6.	CONCLUSÃO	56
7.	BIBLIOGRAFIA.....	57
APÊNDICES		I
Apêndice I.....		II
Apêndice II		III

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Influência de práticas de higiene na ordenha na ocorrência de novas infecções ...	24
Gráfico 2 – Bactérias mais prevalentes e respectiva prevalência.	47
Gráfico 3 – Comparação entre as CCS dos sete agentes mais prevalentes de mastite	48
Gráfico 4 - Comparação das médias das CCS entre vacas para Secagem e para Tratamento..	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Organização estrutural e histológica da glândula mamária bovina	13
--	----

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos agentes bacterianos	18
Tabela 2 - Diferenças entre práticas de higiene completa, parcial e a sua ausência.	25
Tabela 3 – Agentes bacterianos e respectivos tratamento e resposta.	38
Tabela 4 – Resumo dos resultados do estudo	50

1. INTRODUÇÃO

A indústria leiteira caracteriza-se por elevadas produções que, consequentemente, levam a uma exploração exaustiva dos animais e a diversas patologias resultantes dessa mesma exploração.

Uma das patologias de maior importância nas explorações leiteiras é a mastite e, como tal, é importante conhecê-la e estudá-la nas suas diferentes vertentes e em todos os factores intervenientes.

Quando um agente patogénico entra no canal mamário e se multiplica no leite, é iniciada uma resposta inflamatória da qual resulta a mastite (Smith, 2009).

Desde há muitos anos existe a preocupação com esta enfermidade. Em Vieira de Sá & Vieira de Sá (1946) podem encontrar-se as seguintes definições:

“Mamite (inflamação do úbere) – é caracterizada pela vermelhidão, calor e aumento de volume do úbere (...) sobrevivendo também, por vezes, a febre (...) Em casos mais complicados, com tumores cheios de pus, o melhor é chamar o veterinário.”

“Mamite estreptocócica – muito espalhada nas raças leiteiras, atinge uma percentagem elevada, não determinada concretamente em Portugal. É uma mamite motivada por um agente específico o «*Streptococcus mastiditis*». A sua gravidade é devida à diminuição da produção de leite a que dá origem (...) aliado a uma alta contagiosidade.”

Na presente dissertação, irá avaliar-se a relação entre as contagens de células somáticas e os agentes causadores de mastite, informação que pode ser relevante para o manejo desta tão importante enfermidade deste sector.

1.1. ANATOMIA E FISIOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA

O conhecimento da anatomia e fisiologia é importante, para a total compreensão da patofisiologia das doenças que podem afectar a glândula mamária (Smith, 2009). Além disso, as características funcionais e anatómicas dos tetos podem ter uma influência considerável na secreção de leite (Weiss *et al.*, 2004).

A glândula mamária de uma vaca adulta é constituída por quatro quartos, cada um contendo um teto, sendo a estrutura resultante denominada úbere. Cada teto faz a drenagem do quarto correspondente (Cunningham, 2004; Andrews *et al.*, 2008; Smith, 2009).

Histologicamente, a glândula mamária é uma glândula exócrina, destinada à secreção de leite. É constituída por células epiteliais que se organizam em estruturas circulares e saculares, os alvéolos, a unidade funcional (Cunningham, 2004; Andrews *et al.*, 2008). Cada

alvéolo possui um lúmen central (Smith, 2009). Os alvéolos adjacentes formam grupos, os lóbulos, que por sua vez são associados em estruturas maiores, os lobos. Os lóbulos e os lobos estão envoltos e ligados por bandas de tecido conjuntivo (Cunningham, 2004). Uma fração do leite sintetizado é drenada dos alvéolos, através de ductos, para ser armazenada nas cisternas do úbere. Outra fração fica armazenada nos alvéolos até a sua ejeção (Smith, 2009) representando esta, a maior parte do leite excretado no período da ordenha (Cunningham, 2004).

Devido à grande quantidade de leite armazenado, o úbere pode atingir pesos de 25 quilogramas (Cunningham, 2004), ou até mesmo de 50 a 60 quilogramas (Andrews *et al.*, 2008). Para suportar estes elevados pesos, possui o sistema suspensor, constituído pelos ligamentos suspensores, de tecido fibroso, e pelos tendões da parede abdominal (Cunningham, 2004; Andrews *et al.*, 2008). Este sistema é de extrema importância, uma vez que sem a sua existência, o sistema da glândula mamária entraria rapidamente em falência devido ao elevado peso (Cunningham, 2004).

O teto é uma das estruturas fundamentais da glândula mamária, tendo um papel fundamental na sua protecção. Possui um esfíncter de tecido musculoesquelético, a Roseta de Furstenberg, e um epitélio estratificado escamoso com produção de queratina (Andrews *et al.*, 2008; Smith, 2009).

Na Figura 1, pode ver-se a organização estrutural e histológica da glândula mamária bovina.

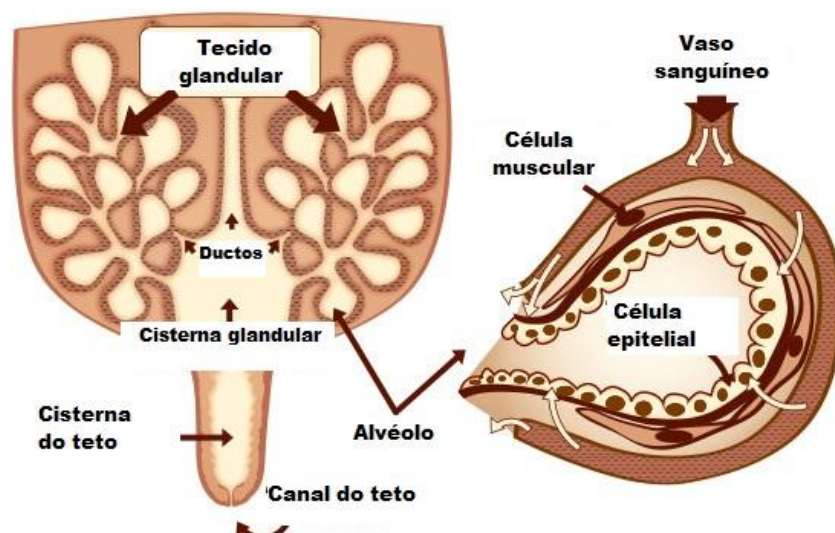


Figura 1 - Organização estrutural e histológica da glândula mamária bovina ¹

¹ Adaptado de: <http://www.prenareuogenetica.com/importancia-del-secado-en-las-vacas/>

1.1.1. Mecanismos de defesa da glândula mamária

Diversos tipos de mecanismos compõem a defesa da glândula mamária em resposta a uma infecção, para que o animal possa retornar à sua normal produção (Kehrli Jr. *et al.*, 1994; Smith, 2009).

O canal e pele dos tetos constituem uma primeira linha de defesa, como uma barreira física e mecânica. O esfíncter de tecido musculoesquelético impede a entrada de microrganismos patogénicos e as perdas de leite. O epitélio estratificado escamoso, a forma tortuosa e a queratina, concedem-lhe, ainda, mais protecção física contra potenciais infecções (Andrews *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008; Smith, 2009).

O canal do teto possui, ainda, outras propriedades antimicrobianas devido a algumas substâncias que em si são produzidas e/ou estão presentes. A queratina produzida pelo epitélio contém ácidos gordos e proteínas que podem contribuir para a defesa da glândula, embora ainda não esteja totalmente provado a nível científico (Andrews *et al.*, 2008; Smith, 2009).

Caso a primeira linha de defesa não seja efectiva, actua a segunda linha de defesa, constituída por diferentes tipos de leucócitos e células epiteliais da glândula mamária: as células somáticas (Andrews *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008; Smith, 2009).

1.2. MASTITE - Definição

Quando um microrganismo patogénico invade a glândula mamária, através do canal do teto, pode ocorrer infecção intramamária (IIM), o que desencadeia uma resposta inflamatória: a mastite (Smith, 2009; De Vliegher *et al.*, 2012). A mastite consiste, então, na inflamação do parênquima da glândula mamária, podendo ter diversas etiologias (Radostits *et al.*, 2002).

A mastite pode apresentar-se como subclínica, caso o animal afectado não apresente sinais visíveis (Djabri *et al.*, 2002; Windig *et al.*, 2010; De Vliegher *et al.*, 2012), sendo detectada apenas com o uso de testes de diagnóstico (Djabri *et al.*, 2002; Andrews *et al.*, 2008; Windig *et al.*, 2010). No entanto, verifica-se uma diminuição da produção e alteração na composição do leite (Smith, 2009). Esta forma subclínica, pode manter-se ou evoluir para a forma clínica, em que são visíveis sinais locais e/ou sistémicos (Djabri *et al.*, 2002; Andrews *et al.*, 2008; De Vliegher *et al.*, 2012). Os sinais clínicos podem consistir em edema e endurecimento de glândula mamária, dor local e elevação da temperatura, presença de coágulos no leite, alteração da secreção dos tetos afectados e sinais sistémicos. (Radostits *et al.*, 2002; Andrews *et al.*, 2008; Smith, 2009).

1.2.1. Patogénese e fisiopatologia

A mastite pode ser definida apenas como uma inflamação da glândula mamária (Kehrli Jr. *et al.*, 1994). No entanto, a sua fisiopatologia é algo mais, sendo constituída por três fases: invasão, infecção e inflamação (Radostits *et al.*, 2002).

A invasão compreende a entrada de microrganismos patogénicos para o interior da glândula mamária, pelo canal do teto (Radostits *et al.*, 2002).

A infecção consiste na multiplicação dos microrganismos seguida da invasão do tecido mamário provocando assim uma reacção inflamatória (Radostits *et al.*, 2002).

Na inflamação actuam os mecanismos de defesa da glândula mamária, de forma a eliminar os microrganismos patogénicos invasores (Radostits *et al.*, 2002). De seguida são descritos os intervenientes da defesa da glândula mamária e o modo de actuação na mastite.

Os neutrófilos são o tipo de células em maior número no leite de glândulas mamárias com mastite. A fagocitose efectuada por estas células é de extrema importância no combate aos microrganismos invasores. Há, então, a chamada dos neutrófilos através de mediadores inflamatórios. Inicialmente, factores quimiotácticos e citocinas libertados por macrófagos e pelas células epiteliais, IL-8, C5a, TNF- α , IL-1 β e GM-CSF, recrutam neutrófilos da circulação para o leite. Posteriormente, os próprios neutrófilos libertam mediadores que atraem mais neutrófilos ao local da inflamação (Harmon, 1994; Arosa *et al.*, 2007; Andrews *et al.*, 2008; Smith, 2009).

Uma vez no local, os neutrófilos iniciam a sua actividade. A fagocitose pode ocorrer por opsonização ou não. Quando ocorre por opsonização, o receptor Fc, presente nos neutrófilos, liga-se à mesma região das imunoglobulinas (IgG₂ e IgM) associadas aos microrganismos patogénicos, facilitando assim a fagocitose. Os componentes do complemento, C3 e C3b, são também opsoninas que facilitam a fagocitose pelos neutrófilos, sendo que a sua acção é mais eficiente nas bactérias Gram-negativas do que nas Gram-positivas, que são mais resistentes. Quando não ocorre por opsonização, a expressão do gene CD14 faz a ligação dos neutrófilos à camada de lipopolissacarídeos da parede das bactérias, facilitando também, assim a fagocitose. Finalmente, os neutrófilos sofrem apoptose para eliminação total dos microrganismos (Harmon, 1994; Arosa *et al.*, 2007; Andrews *et al.*, 2008; Carneiro *et al.*, 2009; Smith, 2009).

No leite, estão também presentes linfócitos T e linfócitos B, variando a sua concentração conforme o período de lactação. Alguns autores referem, ainda, a existência de

células NK na glândula mamária (Harmon, 1994; Arosa *et al.*, 2007; Andrews *et al.*, 2008; Carneiro *et al.*, 2009; Smith, 2009).

Os macrófagos têm um papel semelhante ao dos neutrófilos, realizando também a fagocitose. No entanto, durante a mastite, apresentam-se em menor número, do que os outros. São ainda células apresentadoras de antígeno aos linfócitos T (Harmon, 1994; Arosa *et al.*, 2007; Andrews *et al.*, 2008; Smith, 2009).

As células epiteliais, apesar de não terem o mais importante papel na defesa celular da glândula mamária, contêm uma série de propriedades que contribuem para a mesma. Possuem receptores Toll-like que reconhecem bactérias Gram-negativas, através da camada de LPS e bactérias Gram-positivas pela presença de ácido lipoteicoico. Levam assim à libertação de citocinas e quimoquinas, dando início à inflamação (Harmon, 1994; Arosa *et al.*, 2007; Andrews *et al.*, 2008; Smith, 2009).

Inúmeras substâncias com actividade antimicrobiana estão presentes no leite e grânulos dos neutrófilos:

- Lactoferrina: tem actividade bactericida, sendo quelante do ferro, deixando-o indisponível para os microrganismos invasores, sendo maior a sua concentração durante o período seco (Andrews *et al.*, 2008; Carneiro, *et al.*, 2009; Smith, 2009).

- Lactoperoxidase: esta substância tem propriedades bacteriostáticas e bactericidas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente, estando estas dependentes da presença de tiocianato e peróxido de hidrogénio (Andrews *et al.*, 2008; Carneiro, *et al.*, 2009; Smith, 2009).

- Lisozima: é produzida pelas células epiteliais e pelos leucócitos e tem propriedades bactericidas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Actua por hidrólise dos peptideoglicanos, sendo, por isso, mais eficaz no combate às bactérias Gram-positivas, que contêm maior percentagem destes (Andrews *et al.*, 2008; Carneiro, *et al.*, 2009; Smith, 2009).

- N-acetil-β-D-glucosaminidase: a sua origem é ainda objecto de discussão, mas a sua concentração é elevada aquando da inflamação. No entanto, pode ser detectada também em úberes saudáveis, sendo a sua concentração maior no início e final da lactação, bem como no período seco. É referido que, quartos que apresentam elevadas concentrações de NAGase e lisozima, não desenvolvem mastite subclínica (Andrews *et al.*, 2008; Carneiro, *et al.*, 2009; Smith, 2009).

1.3. ETIOLOGIA

A mastite bovina é uma doença de grande importância, sendo normalmente causada por uma infecção bacteriana (Kubota *et al.*, 2007).

Existem agentes de maior e de menor importância pelo “tamanho” do seu impacto no hospedeiro. Assim, agentes de maior importância causam um maior impacto, como uma reacção inflamatória mais acentuada e uma maior elevação das CCS em relação aos de menor importância (Harmon, 1994; Radostits *et al.*, 2002). Segundo Harmon (1994) e Djabri *et al.* (2002), os agentes de maior importância são responsáveis, a maioria das vezes por mastites clínicas, enquanto, os de menor importância, raramente estão associados a sinais clínicos.

Os agentes bacterianos podem ainda ser classificados em dois grupos, contagiosos e ambientais, consoante o seu modo de transmissão e fonte de infecção (Radostits *et al.*, 2002; Smith, 2009).

Os agentes ambientais, como o próprio nome indica, estão presentes no meio ambiente, podendo ser isolados de fezes, camas, solo, água contaminada, entre outros. Aproximadamente 50% das mastites provocadas por estes agentes ocorrem durante o período seco. Os agentes contagiosos são, geralmente, transmitidos de animal a animal, ou mesmo de um quarto para outro, no mesmo animal. Isto acontece principalmente durante a ordenha, por má higiene dos ordenhadores e sala de ordenha, reutilização de toalhas de limpeza dos tetos e ordenha de vacas afectadas antes da ordenha das vacas saudáveis. Na Tabela 1, está representada a classificação de alguns agentes em contagiosos ou ambientais e de maior ou menor importância (Bexiga, s.d.; Harmon, 1994; Radostits *et al.*, 2002; Andrews *et al.*, 2008; Smith, 2009; Quinn *et al.*, 2011;).

Estão descritos ainda alguns agentes menos comuns. Segundo Radostits *et al.* (2002), estes agentes esporádicos podem causar mastites graves. Alguns destes agentes são: *Arcanobacterium pyogenes*, *Nocardia spp.* *Haemophilus somnus*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Campylobacter jejuni*, *Mycobacterium bovis* e *Bacillus cereus*. Infecções por bactérias anaeróbias como *Clostridium sporogenes* e *Fusobacterium necrophorum*, infecções fúngicas por *Aspergillus fumigatus*, *Trichosporon spp.*, infecções por algas *Prototheca spp.* e ainda infecções víricas, são outro exemplos de agentes menos comuns (Harmon, 1994; Radostits *et al.*, 2002).

AGENTES	Contagiosos	Ambientais
Maior importância	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Mycoplasma bovis</i>	<i>Streptococcus uberis</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella</i> spp. <i>Citrobacter</i> spp. <i>Enterobacter</i> spp. <i>Serratia</i> spp. <i>Proteus</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.
Menor importância	<i>Corynebacterium bovis</i> <i>Staphylococcus coagulase-negativa</i>	

Tabela 1 - Classificação dos agentes bacterianos (Harmon, 1994; Djabri et al., 2002; Radostits et al., 2002; Andrews et al., 2008; Smith, 2009; Malek dos Reis et al., 2011).

1.3.1. Agentes contagiosos

1.3.1.1. *Staphylococcus aureus*

É uma bactéria Gram-positiva, sendo a maioria das suas estirpes coagulase-positiva. É encontrada na pele do úbere, nas amígdalas, no tracto urogenital baixo (vagina) e no tracto respiratório superior (narinas), dos animais e nas mãos do ordenhador. É estável no meio ambiente, podendo ser encontrada nas camas e reservatórios de água. Contudo, a sua maior fonte de infecção são os úberes de vacas infectadas. A sua transmissão ocorre, principalmente, durante a ordenha, pelas mãos dos ordenhadores e por tetinas contaminadas (Radostits *et al.*, 2002; Andrews *et al.*, 2008; Quinn *et al.*, 2011).

A maioria das infecções por *S. aureus* é crónica, subclínica e com elevadas CCS, tendo por vezes períodos de infecção clínica que pode ser suave ou até mesmo gangrenosa (Smith, 2009).

O *S. aureus* adere às células epiteliais da glândula mamária, invadindo-as e passando assim para o tecido intersticial. Resistem à fagocitose pelos neutrófilos e danificam as células mamárias, podendo levar a fibrose e formação de abscessos (Smith, 2009).

O tratamento por antibioterapia é difícil, uma vez que desenvolvem mecanismos de resistência e pode mesmo ser irrelevante, dado que durante a inflamação o antibiótico não alcança o *S. aureus* intracelular, nem tão pouco penetra abscessos (Smith, 2009).

1.3.1.2. *Streptococcus agalactiae*

É uma bactéria gram-positiva que pode ser encontrada na pele da vaca, nas mãos do ordenhador e no ambiente, onde pode sobreviver até três semanas. A sua principal fonte de infecção é o úbere de vacas infectadas, sendo que a sua transmissão ocorre maioritariamente durante a ordenha pelas mãos do ordenhador, toalhas e tetinas contaminadas (Radostits *et al.*, 2002; Andrews *et al.*, 2008; Smith, 2009; Quinn *et al.*, 2011).

A mastite por *S. agalactiae* é caracterizada por elevadas CCS. A maioria das infecções é subclínica, e se não for tratada, pode mesmo ser crónica. As infecções crónicas podem ter períodos de mastite clínica, mas sem sinais sistémicos (Smith, 2009).

A bactéria adere às células epiteliais e fixa-se nos ductos, levando à sua obstrução e por isso, a uma diminuição da produção de leite. Se o animal não for tratado rapidamente, podem ocorrer danos permanentes e produção de fibrose (Smith, 2009).

1.3.1.3. *Mycoplasma spp.*

Várias espécies de *Mycoplasma* podem estar envolvidas no desenvolvimento da mastite, mas o *Mycoplasma bovis* é a espécie mais comumente isolada (Andrews *et al.*, 2008; Quinn *et al.*, 2011).

O *Mycoplasma spp.*, pode ser encontrado em vários locais que não a glândula mamária, como os tractos respiratório e urogenital. Quando presente num rebanho, os animais podem desenvolver poliartrite, broncopneumonia, otite e mastite (Smith, 2009; Quinn *et al.*, 2011).

A transmissão ocorre durante a ordenha pelas mãos do ordenhador, pelas roupas e pela máquina de ordenha contaminados. A transmissão no *Mycoplasma spp.* de outras partes do corpo e entre quartos mamários, parece também acontecer por via hematogena e linfática (Smith, 2009; Quinn *et al.*, 2011).

A sua patogenia ainda não está totalmente esclarecida. A maioria das infecções é subclínica e crónica. No entanto, quando clínicas, a resposta ao tratamento é variável e normalmente falha com tratamentos convencionais, podendo mesmo levar a agalactia (Smith, 2009; Quinn *et al.*, 2011).

1.3.1.4. *Staphylococcus coagulase-negativa*

Apesar de serem agentes de menor importância, este grupo é considerado a maior causa de mastite bovina, sendo na sua maioria subclínica ou clínica moderada. A elevação das CCS é, normalmente, a única manifestação, embora não seja tão acentuada em comparação a casos de mastite por agentes de maior importância. Contudo, as infecções causadas por este grupo tendem a ser persistentes (Smith, 2009; Quinn *et al.*, 2011).

Algumas das espécies mais comumente isoladas são *Staphylococcus hyicus*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. simulans* e *S. sciuri*. Na verdade, algumas estirpes de *S. hyicus* são coagulase-positiva, mas, são geralmente classificadas como *Staphylococcus coagulase-negativa* (SCN) (Smith, 2009; Quinn *et al.*, 2011).

Estes microrganismos, que podem ser isolados da pele do úbere, do canal do teto e do meio ambiente, diferem entre si na epidemiologia, virulência e na resposta ao tratamento (Smith, 2009; Quinn *et al.*, 2011). A descrição da sua patogenicidade varia: desde serem protectores contra outras bactérias causadoras de mastite, serem indiferentes na saúde do úbere, ou serem causadores de mastite (De Vliegher *et al.*, 2012).

1.3.2. Agentes ambientais

1.3.2.1. *Streptococcus uberis*

O *S. uberis* é uma bactéria gram-positiva, que pode ser encontrada nas amígdalas e nos tractos genital e gastrointestinal dos animais. O meio ambiente, como camas, principalmente de palha, e fezes contaminadas, parece ser a principal fonte de infecção. Pastos com elevado número de animais podem também ser fonte de infecção, assim como pode ocorrer a transmissão vaca a vaca (Smith, 2009; Quinn *et al.*, 2011).

É uma bactéria resistente à fagocitose pelos neutrófilos e esta resposta inefectiva do hospedeiro face à infecção, pode explicar o prolongamento da mastite e as elevadas CCS que se verificam em alguns casos (Smith, 2009; Quinn *et al.*, 2011).

Por vezes as infecções são subclínicas, sendo as elevadas CCS a única pista para alertar que algo está errado (Smith, 2009).

Mais de 50% das infecções são clínicas, sendo que, na maioria dos casos, o único sinal é a alteração do leite e, apenas 10% dos animais afectados, apresentam sinais sistémicos como febre e anorexia (Smith, 2009; Quinn *et al.*, 2011).

1.3.2.2. *Streptococcus dysgalactiae*

A classificação desta bactéria como contagiosa ou ambiental gera bastante controvérsia. Alguns autores classificam-na como contagiosa (Andrews *et al.*, 2008 e Blowey & Edmondson, 2010) e outros como ambiental (Smith, 2009). O *S. dysgalactiae* parece, então, ocupar uma posição intermédia entre os dois grupos, uma vez que possui características de um e de outro (Andrews *et al.*, 2008; Smith, 2009; Quinn *et al.*, 2011).

Este agente pode ser encontrado no meio ambiente da vaca, tendo também sido isolado de amígdalas, vagina e boca de vacas (Quinn *et al.*, 2011).

A sua patogenicidade é semelhante à do *S. uberis* (Smith, 2009).

1.3.2.3. Coliformes

A mastite por *E.coli*, é a mais comum das mastites que têm como causa bactérias coliformes. Contudo, outras espécies como *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp. e *Pseudomonas* spp., podem também estar implicadas (Andrews *et al.*, 2008; Smith, 2009; Quinn *et al.*, 2011).

As bactérias coliformes, gram-negativas, são ubiqüitárias do ambiente da vaca e excretadas nas fezes, sendo estas a sua principal fonte de infecção (Andrews *et al.*, 2008; Smith, 2009; Quinn *et al.*, 2011).

Quando na glândula mamária, estas bactérias multiplicam-se rapidamente, não havendo aderência nem invasão das células epiteliais. Se o animal estiver saudável e possuir uma resposta imune eficiente, a bactéria é eliminada sem grande impacto para a saúde e produtividade do mesmo, podendo mesmo regressar a uma produção parcial na mesma lactação. Por outro lado, se a resposta imune é fraca, a multiplicação bacteriana é contínua, levando a doença sistémica e com pior prognóstico de recuperação (Smith, 2009; Quinn *et al.*, 2011).

Enquanto ocorre a multiplicação e morte bacteriana, são libertadas endotoxinas, responsáveis por grande parte da patogénese da mastite por coliformes. Estas ligam-se às células do hospedeiro e iniciam a cascata de inflamação, dando início a sinais sistémicos como febre, taquicardia, diminuição da motilidade ruminal e sinais de choque assim como a sinais locais como hiperémia, hemorragia e edema dos quartos afectados. Estes sinais levam o animal ao decúbito, havendo em poucas horas uma baixa de temperatura, seguida de diarreia profusa e desidratação (Smith, 2009; Quinn *et al.*, 2011).

Nos casos mais severos, a secreção mamária é serosa com pequenos flocos de tecido necrótico, podendo levar à morte do animal em apenas um ou dois dias após o aparecimento dos sinais. Nos casos menos severos, a secreção é mais aguada (Quinn *et al.*, 2011).

A maioria das IIM por coliformes, são de curta duração, sendo relativamente baixa a taxa de casos crônicos (10%). Os animais que sofrem de infecções crônicas ficam mais susceptíveis a infecções clínicas recorrentes nos quartos afectados (Smith, 2009).

1.4. FACTORES DE RISCO PARA A OCORRÊNCIA DE MASTITE

1.4.1. Factores de risco associados ao animal

1.4.1.1. Idade e número de partos

Com o aumento da idade e do número de partos, cresce também a prevalência de mastite, verificando-se um pico por volta dos sete anos de idade. No entanto, verificam-se também taxas consideráveis de mastite em novilhas, facto de grande importância, podendo ser uma potencial ameaça em termos de produção futura e na saúde do úbere (Radostits *et al.*, 2002; De Vliegher *et al.*, 2012;).

1.4.1.2. Período de lactação

O início da lactação, nos primeiros dois meses, e o início do período seco, são duas das fases em que ocorre a maioria das novas infecções. No entanto, nas novilhas, o período peri-parto é o mais crítico, ocorrendo a maioria das infecções no último trimestre de gestação e nos primeiros dias após o parto. Após este período, ocorre uma descida acentuada no número de mastites nas novilhas (Radostits *et al.*, 2002).

1.4.1.3. Morfologia do úbere e tetos

Uma maior ou menor profundidade do úbere, leva a uma maior ou menor probabilidade de CCS acima de 200 000 cél/ml, logo, a uma maior ou menor probabilidade de ocorrência de mastite, respectivamente (Coentrão *et al.*, 2008). Nos úberes com maior profundidade, os tetos ficam mais próximos do chão, ficando mais expostos aos microrganismos e/ou podendo dar origem a lesões (Radostits *et al.*, 2002; Coentrão *et al.*, 2008).

Um grande diâmetro do canal do teto está também associado ao aumento de CCS e ao aparecimento de IIM (Radostits *et al.*, 2002).

1.4.1.4. Genética

As características morfológicas, fisiológicas e imunológicas, que conferem a resistência da vaca à mastite, podem ser influenciadas pela genética (Radostits *et al.*, 2002).

Estima-se que a heritabilidade para a mastite clínica é, em média, de 0,05 (Radostits *et al.*, 2002). No estudo de Koek *et al.* (2010), os resultados da heritabilidade para a mastite clínica no início da lactação variam entre 0,02 e 0,06. Todos estes valores sugerem que a mastite clínica tem uma baixa heritabilidade, estando sujeitos a uma grande influência ambiental (Kehrli Jr. *et al.*, 1994; Radostits *et al.*, 2002; Koek *et al.*, 2010).

Contudo, no que diz respeito à correlação entre as CCS e a mastite clínica, verificam-se resultados de heritabilidade de 0,71 a 0,79, indicando que esta é uma boa ferramenta no que diz respeito à selecção genética (Radostits *et al.*, 2002)

1.4.2. Factores de risco associados ao meio ambiente

1.4.2.1. Condições de estabulação e ocorrência de mastite

No que diz respeito, principalmente, à ocorrência de mastite ambiental, as condições de estabulação são de extrema importância (Radostits *et al.*, 2002; Andrews *et al.*, 2008; Smith, 2009; Blowey & Edmondson, 2010).

A limpeza e conforto das instalações são duas vertentes que se devem ter em maior consideração. Camas e espaços sujos, com matéria fecal e urina, juntamente com uma má ventilação e condições de humidade ideais, favorecem o crescimento e multiplicação de bactérias, levando a um possível aumento da ocorrência de IIM e de mastite (Radostits *et al.*, 2002; Andrews *et al.*, 2008; Smith, 2009; Blowey & Edmondson, 2010;).

Também o desadequado desenho das instalações, considerando o tamanho das camas, corredores e espaços comuns, leva ao aparecimento de lesões e impossibilita os animais de se movimentar naturalmente e deitar em posições adequadas (Radostits *et al.*, 2002; Andrews *et al.*, 2008; Smith, 2009; Blowey & Edmondson, 2010;).

O número e o tipo de revestimento das camas são ainda factores importantes a ter em conta. Por um lado, o tipo de revestimento, em especial os de origem orgânica como palha ou serradura, favorece o crescimento e multiplicação de microrganismos, por outro lado, o

insuficiente número de camas, impede que os animais se possam deitar e assim escolherem outros locais menos limpos que favorecem a IIM (Radostits *et al.*, 2002; Andrews *et al.*, 2008; Smith, 2009; Blowey & Edmondson, 2010;).

O número elevado de animais e a sobrepopulação originam maiores quantidades de matéria fecal, de urina e por isso mais humidade, sendo por este motivo, também, outro importante factor a considerar (Radostits *et al.*, 2002; Andrews *et al.*, 2008; Smith, 2009; Blowey & Edmondson, 2010;).

1.4.2.2. Práticas de ordenha

Más práticas de ordenha estão relacionadas com a ocorrência de mastite. A IIM pode ter origem nas mãos do ordenhador, nas tetinas contaminadas, nas toalhas de limpeza dos tetos reutilizadas, entre outros. No Gráfico 1, pode verificar-se a influência que as práticas de higiene na ordenha têm na ocorrência de novas IIM. A Tabela 2 esclarece as diferenças entre práticas de higiene completa e parcial e a sua ausência, facilitando a compreensão do gráfico.

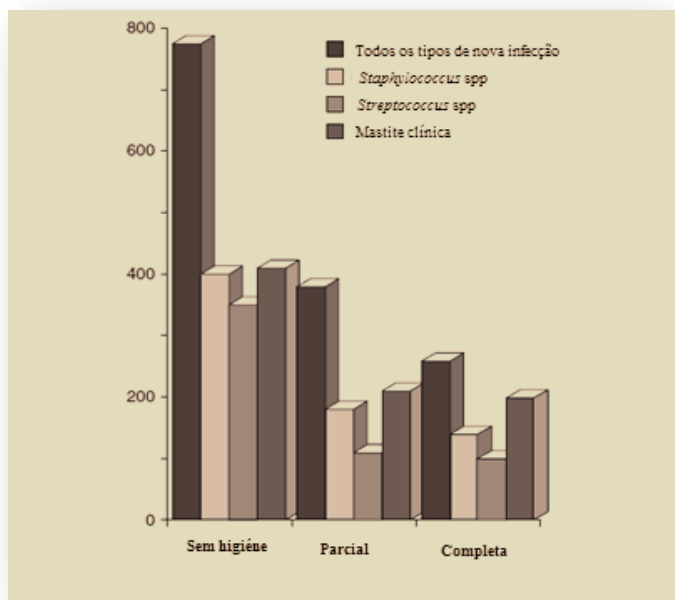


Gráfico 1 - Influência de práticas de higiene na ordenha na ocorrência de novas infecções (Adaptado de Blowey & Edmondson, 2010; Andrews *et al.*, 2008).

Higiene	Sem práticas de higiene	Parcial	Completa
Lavagem desinfetante do úbere	✗	✓	✓
Toalhas individuais	✗	✓	✓
Utilização de luvas	✗	✓	✓
Desinfecção das mãos por imersão	✗	✓	✓
Desinfecção dos tetos por imersão	✗	✓	✓
Esterilização das tetinas	✗	✗	✓

Tabela 2 - Diferenças entre práticas de higiene completa, parcial e a sua ausência (Adaptado de Blowey & Edmondson, 2010; Andrews et al., 2008).

1.5. DIAGNÓSTICO

Para fazer uma correcta abordagem à mastite, implementando programas de prevenção e bons protocolos de tratamento, é necessário um correcto diagnóstico.

Existem vários métodos de diagnóstico para detecção de mastites, incluindo a interpretação dos sinais visíveis numa mastite clínica.

A cultura bacteriológica é o meio diagnóstico *gold standard* (Smith, 2009; Malek dos Reis *et al.*, 2011), no entanto, há autores que não o consideram exequível enquanto teste de rotina para detecção de mastites, pois é moroso e dispendioso. Por esta razão, recorre-se a outros meios mais acessíveis para uma primeira abordagem (Pyörälä, 2003; Malek dos Reis *et al.*, 2011).

1.5.1. Contagem de células somáticas

As células somáticas são o conjunto das células inflamatórias presentes no leite como neutrófilos, linfócitos, macrófagos e células epiteliais da glândula mamária (Harmon, 1994; Schukken *et al.*, 2003; Andrews *et al.*, 2008; Smith, 2009). Numa glândula saudável, estas células conferem-lhe protecção contra uma IIM, reconhecendo o microrganismo patogénico e iniciando uma rápida resposta inflamatória (Bannerman *et al.*, 2008).

A contagem total destas células designa-se por contagem de células somáticas (CCS). É uma ferramenta essencial no diagnóstico de mastite e mesmo na monitorização da

saúde do úbere, estando facilmente disponível aos produtores leiteiros (Harmon, 1994; De Haas *et al.*, 2002; Schukken *et al.*, 2003; Dufour *et al.*, 2011; Malek dos Reis *et al.*, 2011).

1.5.1.1. Tipo de amostra

Esta contagem pode ser feita a nível individual ou no leite total da ordenha, no tanque. Ainda a nível individual, esta pode ser realizada por cada quarto individualmente, ou no leite composto dos quatro tetos. A contagem do leite composto é, geralmente, menor que a contagem de um quarto individual, quando infectado, uma vez que o leite dos tetos não infectados dilui o número de células somáticas presentes (Smith, 2009; Dufour *et al.*, 2011).

A CCS no tanque é um bom indicador do estado geral de saúde do úbere do rebanho leiteiro. Em geral, rebanhos com alta CCS no tanque, têm um grande número de vacas com IIM e mastite subclínica. No entanto, a detecção da percentagem de quartos e vacas infectadas é bastante imprecisa (Radostits *et al.*, 2002; Barnouin *et al.*, 2004; Hasken *et al.*, 2009; Dufour *et al.*, 2011).

1.5.1.2. Métodos de contagem

Vários métodos são referidos para a contagem de células somáticas: contagem por observação directa por microscopia, contagem pelo contador Coulter, e por citometria de fluxo (Fossomatic[®]), entre outros (Djabri *et al.*, 2002; Pyörälä, 2003; Andrews *et al.*, 2008).

O contador Coulter conta o número de impulsos eléctricos emitidos pelas partículas do leite que passam por dois eléctrodos. Existe um limiar L para que apenas sejam contadas as partículas que emitem impulsos que excedem esse limiar (Djabri *et al.*, 2002; Andrews *et al.*, 2008).

Na citometria de fluxo, as células do leite são coradas com brometo de etídio, emitindo luz com comprimento de onda específico quando iluminadas por uma lâmpada de alta energia. O aparelho Fossomatic[®], conta, electronicamente, o número de núcleos celulares que ficam fluorescentes (Djabri *et al.*, 2002; Andrews *et al.*, 2008).

1.5.1.3. Valor de referência

Para definir se uma vaca tem uma elevada ou baixa contagem de células somáticas é imprescindível definir um valor de referência (VR) para essas mesmas contagens.

Inicialmente, foi imposto um VR de 500 000 cél/ml (Pyörälä, 2003). Hoje em dia, é recomendado um VR de 200 000 cél/ml. Em resultados abaixo deste valor, considera-se a

ausência de IIM, quando os resultados são acima deste considera-se a presença de IIM. (Green *et al.*, 2008; Smith, 2009)

Um VR de 100 000 cél/ml foi proposto para classificar úberes saudáveis (Pyörälä, 2003; Green *et al.*, 2008). Um resultado superior a 100 000 cél/ml é consistente com inflamação, mas não com infecção (Smith, 2009).

“Nenhum VR para CCS é perfeito” (Smith, 2009). Assumindo que sensibilidade se refere a glândulas infectadas e especificidade a glândulas saudáveis, quando utilizado um VR baixo, aumenta-se a sensibilidade e diminui-se a especificidade. Pelo contrário, utilizando-se um VR mais elevado, diminui-se a sensibilidade e aumenta-se a especificidade. É importante ter em conta também os resultados de bacteriologia, quando realizados, e todos os factores que podem influenciar as CCS (Pyörälä, 2003; Schukken *et al.*, 2003; Green *et al.*, 2008; Smith, 2009).

1.5.1.4. Factores que influenciam a CCS

Vários estudos (Harmon, 1994; Pyörälä, 2003; Andrews *et al.*, 2008; Hagnestam-Nielsen *et al.*, 2009; Malek dos Reis *et al.*, 2011) referem diferentes factores que podem influenciar a CCS. A própria IIM, o agente envolvido, flutuações ao longo do tempo, idade/número de lactações, período de lactação, manejo, sazonalidade, frequência de ordenha, tipo de ordenha, método de contagem e genética, são alguns dos factores envolvidos.

A infecção intramamária causada por diferentes agentes patogénicos origina CCS distintas. Geralmente, os microrganismos patogénicos de maior importância causam grandes elevações de CCS e os de menor importância causam elevações mais moderadas (Harmon, 1994). No entanto, este facto pode não ser sempre verificado, pois o factor tempo altera estas contagens, que vão sofrendo flutuações no decurso da infecção (Harmon, 1994; De Haas *et al.*, 2002; Green *et al.*, 2004). Segundo Harmon (1994), estas flutuações podem ocorrer em horas, dias ou meses, dependendo do microrganismo envolvido e da resposta do próprio animal.

Segundo De Haas *et al.* (2002) e referido também em Sørensen (2009), numa mastite clínica causada por *Staphylococcus aureus*, as CCS são elevadas mesmo antes de serem visíveis quaisquer sinais clínicos e mesmo depois destes desaparecerem. Nos casos de mastite por *Escherichia coli*, as contagens permanecem elevadas apenas aquando dos sinais clínicos, descendo rapidamente após o desaparecimento dos mesmos. No estudo realizado por Pyörälä (2003), os valores mais elevados de CCS foram observados em mastites por coliformes e

Streptococcus uberis e os valores menores em IIM causadas por *Corynebacterium* spp. Já De Haas *et al.* (2002), que comparou CCS de mastites por *S. aureus* e *Corynebacterium bovis*, observou um grande aumento nas CCS de mastite por *S. aureus* e um menor aumento na mastite por *C. bovis*.

Com o avançar da idade, e consequentemente do número de lactações, aumenta também a CCS (Harmon, 1994; Andrews *et al.*, 2008). Andrews *et al.* (2008), explica este facto pela maior extensão da inflamação subaguda dos ductos, bem como pela maior gravidade das lesões lobulares.

A CCS varia ao longo da lactação. No início desta, as contagens são elevadas, no entanto, em quartos não infectados, tendem a diminuir rapidamente até cinco dias pós-parto para um nível considerado normal (Pyörälä, 2003) ou abaixo de 300 000 cél/ml (Harmon, 1994). Nos quartos infectados tendem a ficar elevadas (Pyörälä, 2003). No final da lactação, mesmo quartos não infectados, podem exibir elevações nas contagens, que podem ser explicadas pela diminuição de volume de leite produzido, aumentando assim a concentração de células (Harmon, 1994; Andrews *et al.*, 2008).

A sazonalidade pode também ter influência nas CCS. Segundo Harmon (1994) as CCS são mais elevadas durante o período de Verão, em que as temperaturas são mais elevadas e existem mais casos de mastite do que no período de Inverno em que as temperaturas são mais baixas. Explica, que este facto se deve, possivelmente, ao aumento da humidade e calor que se verifica no período de Verão o que provoca mais stress aos animais, e ao aumento do número de coliformes nas camas deixando-os, assim mais susceptíveis a infecções. Malek dos Reis *et al.* (2011) afirma que segundo os seus resultados a média das CCS no Verão (123 000 cél/ml) não difere significativamente da média das CCS no Inverno (117 000 cél/ml).

A frequência com que é realizada a ordenha e, consequentemente, o tempo de intervalo entre cada uma, afecta também as contagens. Por exemplo, uma mudança de duas ordenhas por dia para três, segundo Pyörälä (2003), diminui a CCS no tanque e a proporção de vacas com CCS elevadas. Por outro lado, intervalos muito curtos, de quatro horas ou até menos, parecem aumentar as contagens no tanque. Andrews *et al.* (2008), refere ainda que comparações de CCS no leite, geralmente mostram valores maiores quando o intervalo entre ordenhas é mais curto e que, em intervalos mais longos, são menores, devido à diluição das células somáticas no volume total de leite produzido (Pyörälä, 2003; Andrews *et al.*, 2008).

A implementação de sistemas de ordenha automática (SOA) parece ter pouca influência no aumento das CCS. Nos estudos de Rasmussen *et al.* (2002) e Dufour *et al.* (2011), é referido que a média de CCS no tanque das explorações onde foi instalado este sistema, é apenas ligeiramente maior do que a média anterior, antes da instalação do SOA, ou mesmo igual, não havendo, aparentemente, diferenças significativas. Em algumas explorações, foi ainda adoptado um sistema de auto-monitorização, resultando, em alguns dos casos, numa redução das CCS no tanque. Nas explorações em que se verificou aumentos nas CCS, um acréscimo do número de animais com IIM e a inclusão do seu leite no tanque, pode justificar, possivelmente esse facto. Dufour *et al.* (2011) refere ainda, que, explorações com CCS elevadas antes da instalação do SOA, estão em maior risco de apresentar maiores aumentos das mesmas após a instalação. Rasmussen *et al.* (2002) e Dufour *et al.* (2011) sugerem que programas de auto-monitorização sejam adoptados mesmo antes da instalação de SOA.

Os diferentes métodos de contagem podem também influenciar uma maior ou menor CCS. As contagens feitas pelo contador Coulter, são, geralmente, mais elevadas que as realizadas pelo Fossomatic[®]. Tal facto deve-se, provavelmente, à contagem de fragmentos celulares, agregados proteicos e alguns artefactos pelo contador Coulter (Djabri *et al.*, 2002; Pyörälä, 2003).

1.5.2. Cultura microbiológica

A cultura microbiológica é considerada o meio diagnóstico *gold standard*, uma vez que a partir desta é possível fazer a identificação dos agentes causadores de mastite e, posteriormente, antibiogramas para implementação de protocolos de tratamento adequado.

1.5.2.1. Tipo de amostra

A cultura microbiológica pode ser realizada individualmente, vaca a vaca, com leite composto dos quatro tetos ou de cada teto individualmente, ou a partir do leite do tanque (Radostits *et al.*, 2002; Smith, 2009).

Uma amostra de leite de cada teto tem como vantagem a identificação de qual ou quais os tetos infectados, podendo significar uma redução do número de tetos a tratar. Este procedimento pode resultar numa redução de custo do tratamento, traduzindo-se numa grande economia para o produtor caso a taxa de tetos infectados seja baixa (Radostits *et al.*, 2002). Muitas vezes é realizado um TCM, para seleccionar os tetos possivelmente infectados, para a

realização de cultura microbiológica (Bexiga, s.d.; Smith, 2009). Segundo Smith (2009), as amostras de cada teto têm uma maior sensibilidade para detectar infecções por *S. aureus* e são preferíveis para a detecção de *Mycoplasma* spp.

As amostras de leite composto são úteis para a monitorização da mastite subclínica, tratando-se de uma opção mais barata e rápida em relação às amostras de cada teto. Por outro lado, a sua sensibilidade é menor, uma vez que o agente proveniente dos quartos infectados pode diluir-se no leite composto, podendo dar origem a falsos negativos. Outra desvantagem deste tipo de amostra é uma maior probabilidade de contaminação aquando da sua recolha (Bexiga, s.d.; Smith, 2009).

Existem regras para a recolha das amostras de leite, de maneira a reduzir a contaminação. É importante que não haja contaminação para que o resultado da cultura microbiológica seja apenas relativo ao agente que provoca a mastite e não da contaminação (Bexiga, s.d.):

1. **Limpeza do teto:** remoção da sujidade visível por exemplo com toalhete de papel. A lavagem com água deve ser evitada pois aumenta o risco de contaminação por microrganismos presentes na pele do úbere. No entanto, se for necessária, deve ser feita uma secagem rigorosa após a lavagem;

2. **Eliminação dos primeiros jactos de leite;**

3. **Predip do teto:** imersão do teto em solução desinfetante por 30 segundos;

4. **Secagem do teto:** secar completamente o teto com toalhete de papel individual;

5. **Desinfecção do teto:** com algodão embebido em álcool (70°), passar por todo o teto começando pelo esfíncter. Repetir com novo algodão caso haja ainda presença de contaminação fecal;

6. **Recolha de leite:** deve ser retirada a tampa do copo de recolha, colocando-a verticalmente ou virada para baixo na mão do operador, de forma a evitar a contaminação do interior do recipiente quando este for tapado. O copo deve ser mantido na vertical, evitando o contacto com o teto de forma a minimizar a contaminação. Alguns jactos devem ser enviados para o recipiente que deve ser imediatamente tapado;

7. **Identificação da amostra;**

8. **Refrigeração da amostra:** imediatamente após a colheita, a 4°C, de forma a evitar o sobrecrecimento de eventuais bactérias contaminantes.

A cultura a partir do tanque é útil para avaliar o estado de saúde do úbere dos rebanhos, solucionar problemas de qualidade do leite e ainda avaliar as práticas de higiene na ordenha, a um baixo custo. Resultados positivos para *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* ou espécies patogénicas de *Mycoplasma* são indicativos da presença de vacas infectadas por estes microrganismos, mas a sua não detecção não significa a sua ausência. Alguns agentes têm excreção intermitente, o que pode levar a resultados negativos apesar da presença de vacas infectadas pelos mesmos. O facto de o leite dos animais com mastite clínica não ser aproveitado, leva também à sua não detecção, embora a infecção esteja presente no rebanho (Bexiga, s.d.; Radostits *et al.*, 2002; Smith, 2009).

A detecção de agentes ambientais, como coliformes, *Streptococcus uberis*, *S. dysgalactiae* e SCN, pode representar a presença de IIM, mas pode também indicar a presença de contaminação por más técnicas de higiene (Bexiga, s.d.; Radostits *et al.*, 2002; Smith, 2009).

A colheita da amostra deve ser realizada assepticamente e no topo do tanque. Deve então ser refrigerada e a cultura realizada até 36 horas após a recolha. Caso não seja possível, esta deve ser congelada (Smith, 2009).

Após a realização das culturas em meios específicos, como por exemplo Columbia CNA, MacConkey, Edwards, Sabouraud, procede-se à identificação dos microrganismos presentes recorrendo a testes específicos, coloração Gram, oxidase, catálase e coagulase, baterias de testes (Api[®]), ou a meios mais modernos como o caso do sistema Vitek[®].

1.5.2.2. Interpretação dos resultados

A interpretação dos resultados das culturas deve ser feita de maneira ponderada e com o uso de bom senso.

Tendo como resultado uma única colónia pura, considera-se, com um elevado grau de confiança, que essa bactéria é a causa da mastite. Por outro lado, podem ocorrer infecções mistas, sendo a interpretação mais difícil. Quando estão presentes três ou mais tipos de colónias diferentes, considera-se a amostra contaminada, contudo, a avaliação destes resultados requer atenção especial e depende do tipo de agente identificado (Bexiga, s.d.; Smith, 2009; Blowey & Edmondson, 2010).

Por exemplo, se numa cultura são identificados *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Enterococcus faecalis*, considera-se que a causa mais provável de mastite são o *S. aureus* e *S. agalactiae*. Se são identificadas *Escherichia coli*, *Streptococcus*

uberis e outras bactérias considera-se a causa mais provável de mastite a *E. coli* e *S. uberis*, tendo como contaminantes os restantes microrganismos. Por outro lado, se numa cultura estiverem presentes por exemplo *E. coli*, *Bacillus* spp, *Proteus* e *E. faecalis*, além de ser um elevado número de diferentes espécies de bactérias, são também, todas, de origem ambiental, tornando difícil obter alguma informação válida acerca desta amostra (Smith, 2009; Blowey & Edmondson, 2010).

Por vezes, acontece o não crescimento de colónias, mesmo quando as amostras são recolhidas de animais com sinais visíveis de mastite. Existem diversas razões que podem explicar este facto. Por exemplo, numa mastite por *E. coli*, a resposta do hospedeiro pode ser tão efectiva que, quando os sinais de mastite aparecem, todas as bactérias podem já ter sido destruídas. Assim, a amostra recolhida não contém microrganismos viáveis, não havendo crescimento. Algumas bactérias têm excreção intermitente, podendo ser feita a recolha da amostra de leite num momento em que a concentração bacteriana não seja suficiente para cultura. A presença de substâncias inibidoras resultantes de tratamento anterior, volume insuficiente de amostra e demasiado tempo de intervalo entre a recolha e a realização da cultura, são também motivos de não crescimento de colónias. Ainda, a cultura de *Mycoplasma* spp e *Leptospira*, requer condições específicas, logo, o seu crescimento não é possível utilizando as técnicas *standard* de cultura bacteriológica. Finalmente, a mastite pode apenas ser de origem traumática, ou uma reacção de hipersensibilidade, ocorrendo apenas inflamação não existindo infecção (Blowey & Edmondson, 2010).

1.5.3. Teste californiano de mastites

Embora seja um teste qualitativo, é também um teste indirecto para a CCS. É prático, rápido, de baixo custo e fornece informação de cada quarto individualmente. Baseia-se na reacção de gelatinização provocada pelo contacto entre um reagente e o material proteico das células somáticas do leite, que sofreram lise. Os resultados são expressos numa escala de 0 a 5, pela avaliação subjectiva de quem realiza o teste. Pode ainda ser realizada uma correspondência entre esta escala e o número aproximado da CCS (Radostits *et al.*, 2002; Andrews *et al.*, 2008; Smith, 2009).

1.5.4. Condutividade eléctrica

Durante a inflamação ocorrem alterações nas concentrações iónicas do leite. Verifica-se um aumento nas concentrações de sódio e cloro e diminuição da concentração de

potássio. A medição da condutividade eléctrica (CE) do leite, baseada nestas alterações das concentrações iónicas, é utilizada no diagnóstico de mastites. Muitos SOA têm já sistemas para a medição deste parâmetro (Pyörälä, 2003; Norberg *et al.*, 2004; Andrews *et al.*, 2008; Kamphuis *et al.*, 2010).

A CE é afectada não só pelas diferenças das concentrações iónicas, mas também pela idade do animal, pelo período de lactação e estado de saúde do úbere, tendo uma elevada correlação com a CCS (Pyörälä, 2003; Norberg *et al.*, 2004).

As medições deste parâmetro parecem ter mais sucesso quando realizadas em cada quarto separadamente, do que em leite composto dos quatro quartos (Norberg *et al.*, 2004; Andrews *et al.*, 2008). No estudo realizado por Norberg *et al.* (2004), concluiu-se que as medições em cada quarto separadamente, obtiveram melhores resultados, no que diz respeito à distinção de vacas com infecções subclínicas ou com infecções clínicas, comparativamente às medições realizadas em leite composto. Concluiu-se ainda que a distinção entre vacas com infecção subclínica e as vacas saudáveis foi insatisfatória.

1.5.5. Enzimas

1.5.5.1. N-cetyl- β -D-Glucosaminidase

Sendo uma enzima lisossomal, a N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAGase) é um bom indicador da inflamação e descrita também como útil na detecção de IIM. É libertada pelos neutrófilos durante a fagocitose e também por macrófagos e células epiteliais danificadas no processo inflamatório (Berning & Shook, 1992; Pyörälä, 2003; Carneiro *et al.*, 2009).

A sua concentração é mais elevada no início e final da lactação e no período seco. No período pós-parto, a sua concentração é tao elevada quanto numa mastite clínica, mas Pyörälä (2003) refere que foram já observados valores normais cinco dias após o parto (Pyörälä, 2003; Carneiro *et al.*, 2009).

Está altamente relacionada com as CCS e, por isso, Berning & Shook (1992) defendem que a NAGase deve ser utilizada como complemento destas.

Todavia, ainda não existem métodos viáveis e/ou disponíveis para a realização deste teste, na prática clínica.

1.5.6. Proteínas da fase aguda da inflamação

1.5.6.1. Albumina sérica bovina e antitripsina

A albumina sérica bovina (ASB) e a antitripsina foram as primeiras proteínas a ser estudadas como indicadores de inflamação, uma vez que se verifica o aumento das suas concentrações, nesta situação. No entanto, a sua aplicação na prática não acontece. No caso da ASB, a sua medição é demasiado morosa. Para a quantificação da antitripsina, foram desenvolvidos alguns métodos e verifica-se uma maior sensibilidade em relação à ASB, mas está pouco descrita (Kehrli Jr. *et al.*, 1994; Pyörälä, 2003; Rainard, 2003; Andrews *et al.*, 2008).

1.5.6.2. Haptoglobina e Amiloide A sérica

A haptoglobina e a amiloide A sérica (AAS) são as duas proteínas mais sensíveis da fase aguda, uma vez que mostram um aumento significativo durante a inflamação (Pyörälä, 2003; Grönlund *et al.*, 2005). Foi já demonstrada a elevação muito marcada da haptoglobina sérica em vacas com mastite por *Escherichia coli*, espontânea e experimental (Pyörälä, 2003). Pyörälä (2003) refere que têm sido realizadas pesquisas recentes para a determinação de proteínas da fase aguda, no leite.

Em Pyörälä (2003), foi demonstrada correlação entre concentrações de haptoglobina sérica e no leite, contrariamente à AAS em que não se verificou tal relação. É ainda referido que não foi encontrada qualquer relação entre as concentrações de AAS e haptoglobina no leite. Por outro lado, Grönlund *et al.* (2005) refere uma correlação entre as concentrações das duas proteínas no leite, mas não unânime.

Contudo, é necessária mais pesquisa acerca destas proteínas para determinar a sua verdadeira utilidade no diagnóstico de mastite, a sua relação com as CCS e para encontrar métodos viáveis para a sua determinação.

1.5.7. Outros indicadores de inflamação

1.5.7.1. Adenosina Trifosfato

É referido por muitos autores, mas é utilizado apenas experimentalmente. É influenciado, tal como a CCS, pelo período de lactação, tendo uma elevada correlação com a mesma (Emanuelson *et al.*, 1987; Pyörälä, 2003; Grönlund *et al.*, 2005; Smith, 2009).

1.5.7.2. Lactose

No decorrer da mastite, há uma perda da capacidade da biossíntese de lactose, verificando-se uma redução desta aquando da inflamação (Pyörälä, 2003; Berning & Shook, 1992).

A sua variação ao longo de uma lactação e de uma para outra não é muito expressiva, sendo um facto a favor na sua utilização como parâmetro para o diagnóstico da mastite (Pyörälä, 2003). Contudo, a descida dos valores de lactose numa mastite, não são expressivos o suficiente para se considerar um parâmetro confiável (Pyörälä, 2003; Andrews *et al.*, 2008).

Berning & Shook (1992) compararam valores de CCS, de lactose e NAGase e concluíram que, apesar de alguns trabalhos sugerirem que a lactose tem uma elevada precisão do diagnóstico da mastite, o seu estudo não comprovou tal sugestão, referindo ainda que a lactose não foi útil no diagnóstico de mastite. Referem também uma melhor resposta em relação à NAGase, comparativamente à da lactose, aquando de uma IIM.

1.5.8. Polymerase chain reaction (PCR)

Devido às limitações da cultura bacteriológica no diagnóstico de mastite, vários estudos (Kubota *et al.*, 2007; Koskinen *et al.*, 2010; Schwaiger *et al.*, 2012) têm surgido com o objectivo de demonstrar que o PCR e suas derivações podem ser uma boa alternativa. As vantagens do PCR incluem rapidez e elevada sensibilidade em relação à cultura bacteriológica. Contudo, possui também diversas desvantagens/limitações, tais como a presença de inibidores de ácido desoxirribonucleico (DNA) polimerase no leite, detecção apenas de determinadas espécies pela utilização de *primers* específicos e a possível detecção de células inviáveis (e, portanto, não causadoras de mastite), mas cujo DNA está presente nas amostras (Kubota *et al.*, 2007; Koskinen *et al.*, 2010; Schwaiger *et al.*, 2012).

Para contornar estas limitações, foram desenvolvidos novos métodos e derivações de PCR:

➤ Kubota *et al.* (2007) refere que a presença de células somáticas pode inibir o PCR e, por isso, no seu estudo utilizou sílica modificada com aminogrupos, para separar as células somáticas de *Staphylococcus aureus* das amostras, realizando uma variação de PCR com obtenção de resultados com sucesso.

➤ Koskinen *et al.* (2010) comparou o uso de Real-time PCR modificado, capaz de identificar onze espécies/grupos de bactérias causadoras de IIM, com a utilização da cultura bacteriológica. Concluiu que além de ser mais rápido, este novo método tem também uma sensibilidade mais elevada, comparativamente à cultura bacteriológica.

➤ Schwaiger *et al.* (2012) aplicou, pela primeira vez, um novo método, o PCR-*single strand conformation polymorphism* (PCR-SSCP), que detecta todas as bactérias e comunidades bacterianas na investigação de amostras de leite. Este método utiliza *primers* universais que identificam um fragmento específico de um gene bacteriano. Foi demonstrado que este método é aplicável nestes casos, com algumas modificações no protocolo de extracção do DNA. Foi ainda capaz de identificar *Mycoplasma* spp, o que muitas vezes não é possível na cultura bacteriológica, por esta ser uma bactéria fastidiosa e de crescimento lento.

Todavia, todos estes estudos referem que o uso do PCR e suas derivações deve ser cauteloso pelas suas limitações, tornando necessárias mais pesquisas e estudos para a sua optimização.

1.5.9. Termografia infravermelha

A termografia infravermelha (TIV) é uma técnica sofisticada, desenvolvida originalmente para objectivos militares e industriais. Diversos estudos têm sido realizados para a detecção de doenças infecciosas e monitorização do bem-estar animal através desta técnica que, apesar de não detectar a etiologia de nenhuma doença, revela a sua presença (Polat *et al.*, 2010).

No estudo realizado por Polat *et al.* (2010), a TIV foi proposta como uma técnica não invasiva e rápida na detecção de mastite subclínica. Foram identificados os casos de mastite subclínica e de vacas saudáveis pela CCS, sendo depois submetidos à TIV. Nos casos de mastite subclínica, a temperatura do úbere foi, em média, 2,35°C superior à dos úberes saudáveis. Ficou concluído que esta técnica é suficientemente sensível para a detecção de alterações de temperatura da pele do úbere, causadas por mastite subclínica. No entanto, outros factores que podem causar também elevação da temperatura do úbere, não foram incluídos neste estudo.

1.6. Tratamento

Sendo a mastite uma doença maioritariamente causada por bactérias, o seu tratamento baseia-se, essencialmente, no uso de agentes antimicrobianos. A sua utilização deve ser comedida, cabendo ao Médico Veterinário passar essa informação aos produtores (Quinn *et al.*, 2011).

Existe uma grande variedade de antibióticos utilizados no tratamento de mastite, cuja escolha é realizada em função do agente envolvido. Esta baseia-se nos resultados de antibiogramas, os quais nos indicam qual o agente antimicrobiano mais adequado. No entanto, numa primeira fase, a escolha pode ancorar-se no historial do rebanho e nos sinais clínicos (Quinn *et al.*, 2011).

O tratamento pode ser administrado via intramamária ou via parenteral. A primeira é a mais utilizada, uma vez que possibilita a obtenção de concentrações terapêuticas no leite. Por outro lado, a via parenteral é muitas vezes empregue no tratamento de infecções agudas por *Staphylococcus aureus* e em casos severos de mastite por *Escherichia coli* (Blowey & Edmondson, 2010; Quinn *et al.*, 2011).

A Tabela 3 apresenta alguns agentes antimicrobianos utilizados no tratamento da mastite e os respectivos agentes etiológicos, contra os quais actuam e a resposta da mesma ao tratamento.

Nos animais em lactação o tratamento é geralmente realizado para infecções clínicas. Por sua vez, a terapia de secagem, administrada no momento homónimo, é utilizada para o tratamento de infecções adquiridas ao longo da lactação, sobretudo na fase final, geralmente, subclínicas, por agentes ambientais como o *Streptococcus uberis*, no tratamento de mastites contagiosas, como por *Staphylococcus aureus* e ainda para reduzir o número de novas infecções no período seco (Robert *et al.*, 2006; Blowey & Edmondson, 2010; Quinn *et al.*, 2011).

Agente	Antibiótico	Comentário
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cefalosporina, cloxacilina, eritromicina, penicilina (se sensível), penicilina com novobiocina, pirlimicina, tetraciclina, tilosina, tilmicosina.	Uma vez que a penetração do antibiótico no local de infecção é ineficiente, a recuperação clínica não é assegurada e a eliminação da bactéria é imprevisível.
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Cefalosporina, cloxacilina, macrólidos, penicilina.	O tratamento é eficaz durante a lactação e a eliminação da bactéria é possível através de terapia intensiva.
<i>Mycoplasma bovis</i>	Tetraciclina, tilosina.	Uma vez que a terapia antibiótica é geralmente ineficaz, o controlo é feito pelo refúgio dos animais afectados.
<i>Escherichia coli</i>	Ampicilina–cloxacilina, cefalosporinas, gentamicina, marbofloxacin, tetraciclina.	A utilização de antibióticos é questionável, no entanto, pode ajudar na recuperação de animais com baixa imunidade, sendo a terapia de suporte de extrema importância nos casos agudos.
<i>Streptococcus ambientais</i>	Ampicilina, cefalosporinas, cloxacilina, novobiocina, penicilina, pirlimicina, tetraciclina, tilmicosina.	Os casos clínicos têm boa resposta ao tratamento por via intramamária.

Tabela 3 – Agentes bacterianos e respectivos tratamento e resposta (Adaptada de Quinn et al., 2011).

1.7. CONTROLO E PREVENÇÃO DA MASTITE

Para o controlo e prevenção da mastite nas explorações devem ser implementadas medidas que dependem do tipo de microrganismos prevalentes na exploração, *i. e.*, se são contagiosos ou ambientais. (Radostits *et al.*, 2002; Quinn *et al.*, 2011)

Foi sugerido pelo NIRD (National Institute for Research in Dayring) e adoptado pelo NMC (National Mastitis Council) um plano geral de cinco pontos, que visa, principalmente, o controlo da mastite contagiosa. São eles:

- Procedimentos adequados de ordenha e higiene do úbere
- Manutenção e uso adequado do equipamento de ordenha
- Maneio e terapia da vaca seca
- Terapia adequada das mastites durante a lactação
- Refúgio das vacas crónicas

Uma vez que os cinco pontos abrangem essencialmente a mastite contagiosa, observou-se uma alteração nas incidências dos agentes causadores de mastite. Agentes ambientais, como os coliformes e *Streptococcus uberis*, aumentaram as suas incidências em detrimento de agentes contagiosos como o *Staphylococcus agalactiae* e o *Staphylococcus aureus* (Bradley & Green, 2001).

Este plano foi mais tarde alargado para dez pontos, compreendendo a mastite contagiosa e ambiental e a monitorização da mastite em geral (Radostits *et al.*, 2002; Bradley & Green, 2010; NMC).

1.7.1. Plano de controlo do NMC²

De seguida é apresentado o plano de dez pontos adoptado pelo NMC:

1. Estabelecimento de metas para a saúde do úbere

Estabelecer metas realistas para a média de CCS ou *score* linear do rebanho e taxa de mastite clínica; rever os objectivos em tempo útil com a equipa de aconselhamento (Médico Veterinário, produtor, trabalhadores, pessoal da ordenha e consultores); priorizar mudanças de gestão para atingir as metas estabelecidas.

2. Manutenção de um ambiente limpo, seco e confortável

Assegurar a dimensão correcta e desenho das camas e espaços livres suficientes para o número de vacas na exploração; manutenção das camas e parques limpos, secos e confortáveis, através de um bom maneio; manter as áreas de circulação limpas e secas; assegurar o bom funcionamento do sistema de ventilação; assegurar zonas de descanso não contaminadas às vacas em pastoreio; controlo dos factores ambientais, como calor e frio; assegurar a posição de estação dos animais após a ordenha, oferecendo-lhes água e comida.

3. Procedimentos de ordenha adequados

Examinar os primeiros jactos de leite facilitando, a detecção precoce da mastite clínica e a descida do leite; assegurar que os tetos são limpos e secos antes da ordenha; desinfetar os tetos antes da ordenha por imersão completa durante 30 segundos e posterior secagem com toalha individual ou toalhete de papel; utilizar luvas limpas durante o processo de ordenha, limitando a transmissão de agentes contagiosos; colocar as tetinas no tempo de 90

² Disponível em www.nmconline.org/docs/NMCchecklistInt.pdf

segundos, contados a partir do início da preparação do úbere; ajustar as tetinas durante a ordenha, prevenindo a entrada de ar no sistema; desligar o sistema de vácuo primeiro e retirar as tetinas depois; desinfetar os tetos imediatamente após a remoção das tetinas, assegurando uma completa imersão; vacas com IIM confirmadas devem ser ordenhadas por último.

4. Manutenção e uso adequado do equipamento de ordenha

Instalar ou actualizar o equipamento de acordo com a ISO 5707 (International Organization for Standardization, “Milking machine installations–Construction and performance”); manutenção e avaliação regular do funcionamento do equipamento de ordenha de acordo com as instruções do fabricante, através de métodos dinâmicos de avaliação e formulário apropriado; substituição das tetinas e outros materiais de borracha ou plástico, regularmente de acordo com as instruções do fabricante; substituição imediata de tubos danificados ou partidos; lavar minuciosamente e desinfetar o equipamento após cada ordenha.

5. Bom sistema de registos

Registrar, para cada caso de mastite clínica, a identificação da vaca, data de detecção, dias de lactação, quarto(s) afectado(s), número e tipo de tratamento, resposta ao mesmo, intervalo de segurança e bactéria causadora (caso tenha sido realizada cultura de amostra na exploração ou em laboratório); utilizar sistema de registo computadorizado ou manual para gerir a informação como CCS individuais, a prevalência e a incidência de mastite subclínica.

6. Maneio adequado da mastite clínica durante a lactação

Desenvolver e implementar, com a equipa, um protocolo de tratamento de mastite clínica adequado ao rebanho; ponderar cautelosamente as diversas opções de custo do tratamento; recolher amostra de leite para cultura, antes do tratamento, para que os antibiogramas possam ser utilizados num momento apropriado; empregar regime de terapêutica apropriado, utilizando medicamentos de acordo com o protocolo ou recomendados pelos consultores de saúde; antes de realizar o tratamento, desinfetar o teto com substância germicida e a ponta do teto com zaragatoa embebida em álcool; na infusão dos antibióticos intramamários, utilizar uma dose única pelo método de inserção parcial; não tratar infecções crónicas não responsivas; observar o intervalo de segurança do antibiótico utilizado, conforme indicado no rótulo. Se forem utilizados outros medicamentos, seguir as instruções do Médico

Veterinário (nomeadamente tratamento sistémico de mastite por coliformes); seguir sempre as instruções de armazenamento e observar as datas de validade dos medicamentos; identificar, com precisão as vacas tratadas e registar todos os tratamentos; quando necessário, testar o leite para presença de substâncias inibidoras antes da sua expedição.

7. Maneio efectivo da vaca seca

Diminuir a composição energética da ração no final da lactação para, assim, baixar a produção de leite antes da secagem; secar as vacas abruptamente e realizar o tratamento de secagem em cada quarto imediatamente após a última ordenha; desinfectar o teto com substância germicida e a ponta do teto com zaragatoa embebida em álcool antes da infusão; tratar todos os quartos com antibiótico de secagem de longa acção, disponível e aprovado e/ou com selante interno de tetos, aprovado; utilizar o método de inserção parcial para a infusão; desinfectar os tetos, por imersão, imediatamente após o tratamento, utilizando qualquer desinfectante pós ordenha, aprovado; providenciar uma nutrição adequada à vaca seca, para estimular o sistema imune; manter o meio ambiente limpo, seco e confortável de maneira a minimizar a exposição a microrganismos patogénicos; em situações de elevada exposição a agentes ambientais, utilizar um selante de tetos interno ou externo em adição ao tratamento antibiótico; em rebanhos com problemas de mastites por coliformes, administrar vacina, seguindo as instruções do fabricante; tosquiar os flancos e o úbere, para remover o excesso de pêlo.

8. Manutenção da biossegurança para agentes contagiosos a identificação das vacas com infecções crónicas

Requerer dados de CCS individuais e do tanque. Nos animais suspeitos, devem ser utilizados outros meios de diagnóstico para identificar casos de mastite subclínica, antes da compra de vacas; se possível, recolher amostras de leite para cultura, antes da compra; isolar as vacas recentemente compradas e ordenhar em separado até haver certeza da inexistência de IIM; colocar em sequestro as vacas com CCS ou *score* linear persistentemente elevados (i.e., CCS maiores que 200 000 cél/ml ou *score* linear maior ou igual a 4 em alguns meses) e observar a resposta ao tratamento de secagem ou outra terapêutica recomendada; identificar ou refugar com infecções persistentes por *Staphylococcus aureus* ou por outros microrganismos não responsivos a antibióticos (*Mycoplasma* spp., *Nocardia* spp.,

Pseudomonas spp., ou *Arcanobacterium pyogenes*); ter em consideração o estado de saúde do úbere das primíparas uma vez que pode interferir na biossegurança do rebanho.

9. Monitorização regular do estado de saúde do úbere

Aderir a um programa de CCS individuais ou usar outros métodos para monitorizar as infecções subclínicas; em vacas suspeitas de infecção, utilizar um método sensível para o diagnóstico de mastite, em períodos de maior risco (por exemplo, no início da lactação); monitorizar a distribuição de vacas com altas CCS e taxas de variação para contagens elevadas; realizar culturas bacteriológicas regulares, dos casos clínicos e das vacas com CCS elevadas; monitorizar a saúde do úbere do rebanho através do contraste leiteiro; calcular com regularidade, as taxas de mastite clínica e a sua distribuição, tendo especial atenção a infecções das novilhas; utilizar as CCS e registos de mastite clínica para avaliar os protocolos de tratamento e tomar decisões.

10. Revisão periódica do programa de controlo

Requerer avaliações objectivas do Médico Veterinário e pessoas ligadas à indústria; a utilização de uma abordagem passo a passo e de um formulário *standard* pode ser útil; para esta revisão, deve ter-se em conta toda a equipa da exploração, como o Médico Veterinário, o produtor, os trabalhadores, o pessoal da ordenha e os consultores.

A implementação de programas de controlo da mastite tem diferentes resultados de rebanho para rebanho. Estas diferenças devem-se, sobretudo, ao facto de algumas explorações poderem ter já adoptado algumas medidas de controlo e estratégias de reprodução e de refugo, do nível de produção e dos custos associados. Além disso, os produtores têm entre si opiniões diferentes acerca dos programas, adoptando as medidas que acham mais adequadas ao seu rebanho (Østergaard *et al.*, 2005).

1.8. IMPACTO ECONÓMICO DA MASTITE

A mastite é considerada uma das doenças mais dispendiosas no que diz respeito à produção leiteira. Os custos associados a esta doença são resultado de uma diminuição da produção e, portanto, de um não ganho e de despesas associadas como, por exemplo, relativamente ao controlo e ao tratamento (Radostits *et al.*, 2002; Seegers *et al.*, 2003; Smith, 2009).

Radostis *et al.* (2002) refere seis pontos que justificam as perdas económicas:

- ✓ Diminuição da produção de leite;
- ✓ Leite rejeitado por mastite clínica ou por tratamento;
- ✓ Custo de reposição de vacas enviadas para refugio;
- ✓ Trabalho extra necessário para o tratamento e monitorização;
- ✓ Serviços veterinários de tratamento e controlo;
- ✓ Custo do programa de controlo.

A diminuição da produção de leite e custos associados devido a mastites clínicas e subclínicas é considerada a maior causa de prejuízo económico devido a doença (Seegers *et al.*, 2003). Seegers *et al.* (2003) refere ainda que devem ser tidas em conta também as penalizações ou perdas de prémios relativos às CCS no tanque e presença de substâncias inibidoras no leite.

Segundo estimado pela SEGALAB³ (Laboratório de Sanidade Animal e Segurança Alimentar), o impacto económico da mastite em explorações leiteiras da região de Entre Douro e Minho é anualmente de 256 euros por vaca, por exploração.

³ Disponível em <http://www.segalab.pt/web/guest/23>

2. OBJECTIVOS

Questão de investigação - Será que os agentes causadores de mastite têm influência nas CCS?

Objectivo Geral - Avaliar a relação entre as CCS e os agentes causadores de mastite em amostras de leite provenientes de explorações leiteiras da região de Entre Douro e Vouga.

Objectivos específicos

- Determinar quais os agentes causadores de mastite mais prevalentes em amostras de leite provenientes de explorações da região de Entre Douro e Vouga;
- Avaliar a relação entre as CCS e o objectivo da análise, em amostras de leite provenientes de explorações da região de Entre Douro e Vouga.
- Avaliar a relação entre os agentes causadores de mastite e o objectivo da análise em amostras de leite provenientes de explorações da região de Entre Douro e Vouga.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. RECOLHA DE DADOS

3.1.1. Fonte de dados

Para a obtenção dos dados deste trabalho, recorreu-se ao arquivo de resultados de análises de leite para diagnóstico de mastite, solicitadas por produtores da Proleite⁴, no período de 1 de Outubro de 2012 a 31 de Março de 2013.

Para cada amostra de leite são registados as datas de entrada e do resultado da análise e o objectivo da análise.

Entende-se por objectivo da análise a terapia de secagem (Secagem) ou o tratamento de mastite (Tratamento).

O resultado da análise compreende: CCS, agentes identificados e respectivos antibiogramas. No Apêndice I estão descritas as técnicas utilizadas para a cultura microbiológica, identificação dos agentes e CCS.

3.1.2. Informatização dos dados

Os dados referentes a estas amostras foram informatizados para uma folha de cálculo do programa Microsoft Office Excel 2007 (no Apêndice II pode observar-se parte desta folha de cálculo). Fez-se uma uniformização dos dados para compatibilidade com o programa IBM SPSS Statistics 20.

3.2. SELECÇÃO DA AMOSTRA

Para a selecção da amostra deste estudo foram utilizados dois critérios de exclusão:

- Não ter identificação nem crescimento.
- Ter dentificação de 3 ou mais colónias diferentes, uma vez que estas amostras são consideradas contaminadas (Bexiga, s.d.; Smith, 2009; Blowey & Edmondson, 2010).

⁴Proleite - Cooperativa Agrícola de Produtores de Leite CRL (<http://www.proleite.com.pt/proleite/proleite/proleite/pt/index>)

3.3. ANÁLISE DA AMOSTRA EM ESTUDO

3.3.1. Prevalência dos agentes

Foram calculadas as prevalências dos agentes identificados.

Optou-se por apresentar apenas os mais prevalentes devido ao elevado número de agentes. Para isso utilizou-se como critério de inclusão ter uma prevalência maior que 1,5% ou estar presente em número superior a 10.

Para o cálculo das prevalências dos diferentes agentes, procedeu-se à análise de frequências dos mesmos utilizando o IBM SPSS Statistics 20, sendo que:

$$\text{Prevalência (P)} = \frac{\text{número de amostras relativas a um determinado agente}}{\text{número total de amostras identificadas}}$$

Posteriormente foi elaborado o gráfico de prevalências utilizando o programa Microsoft Office Excel 2007.

3.3.2. Relações entre CCS e os agentes; entre CCS e objectivo da análise e entre os agentes e objectivo da análise

Analisou-se se existia ou não uma relação entre as CCS e os agentes causadores de mastite mais prevalentes; entre as CCS e o objectivo da análise e entre os agentes causadores de mastite e o objectivo da análise. Nesta fase, foram utilizados apenas os sete primeiros agentes mais prevalentes para facilitar a realização dos testes estatísticos.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística deste estudo, foi utilizado o programa informático IBM SPSS Statistics 20.

De forma a verificar a existência duma relação entre as CCS e os agentes mais prevalentes de mastite recorreu-se ao teste Kruskal-Wallis. Para verificar a relação entre as CCS e os dois grupos Secagem e Tratamento aplicou-se o teste Mann-Whitney. Para verificar se existia uma relação entre os agentes mais prevalentes e os dois grupos Secagem e Tratamento, foi utilizado o teste do Chi-Quadrado.

4. RESULTADOS

4.1. PREVALÊNCIAS

No Gráfico 2, são demonstrados os dezanove agentes bacterianos mais prevalentes, e as respectivas prevalências em percentagem, sendo que o número total de amostras é de 608. Os restantes agentes identificados estão contidos em “outras”. Esta opção foi tomada pelo grande número de bactérias identificadas.

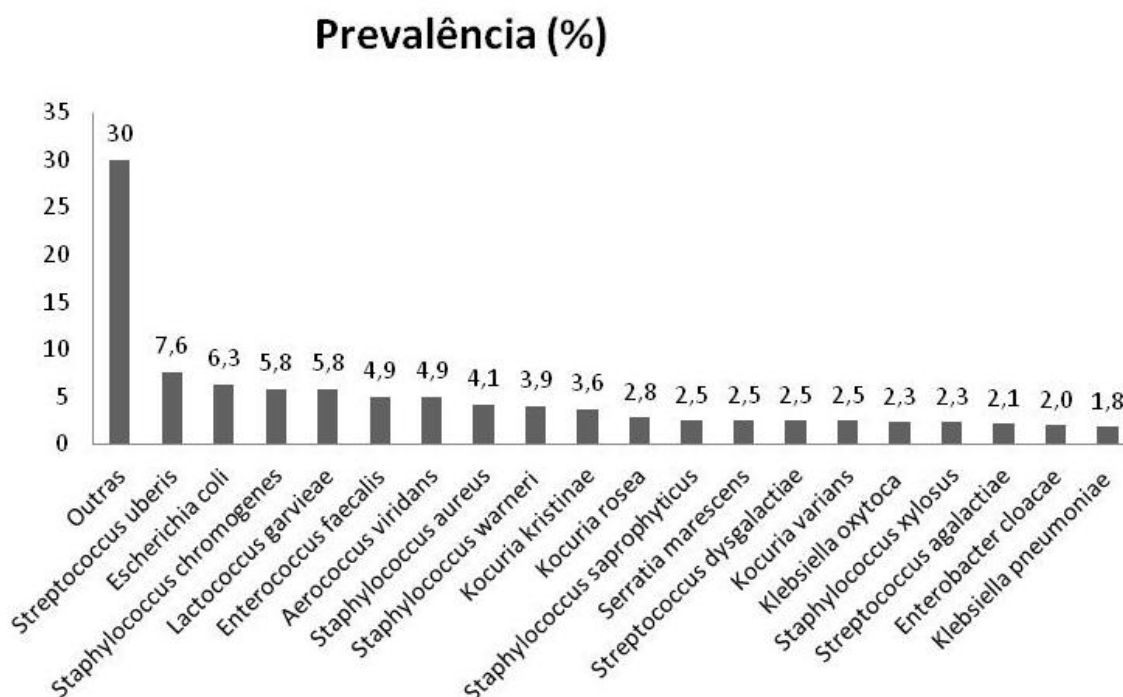


Gráfico 2 – Bactérias mais prevalentes e respectiva prevalência.

4.2. RELAÇÃO ENTRE CCS E OS AGENTES

Para a avaliar a relação entre as contagens de células somáticas no leite e os agentes mais prevalentes de mastite (Gráfico 3), preconiza-se a utilização do teste One-way ANOVA para amostras independentes. Inerente à aplicação deste teste, está a verificação de normalidade. O teste de Kolmogorov Smirnov sugere que a distribuição dos grupos não é normal ($p < 0,001$). Uma vez que não se verifica a normalidade, opta-se pelo teste alternativo Kruskal-Wallis. Este teste rejeita a hipótese nula, significando a existência de diferenças estatísticas entre as Contagens de células somáticas e os diversos agentes ($p < 0,001$).

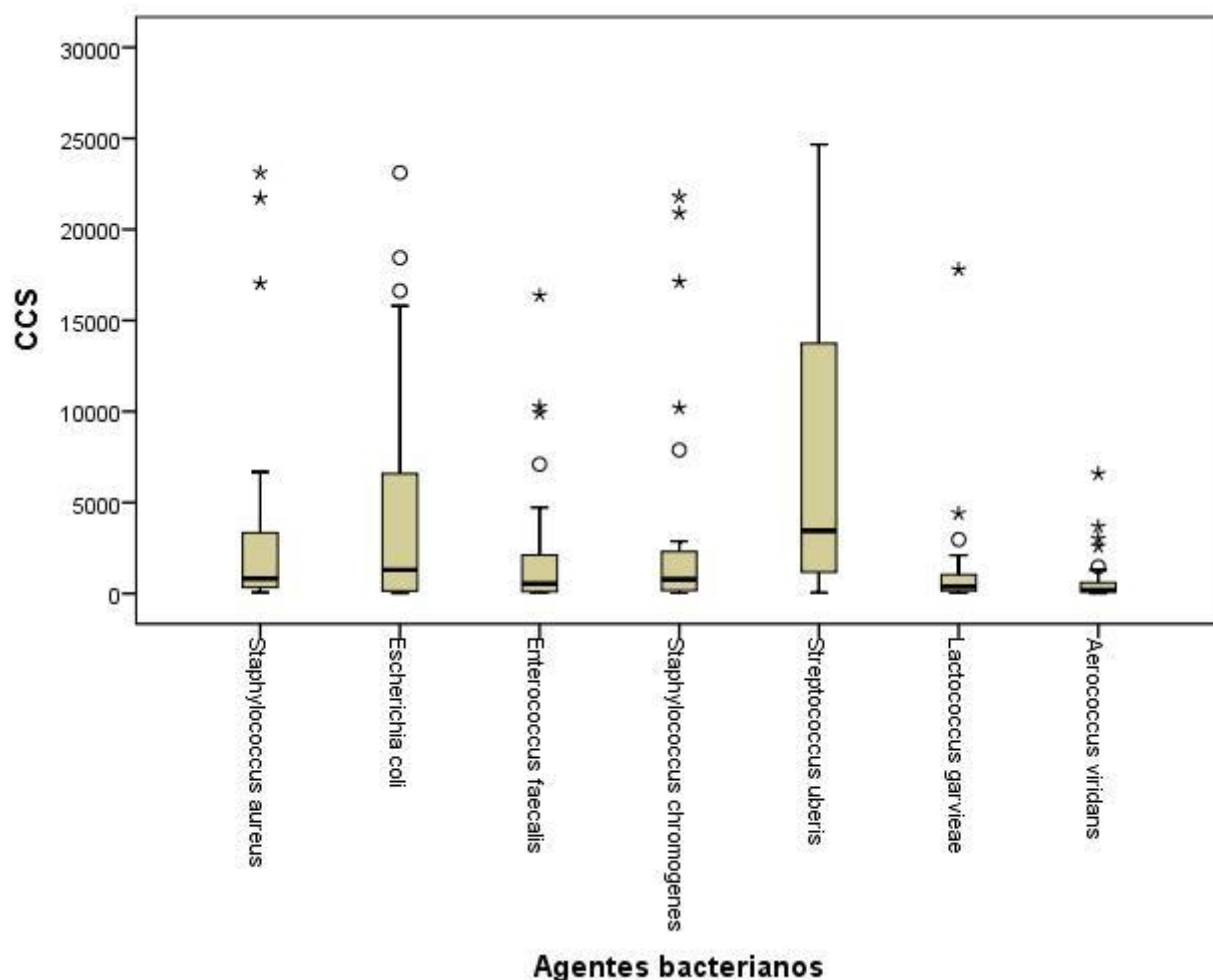


Gráfico 3 – Comparação entre as CCS dos sete agentes mais prevalentes de mastite

4.3. RELAÇÃO ENTRE CCS E O OBJECTIVO DA ANÁLISE

Para avaliar a relação entre as contagens de células somáticas no leite e o objectivo da análise (Secagem ou Tratamento) (Gráfico 4), preconiza-se a utilização do teste t para amostras independentes. Inerente à aplicação deste teste está a verificação de normalidade. O teste de Kolmogorov Smirnov sugere que a distribuição quer do grupo de Secagem ($p < 0,001$), quer do de Tratamento ($p < 0,001$) não é normal.

Assim, efectuou-se a alternativa não paramétrica: o teste de Mann Whitney. Este teste sugere que existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos Secagem e Tratamento ($p < 0,001$)

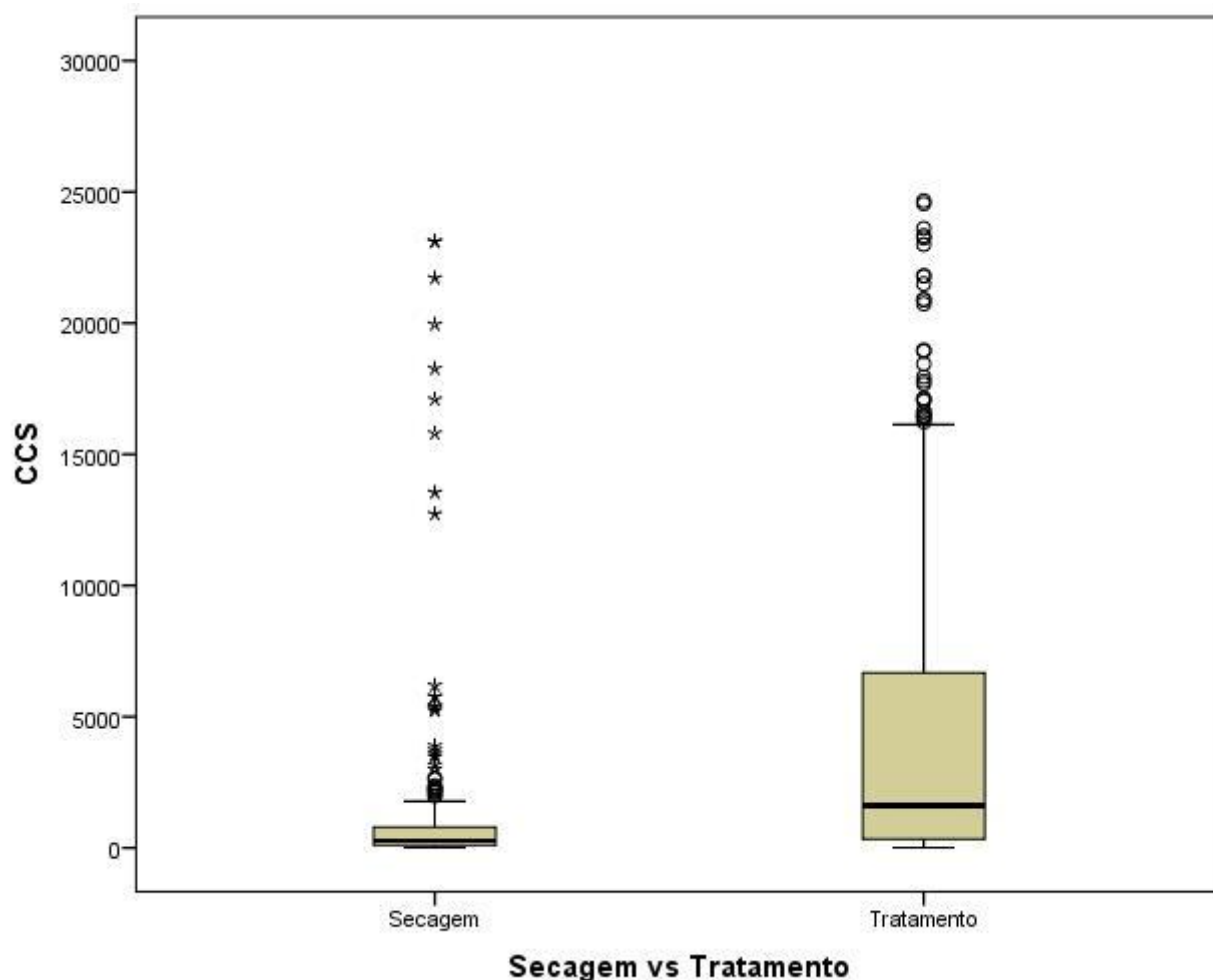


Gráfico 4 - Comparação das médias das CCS entre vacas para Secagem e para Tratamento

4.4. RELAÇÃO ENTRE OS AGENTES E O OBJECTIVO DA ANÁLISE

Para avaliar a relação entre os agentes mais prevalentes de mastite e o objectivo da análise (Secagem ou Tratamento), preconiza-se a utilização do teste Chi-Quadrado. Este teste sugere que existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos ($p < 0,001$).

Verifica-se que, relativamente ao *Staphylococcus aureus*, existem mais casos de mastite no grupo Secagem (18 casos) relativamente ao grupo Tratamento (6 casos). Em relação ao *Streptococcus uberis*, existem mais casos de mastite no grupo Tratamento (35 casos) relativamente ao grupo Secagem (10 casos).

Em resumo, na Tabela 4, estão todos os resultados obtidos neste estudo:

		Classificação	Prevalência	Médias CCS (×10 ³ cél/ml)	Relação Estatística		
					CCS - Agente	CCS - Objectivo da Análise	Agente Objectivo da Análise
Agentes	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Contagioso de maior importância	5,8	3373,28	Diferenças estatisticamente significativas (p<0,001)	-	Diferenças estatisticamente significativas (p<0,001)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Contagioso de menor importância	4,1	3871,25			
	<i>Streptococcus uberis</i>		7,6	9249,61			
	<i>Escherichia coli</i>	Ambiental de maior importância	6,3	4355,93			
	<i>Enterococcus faecalis</i>		4,9	2226			
	<i>Lactococcus garviae</i>		5,8	1215,85			
	<i>Aerococcus viridians</i>	Ambiental importância indefinida	4,9	765,03			
Objectivo da Análise	Tratamento	-	-	5039	-	Diferenças estatisticamente significativas (p<0,001)	
	Secagem			1325			

Tabela 4 – Resumo dos resultados do estudo

5. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Para a discussão dos resultados deste estudo, é necessário ter em conta as suas limitações. A informação foi recolhida a partir de uma base de dados já existente e não especificamente a propósito do presente estudo. A mastite e as CCS dependem de inúmeros factores, cuja análise não foi possível ter em conta neste estudo.

Em relação às prevalências obtidas no presente estudo, e considerando apenas os mais prevalentes, os SCN (*Staphylococcus chromogenes*, *S. warneri*, *S. saprophyticus* e *S. xylosus*) parecem ser os microrganismos em maior número, com uma prevalência de 14,5%. Este resultado está em concordância com Smith (2009), que afirma que este grupo é o mais isolado de secreções mamárias de vacas em lactação, de vacas secas e de novilhas próximas do parto. De Vlieghe *et al.* (2012), refere ainda que os SCN são a causa mais predominante de IIM e mastite subclínica em novilhas próximas do parto.

Segundo Quinn *et al.* (2011), as infecções da glândula mamária por estas bactérias são mais prevalentes em rebanhos que não praticam a desinfecção dos tetos por imersão nem a terapia de secagem. Por outro lado, e de acordo com Blowey & Edmondson (2010), estas bactérias colonizam a pele, canal e ponta do teto, podendo o seu isolamento apresentar apenas a contaminação da amostra por má técnica de recolha e não propriamente a mastite.

De seguida, com prevalências de 7,6% e 6,3%, estão o *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli*, respectivamente. Segundo Quinn *et al.* (2011), sendo estas bactérias consideradas ambientais, são os organismos mais frequentemente isolados de casos de mastite clínica em diversos países. No presente estudo – excluindo o grupo “outras”, os coliformes que não *E. coli* e considerando o grupo SCN como o mais prevalente – estas bactérias ocupam o segundo e terceiro lugares. No entanto, são os agentes ambientais mais prevalentes neste estudo, concordando com Quinn *et al.* (2011). Blowey & Edmondson (2010) afirmam que, depois do *S. uberis*, a *E. coli* é o microrganismo ambiental mais prevalente, como causador de mastite, o que está em total consonância com o presente estudo. Afirmam ainda que as IIM por *S. uberis* estão altamente associadas à presença de camas com revestimento de palha. Em relação à *E. coli*, referem que as IIM por esta bactéria, presente em elevado número nas fezes, ocorrem principalmente em vacas estabuladas com condições de higiene pobres e com elevada humidade. De Vlieghe *et al.* (2012), refere o *S. uberis* como responsável por elevadas incidências de mastite em novilhas.

O grupo de *Streptococcus* ambientais causadores de mastite inclui, além do *Streptococcus uberis*, o *S. dysgalactiae* e outros *Streptococcus*, *Enterococcus* como o *E. faecalis* e mesmo o *Aerococcus viridians*, agindo como microrganismos patogénicos oportunistas segundo Smith (2009). Este refere ainda, que estas bactérias são relativamente mais prevalentes em explorações que praticam essencialmente medidas de controlo para agentes contagiosos.

Com respeito ao *Lactococcus garviae*, que neste estudo tem uma prevalência de 5,8%, sendo um dos mais prevalentes, não é frequentemente referido na literatura como causa de mastite. No entanto, segundo Alrabadi (2012), que realizou um estudo acerca do efeito de diversos antibióticos nesta bactéria isolada de productos lácteos, o *L. garviae* foi primeiramente isolado de casos de mastite bovina. Koskinen *et al.* (2010) verifica também no seu estudo, *Lactococcus* spp, em resultado de culturas realizadas de mastites clínicas.

Com uma prevalência de 4,1% apresenta-se o *Staphylococcus aureus*. Segundo Smith (2009), este agente contagioso está presente na maioria das explorações, variando a sua prevalência e o impacto económico que causa. Segundo Quinn *et al.* (2011), mesmo as explorações que adoptam medidas de controlo, têm o *S. aureus* como causa comum de mastite clínica e subclínica. Contudo, Barkema *et al.* (2009) refere que, com a adopção dos programas de controlo, a prevalência de IIM por *S. aureus* tem vindo a diminuir em vários países Europeus.

Em relação aos coliformes que não a *E. coli*, incluindo a *Serratia marescens*, *Klebsiela oxytoca*, *Enterobacter cloacae* e *Klebsiela pneumoniae*, encontram-se com uma prevalência total de 8,6%. Segundo Smith (2009), estes microrganismos são uma grande causa de mastite, concordando com os resultados deste estudo.

Em relação a *Klebsiela* spp., Andrews *et al.* (2008) e Smith (2009) referem que normalmente está associada ao uso de revestimento de camas com serradura.

O *Streptococcus dysgalactiae*, bactéria que gera controvérsia quanto à sua classificação em ambiental ou contagiosa, tem neste estudo uma prevalência de 2,5%. Segundo vários autores (Andrews *et al.*, 2008; Quinn *et al.*, 2011; Smith, 2009), ocupa uma posição intermédia entre os dois grupos, dado que possui características de um e de outro. A sua presença como mais prevalente neste estudo pode, então, significar ora problemas no controlo da mastite ambiental, ora na mastite contagiosa.

No que diz respeito ao *Streptococcus agalactiae* – agente contagioso e com prevalência de 2,1% – sendo um dos menos prevalentes, segundo Quinn *et al.* (2011), esta

bactéria tem sido, nos últimos anos, cada vez menos causa de mastite. Em Barkema *et al.* (2009) afirma-se mesmo que em alguns países com uma indústria leiteira desenvolvida, a maioria das produções estão livres de *S. agalactiae*. Estes factos vão ao encontro do presente estudo.

Embora estejam presentes três espécies de *Kocuria*, *K. rosea*, *K. kristinae* e *K. varians*, como mais prevalentes neste estudo, estas não são frequentemente referidas na literatura como agentes de mastite. Contudo, em De Freitas *et al.* (2012), foram identificados três casos de mastite por *K. kristinae*. As identificações foram realizadas pelo sistema Vitek[®] 2, igualmente utilizado no laboratório da Proleite, onde foram realizadas as identificações referidas neste estudo. Ben-Ami *et al.* (2005), realizou um estudo que reporta a identificação errónea de SCN como sendo *Kocuria* spp., pelo sistema Vitek 2[®]. Por outro lado, Boudewijns *et al.* (2005), comentando Ben-Ami *et al.* (2005), refere que esse erro se deve à utilização das cartas de identificação Vitek[®] 2 ID GPC. Refere ainda que, com o uso das cartas Vitek[®] 2 GP, a identificação é mais confiável. No laboratório da Proleite, são utilizadas as cartas de identificação GP, podendo concluir-se que as *Kocuria* spp. identificadas, são de facto *Kocuria* spp.

Em relação ao objectivo geral deste trabalho – determinar a relação entre as CCS e os agentes mais prevalentes causadores de mastite – verifica-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre os dois parâmetros. Isto significa que as CCS diferem consoante o agente causador de mastite. Este resultado está de acordo com o referido na revisão bibliográfica realizada para este estudo.

De acordo com Harmon (1994) e Radostits *et al.* (2002), os agentes de maior importância causam maiores elevações nas CCS relativamente aos de menor importância.

No presente estudo, os agentes de maior importância encontrados são *Streptococcus uberis* e outros *Streptococcus* ambientais e *E. coli* e outros coliformes. Quanto aos de menor importância, apenas estão presentes SCN. Em relação ao *Aerococcus viridians* e *Lactococcus graviae* não foi possível encontrar informação para a sua classificação em agentes de maior ou menos importância.

No que respeita às CCS, verificam-se maiores valores nos agentes de maior importância, concordando com a bibliografia, com excepção do *Enterococcus faecalis*, que possui contagens menores que o *Staphylococcus chromogenes*, considerado de menor importância.

Pyörälä (2003) afirma que as CCS mais elevadas se verificam em relação ao *S. uberis* e coliformes. Este facto está em concordância com este trabalho em que as maiores contagens se verificam no *S. uberis* seguidas das de *E. coli*.

Em relação ao *Aerococcus viridians*, que segundo Smith (2009) é considerado um *Streptococcus* ambiental, pode deduzir-se que é de maior importância. No entanto, o resultado obtido em relação a este agente não confirma esta suposição.

Quanto ao *Lactococcus garviae*, é impossível aferir algo acerca do seu resultado, pois não foi encontrada informação bibliográfica suficiente.

Apesar de ter sido constatado que os diferentes agentes influenciam as CCS, há que ter em conta que estas não dependem apenas dos mesmos. Existem outros factores, como flutuações das CCS, idade e número de lactações, período de lactação, tipo de manejo, sazonalidade, frequência e tipo de ordenha, método de contagem e, mesmo, a genética, que, com maior ou menor peso, influenciam também as CCS (Harmon, 1994; Pyörälä, 2003; Andrews *et al.*, 2008; Hagsnestam-Nielsen *et al.*, 2009; Malek dos Reis *et al.*, 2011).

Considerando a relação entre as CCS e o objectivo da análise de leite requerida (Tratamento ou Secagem), verifica-se também que existem diferenças estatisticamente significativas.

Segundo Robert *et al.* (2006) e Quinn *et al.* (2011), o tratamento de vacas em lactação destina-se essencialmente a mastites clínicas e a terapia de secagem a mastites subclínicas e prevenção de novas IIM no período seco.

Segundo Van der Borne *et al.* (2011), os animais com maiores CCS têm maior risco de desenvolver mastite clínica em relação aos animais com menores CCS.

Verifica-se, neste estudo, uma média de CCS mais elevada no grupo Tratamento (5040,000 cél/ml) em relação ao grupo Secagem (1326,000 cél/ml). Pode supor-se então que, conforme referido, os animais do grupo Tratamento possuem contagens mais elevadas e que, provavelmente sofrem mastite clínica, confirmando o propósito da análise. Em relação ao grupo Secagem, com contagens mais baixas, supõe-se que os animais têm mastite subclínica, sendo o propósito da análise apenas a terapia de secagem.

No entanto, há que ter em conta todos os factores que influenciam as CCS e não estão contemplados neste estudo e que mesmo em CCS baixas, pode ocorrer mastite clínica (Van der Borne *et al.*, 2011).

Com respeito à relação entre os agentes causadores de mastite e o objectivo da análise (Tratamento ou Secagem), verifica-se a existência de diferenças estatisticamente significativas. Realça-se que em relação ao *Staphylococcus aureus*, existem mais casos de mastite no grupo Secagem (18 casos) comparativamente ao grupo Tratamento (6 casos), e que em relação ao *Streptococcus uberis* existem mais casos de mastite no grupo Tratamento (35 casos) relativamente ao grupo Secagem (10 casos).

Segundo Smith (2009), a maioria das infecções por *S. aureus* é subclínica, apoiando este estudo, uma vez que a terapia de secagem, como referido por Robert *et al.* (2006) e Quinn *et al.* (2011), destina-se essencialmente a mastites subclínicas.

Por outro lado, de acordo com Smith (2009) mais de 50% das infecções por *S. uberis* são clínicas, o que suporta também este estudo, uma vez que, tal como referem Robert *et al.* (2006) e Quinn *et al.* (2011), o tratamento de vacas em lactação se aplica principalmente a mastites clínicas.

6. CONCLUSÃO

Em síntese, confirmou-se a existência de uma relação entre as seguintes variáveis: os agentes causadores de mastite e as CCS, as CCS e o objectivo da análise, e ainda entre os agentes e o objectivo da análise.

Com respeito à relação entre os agentes e as CCS, foi possível determinar que as CCS variam consoante o agente causador de mastite.

Concluiu-se ainda que na relação entre as CCS e o objectivo da análise, as contagens variam em função do objectivo da análise requerida e que este tem relação com o tipo de mastite (clínica ou subclínica)

Relativamente aos agentes e o objectivo da análise, foi possível aferir que os agentes têm influência no tipo de mastite que causam, sendo esta clínica ou subclínica, e que, consequentemente, influenciam o objectivo da análise

Uma vez que este trabalho confirma a informação já publicada acerca deste tema, mas fornece dados relativamente a Portugal, torna-se decerto mais fácil, otimizar o manejo da mastite.

Não sendo utilizada uma amostra representativa do país, mas contendo dados de diversas explorações, este estudo pode ser então, base, para pesquisas futuras, abordando os demais factores que influenciam as CCS e a mastite, contribuindo assim para um melhor controlo da doença.

7. BIBLIOGRAFIA

- Alrabadi, N.I. (2012) The effect of several antibiotics on *Lactococcus garvieae* isolated from Jordanian dairy products, Am J Agric Biol Sci, 7, 468-472
- Andrews, A.H., Blowey, R.W., Boyd, H. & Edde, R.G. (2008) Medicina Bovina. Doenças e Criação de Bovinos (2ª Ed., pp. 276-359) São Paulo, Editora Roca
- Arosa, F.A., Cardoso, E.M. & Pacheco, F.C. (2007) Fundamentos de Imunologia (1ª Ed., pp. 35-61) Lisboa, Lidel
- Bannerman, D.D., Kauf, A.C. W., Paape, M.J., Springer, H.R. & Goff, J.P. (2008) Comparison of Holstein and Jersey innate immune responses to *Escherichia coli* intramammary infection, J Dairy Sci, 91, 2225-2235
- Barkema, H.W., Green, M.J., Bradley, A.J. & Zadoks, R.N. (2009) Invited Review. The role of contagious disease in udder health. J Dairy Sci, 92, 4717-4729
- Barkema, H.W., Schukken, Y. H. & Zadoks, R.N. (2006) Invited Review. The role of cow, pathogen and treatment regiment in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. J Dairy Sci, 89, 1877-1895
- Barnouin, J., Chassagne, M., Bazin, S. & Boichard, D. (2004) Management practices from questionnaire surveys in herds with very low somatic cell score through a national mastitis program in France. J Dairy Sci, 87, 3989-3999
- Ben-Ami, R., Navon-Venezia, S., Schwartz, D., Schlezinger, Y., Mekuzas, Y. & Carmeli, Y. (2005) Erroneous reporting of coagulase-negative staphylococci as *Kocuria* spp. by the Vitek 2 system. J Clin Microbiol, 43(3), 1448-1450
- Berning, L.M. & Shook, G.E. (1992) Prediction of mastitis using milk somatic cell count, N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase and lactose. J Dairy Sci, 1840-1848

Bexiga, R. (s.d.) Saúde do úbere: Investigação de problemas de contagens de células somáticas elevadas. (pp. 2-35) Pfizer Saúde Animal

Blowey, R. & Edmondson, P. (2010) Mastitis Control in Dairy Herds (2nd Ed., pp. 1-266) London, CABInternational

Boudewijns, M., Vandeven, J. & Verhaegen, J. (2005) Viteck 2 Automated system and *Kocuria kristinae*. J Clin Microbiol, 43(11), 5832

Bradley, A.J. & Green, M.J. (2001) An investigation of the impact of intramammary antibiotic dry cow therapy on clinical coliform mastitis. J Dairy Sci, 84, 1632-1639

Carneiro, D.M.V.F., Domingues, P.F. & Vaz, A.K. (2009) Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. Cienc Rural, 39, 1934-1943

Coentrão, C.M., Souza, G.N., Brito, J.R.F., Brito, M.A.V.P. & Lilenbaum, W. (2008) Factores de risco para a mastite subclínica. Arq Bras Med Vet Zootec, 60, 283-288

Cunningham, J.G. (2004) Tratado de Fisiologia Veterinária (3^a Ed., pp. 417-431) Rio de Janeiro, Guanabara Koogan

De Freitas, C.H., Piva, N.V., Dos Santos, P.J., Redu, J.F.M., Gonzalez, H.L. & Nascente, P.S. (2012) Identificação de *Kocuria kristinae* em amostras de leite de vaca com mastite subclínica. Comunicação apresentada no XIV Encontro de pós-graduação da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil

De Haas, Y., Barkema, H.W. & Veerkamp, R.F. (2002) The effect of pathogen-specific clinical mastitis on the lactation curve for somatic cell count. J Dairy Sci, 85, 1314-1323

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. J Dairy Sci, 95, 1025-1040

Djabri, B., Brareille, N. & Beaudreau, F. (2002) Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. *Vet Res*, 33, 335-357

Dufour, S., Fréchette, A. Barkema, H.W., Mussel, A. & School, D.T. (2011) Invited Review. Effect of udder health management practices on herd somatic cell count. *J Dairy Sci*, 94, 563-579

Emanuelson, U., Olson, T., Holmerg, O., Hageltorn, M., Mattila, T., Nelson, L. *et al.* (1987) Comparison of some screening tests for detecting mastitis. *J Dairy Sci*, 70, 880-887

Green, M.J., Bradley, A.J., Medley, G.F. & Browne, W.J. (2008) Cow, farm and herd management factors in the dry period associated with raises somatic cell counts in early lactation. *J Dairy Sci*, 91, 1403-1415

Green, M.J., Green, L.E., Schukken, Y.H., Bradley, A.J., Peeler, E.J., Barkema, H.W. *et al.* (2004) Somatic cell count distributions during lactation predict clinical mastitis. *J Dairy Sci*, 87, 1256-1264

Grönlung, U., Sandgren, C.H. & Waller, K.P. (2005) Haptoglobin and serum amyloid A in milk from dairy cows with chronic sub-clinical mastitis. *Vet Res*, 36, 191-198

Hagnestam-Nielsen, C., Emanuelson, U., Berglund, B. & Strandberg, E. (2009) Relationship between somatic cell count and milk yield in different stages of lactation. *J Dairy Sci*, 92, 3124-3133

Harmon, R.J. (1994) Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J Dairy Sci*, 77, 2103-2112

Haskell, M.J., Cangford, F.M., Jack, M.C., Sherwood, L., Lawrence, A.B. & Rutherford, K.M. (2009) The effect of organic status and management practices on somatic cell counts on UK Dairy farms. *J Dairy Sci*. 92, 3775-3780

Kamphuis, C., Mollenhorst, H., Heesterbeek, J.A.P. & Hogeveen, H. (2010) Detection of clinical mastitis with sensor data from automatic milking systems is improved by using decision-tree induction. *J Dairy Sci*, 93, 3616-3627

Kehrli Jr., M.E. & Shuster, D.E. (1994) Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *J Dairy Sci*, 77, 619-627

Koeck, A., Heringstar, B., Egger-Danner, C., Furest, C., Winter, P. & Furest-Walti, B. (2010) Genetic analysis of clinical mastitis and somatic cell count traits in Austrian Fleckvieh cows. *J Dairy Sci*, 93, 5987-5995

Koskinen, M.T., Wellenberg, G.J., Sampimon, O.C., Holopainen, J., Rothkamp, A., Salmikivi, L. *et al.* (2010) Field comparison of Real-time Polymerase Chain Reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *J Dairy Sci*, 93, 5707-5715

Kubota, M., Hayashi, T., Iwasaki, K., Ohtsuka, H., Kohiruimak, M., Kawamura, S. *et al.* (2007) Rapid and effective method for separation of *Staphylococcus aureus* from somatic cells in mastitis milk. *J Dairy Sci*, 90, 4100-4107

Malek dos Reis, C.B., Barreiro, J.R., Moreno, J.F.G., Porcionato, M.A.F. & Santos, M.V. (2011) Evaluation of somatic cell count thresholds to detect subclinical mastitis in Gyr cows. *J Dairy Sci*, 94, 4406-4412

National Mastitis Council, Recommended Mastitis Control Program. Acedido a 2 de Agosto de 2013 em www.nmconline.org/docs/NMCchecklistInt.pdf

Norberg, E., Hogeveen, H., Korsgaard, I.R., Friggens, N.C. & Sloth, K.H.M.N., Løvendahl, P. (2004) Electrical conductivity of milk: Ability to predict mastitis status. *J Dairy Sci*, 87, 1099-1107

Østergaard, S., Chagunda, M.G.G., Friggens, N.C., Bennedsgaard, T.W. & Klaas, I.C. (2005) A stochastic model simulating pathogen-specific mastitis control in a dairy herd. *J Dairy Sci*, 88, 4243-4257

Polat, B., Colak, A., Cengiz, M., Yannaz, L.E., Oral, H., Bastan, A. *et al.* (2010) Sensivity and specificity of infrared thermography in detection of subclinical mastitis in dairy cows. J Dairy Sci, 3525-3532

Pyörälä, S. (2003) Indicators or inflammation in the diagnosis of mastitis. Vet Res, 34, 565-578

Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., FitzPatrick, E.S., Fannig, S. & Hartigan, P.J. (2011) Veterinary Microbiology and Microbial Disease (2nd Ed., pp. 469-2250) Oxford, Wiley-Blackwell

Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C. & Hinchcliff, K.W. (2002) Clínica Veterinária. Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos (9^a Ed., pp. 541-629) Rio de Janeiro, Guanabara Koogan

Rainard, P. (2003) The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. Vet Res, 32, 647-670

Rasmussen, M.D., Bjerring, M., Justesen, P. & Jepsen, L. (2002) Milk quality on Danish farms with automatic milking systems. J Dairy Sci, 85, 2869-2878

Robert, A., Seegers, H. & Bareille, N. (2006) Incidence of intramammary infections during the dry period without or with antibiotic treatment in dairy cows – A quantitative analysis of published data. Vet Res, 37, 25-48

Schukken, Y.H., Wilson, D.J., Welcome, F., Garrison-Tikofsky, L. & Gonzalez, R.N. (2003) Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. Vet Res, 34, 579-596

Schwaiger, K., Winner, M., Huber-Schlenstedt, R., Felhlings, K., Hölzel, C.S. & Bauer, J. (2012) Hot topic: Bovine milk samples yielding negative or nonspecific results in bacterial culturing – The possible role of PCR-single strand conformation polymorphism in mastitis diagnosis. J Dairy Sci, 95, 98-101

Seegers, H., Fourichon, C. & Beudeau, F. (2003) Production effects related to mastitis and mastitis economics dairy cattle herds. *Vet Res*, 34, 475-491

Smith, B.P. (2009) *Large Animal Internal Medicine* (4th Ed., pp. 1112-1138) St. Louis, MO, Mosby Elsevier

Sørensen, L.P., Mark, T., Madsen, P. & Lund, M.S. (2009) Genetic correlation between pathogen-specific mastitis and somatic cell count in Danish Holsteins. *J Dairy Sci*, 92, 3457-3471

Teixeira, P., Ribeiro, C. & Simões, J. (2008) *Prevenção de Mamites em Explorações de Bovinos Leiteiros. Da teoria à prática*. Acedido a 12 de Setembro de 2013 em www.veterinaria.com.pt/media/Mastites.pdf

Van der Borne, B.H.P., Vernoij, J.C.M., Lupindu, A.M., Van Shaik, G., Frankema, K. Lam, T.J.G.M. & Nielen, M. (2011) Relationship between somatic cell count status and subsequent clinical mastitis in Dutch dairy cows. *Prev Vet Med*, 102, 265-273

Vieira de Sá, M. & Vieira de Sá, F. (1946) *Colecção fontes de riqueza: As vacas leiteiras* (3^a Ed., pp. 290-299) Lisboa, Livraria Clássica Editora

Weiss, D., Weinfurtner, M. & Bruckmaier, R.M. (2004) Teat anatomy and its relationship with quarter and udder milk flow characteristics in dairy cows. *J Dairy Sci*, 87, 3280-3289

Windig, J.J., Ouweltjes, W., ten Napel, J., de Jong, G., Veerkamp, R.F. & De Haas, Y. (2010) Combining somatic cell count traits for optimal selection against mastitis. *J Dairy Sci*, 93, 1690-1701

APÊNDICES

Apêndice I

Análises laboratoriais

Todas as amostras de leite foram processadas no laboratório oficial da Proleite, certificado e acreditado.

As culturas, realizadas em meios selectivos para Gram positivos e Gram negativos, sendo o Columbia CNA e o MacConkey respectivamente.

Os antibiogramas foram realizados em meio Mueller Hinton com os discos disponíveis, destringendo entre o grupo Secagem e o grupo Tratamento.

A identificação dos agentes é feita pelo Vitek[®] 2, com cartas de identificação Vitek[®] 2 GP e GN.

As CCS foram realizadas no Laboratório Interprofissional pelo método da citometria de fluxo.

Apêndice II

Parte da folha de cálculo Microsoft Office Excel 2007 – Informatização dos dados

Exploração	Identificação da Amostra	Data Recepção	Data Resultado	Agentes Identificados	CCS ($\times 10^3$)	AB	Tx/Seca
A	6 1545	01-10-2012	04-10-2012	<i>S. aureus</i>	5421	Rifaximina, Cefquinoma	Seca
A	7 5595	01-10-2012	04-10-2012	<i>E. coli</i>	630	Cefquinoma, Rifaximina	Seca
A	7 5595	01-10-2012	04-10-2012	<i>S. saprophyticus</i>	630	Cefquinoma, Rifaximina	Seca
A	3 PT814785593	06-11-2012	09-11-2012	<i>Serratia marescens</i>	89	Cefquinoma, Rifaximina, Ampicilina	Seca
A	3 PT814785593	06-11-2012	09-11-2012	<i>Enterococcus faecalis</i>	89	Rifaximina, Cefoparazona, Ampicilina	Seca
A	4 PT 114835039	06-11-2012	09-11-2012	<i>Enterococcus faecalis</i>	51	Rifaximina, Cefquinoma, Ampicilina	Seca
A	5 PT514847610	06-11-2012	09-11-2012	<i>Citrobacter freundii</i>	167	Cefquinoma, Cefoparazona, Ampicilina	Seca
A	5 PT514847610	06-11-2012	09-11-2012	<i>S. saprophyticus</i>	167	Cefquinoma, Cefoparazona, Rifaximina	Seca
A	9 PT614826612	18-12-2012	21-12-2012	<i>Serratia marescens</i>	161	Cefquinoma, Cefoparazona, Rifaximina	Seca

B	5 PT914867074	01-10-2012	04-10-2012	<i>Klebsiella oxytoca</i>	17120	Ubrolexin, Penetavet injector, Cefalexina	Tx
B	5 PT914867074	01-10-2012	04-10-2012	<i>S. chromogenes</i>	17120	Cefalexina, Penetavet injector, Ubrolexin	Tx
B	2 PT114156498	30-10-2012	09-11-2012	<i>E. coli</i>	7439	Cefoparazona, Penetavet injector, Ubrolexin	Tx
B	7 PT514143847	18-12-2012	21-12-2012	<i>E. coli</i>	Coag.	Amoxicilina, Cefoparazona, Marbofloxacina	Tx
B	2 PT432251244	21-03-2013	27-03-2013	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1695	Amoxicilina, Cefoparazona, Ubrolexin	Tx
B	2 PT432251244	21-03-2013	27-03-2013	<i>Micrococcus luteus/lylae</i>	1695	Danofloxacina, Ubrolexin, Cefoparazona	Tx
C	1 PT614134922	01-10-2012	04-10-2012	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	107	Ubrolexin, Penetavet injector	Tx
C	1 PT614134922	01-10-2012	04-10-2012	<i>S. chromogenes</i>	107	Penetavet injector, Penicilina, Cefalexina	Tx