

RAQUEL RAMOS GONÇALVES

**EFICÁCIA DA TERAPIA COMBINADA COM
CEFQUINOMA NO TRATAMENTO DE MASTITE
BOVINA**

Orientador: Professor Doutor João Cannas da Silva

Co-orientador: Mestre Maria do Carmo Feliciano

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2013

RAQUEL RAMOS GONÇALVES

**EFICÁCIA DA TERAPIA COMBINADA COM
CEFQUINOMA NO TRATAMENTO DE MASTITE
BOVINA**

**Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de
Mestre em Medicina Veterinária conferido pela
Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Orientador: Professor Doutor João Cannas da Silva
Co-orientador: Mestre Maria do Carmo Feliciano**

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

**Lisboa
2013**

Carlos, onde estiveres, estarás sempre presente no meu coração e pensamento.

"...To live in the hearts we leave behind is not to die..."

by Thomas Campbell (1777-1844)

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador de Estágio, Prof .Dr. João Cannas da Silva, pela paixão profissional e conhecimentos que me transmitiu durante os 6 anos de curso e, em particular, durante o Estágio.

À Mestre Dr^a. Maria do Carmo Feliciano, minha Co-orientadora pela disponibilidade e conhecimentos transmitidos.

À Prof. Dr^a. Ângela Dâmaso, pela paciência, preocupação e pelas tardes de trabalho de campo.

Ao Dr. Caroço pela dedicação, disponibilidade e paciência sempre demonstradas.

Ao Dr. Mauro Bragança, pela ajuda, disponibilidade e apoio estatístico.

À Dr^a Ângela Martins e toda a sua Equipa por todo o apoio, amizade e alargamento de horizontes.

A todos os produtores e respetivos funcionários, que tive o prazer de conhecer durante o estágio, por me deixarem participar no dia-a-dia das explorações.

Aos *meus meninos*, Ana Mafalda Cachapa, Ana Rita Afonso, Carolina Ruivo, Daniel Guimarães, Diogo Macedo, João Carvalho, João Cláudio, Juana Tracana, Kévin Rodrigues, Manuel Rosado, Marta Branco, Mariana Inácio, Rosa Pais e Rui Lacerda, pelas noites de estudo, as diretas, a farra, as patuscadas; enfim, tudo o que tornou estes últimos anos inesquecíveis.

À minha Guigui, pela amizade incondicional, noites de estudo, apoio, reprimendas, conselhos e por todos os momentos que passámos juntas nestes últimos anos. Como diria Carlos Drummond de Andrade: “Fácil é ser colega, fazer companhia a alguém, dizer o que ele deseja ouvir. Difícil é ser amigo para todas as horas e dizer sempre a verdade quando for preciso. E com confiança no que diz”.

À minha homónima Raquel, pela amizade, carinho, apoio, dias de estudo intensivo e pelo tempo que passámos juntas.

À Inês Freitas, pela grande amizade, carinho, preocupação e presença constante na minha vida, mesmo estando em Faculdades e cidades diferentes.

À minha *partner* de Estágio, Filipa Marques pelo companheirismo e amizade de 6 meses cheios de peripécias.

Às minhas BFF's, Ana e Sara que, apesar da ausência pontual, ditada pela azáfama do dia-a-dia, estão sempre presentes quando mais preciso, sem eu pedir e farão sempre parte da minha vida.

Um obrigada muito especial à minha família - À minha Mãe por nunca ter duvidado de mim, ao meu Pai por me fazer lembrar o que é realmente importante, à minha Avó que, desde cedo, se tornou responsável pela minha escolha de vida ao me proporcionar, desde tenra idade, o contacto direto com o “Mundo da Bicharada” e ao meu Avô pela constante preocupação.

Aos restantes membros da família e amigos, que não consigo mencionar aqui todos e tão importantes, o meu grande obrigado por tudo.

RESUMO

A **Mastite** é a afeção mais comum do úbere e consiste na reação inflamatória dos tecidos secretores da glândula mamária, como resposta a lesões traumáticas, infeções bacterianas e fúngicas. É uma das doenças mais observadas em explorações leiteiras, com grande impacto e perdas a nível económico.

O objetivo do presente estudo foi a análise da eficácia da utilização de uma terapia combinada com *Cefquinoma* para o tratamento de mastites, comparando a terapêutica de *Cefquinoma* e outra terapêutica alternativa, o tempo de tratamento aplicado e a evolução do caso clínico.

O estudo foi realizado num total de 80 vacas com mastite clínica em 3 explorações na área de grande Lisboa, tendo sido registados e analisados, para cada caso, qual o tratamento usado (a terapia combinada com *Cefquinoma* ou a terapêutica protocolar estabelecida pela exploração), o tempo de tratamento e a sua evolução clínica (se obteve cura, morte, refugo ou perda de ¼ mamário).

O estudo da eficácia da terapia combinada com *Cefquinoma* pretende contribuir para um melhor conhecimento da eficácia das terapias existentes como coadjuvantes da melhoria da rentabilidade das explorações leiteiras.

Os resultados obtidos permitem estabelecer uma relação positiva entre a taxa de cura e a terapêutica usada.

Palavras-chave: Mastite, *Cefquinoma*, tratamento de mastite, terapia combinada

ABSTRACT

Mastitis is the most common udder pathology and consists of the udder inflammation of the mammary gland secretor tissues, in response to traumatic lesion, bacterial and fungal infections. It is one of the most recurrent problems observed in most dairy farms, being a disease with a major impact and economic losses.

The purpose of this study was to analyze the effectiveness of combined therapy with *Cefquinome* use to treat mastitis. The compared elements have been the therapy with *Cefquinome* and another alternative therapy, the duration of treatment applied and the progress of the case.

The study was conducted in a total of 80 cows with clinical mastitis on 3 farms in the Lisbon area. The data collected was registered and analyzed for each case – treatment used with *Cefquinoma* or the farm established protocol, treatment duration and evolution: cure, death, rejection or lost of mammary quarter.

The study of the effectiveness of *Cefquinome* aims to contribute to a better understanding and applicability of existing therapies as an adjunct to improve dairy farms profitability.

The results obtained allow to establish a positive relation between the cure rate achieved and the used therapy.

Keywords: Mastitis, *Cefquinome*, treatment of mastitis, combined therapy

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AB – Antibiótico

Cl - Cloro

CCS – Contagem de células somáticas

DEFRA - Department for Environment, Food and Rural Affairs, UK

E. coli – *Escherichia coli*

Fenalac – Federação Nacional das Cooperativas de Produtores de Leite

K – Potássio

M. bovis – *Mycoplasma bovis*

ml- Mililitro

Na - Sódio

NOAH – National Office of Animal Health, UK

p – Nível de significância

P. wickerhamii – *Prototheca wickerhamii*

P. zopfii – *Prototheca zopfii*

Score - classificação

Staph. aureus – *Staphylococcus aureus*

S.coagulase negativa – *Staphylococcus coagulase negativa*

S. epidermis – *Staphylococcus epidermis*

S. hyicus – *Staphylococcus hyicus*

S. intermedius – *Staphylococcus intermedius*

S. xylosus – *Staphylococcus xylosus*

Strep. agalactiae – *Streptococcus agalactiae*

S. uberis – *Streptococcus uberis*

TCM – Teste Californiano de Mastites

% - Percentagem

° C – Graus Celsius

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Estrutura da glândula mamária.....	13
1.1.1. Mastite.....	13
1.1.2. Patogénese.....	14
1.2. Resposta inflamatória	15
1.3. Classificação das Mastites.....	16
1.4. Etiologia.....	18
1.4.1. Microrganismos Contagiosos	19
<i>Staphylococcus aureus</i>	19
<i>Streptococcus agalactiae</i>	19
<i>Mycoplasma spp.</i>	20
<i>Corynebacterium bovis</i>	20
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	21
1.4.2. Microrganismos Ambientais.....	21
Coliformes	21
<i>Pseudomonas spp.</i>	22
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	23
<i>Streptococcus uberis</i>	23
<i>Prototheca spp.</i>	24
Fungos.....	25
1.5. Importância da Mastite na Saúde Pública	26
1.6 Deteção e Diagnóstico de Mastites	27
Testes de Campo	27
Testes Laboratoriais	31
1.7. Fatores de risco.....	32
Fatores de risco do animal.....	32
Fatores de risco do ambiente.....	34
1.8. Terapia Combinada.....	35
1.9 Objetivos.....	36
2. MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1 Caracterização da amostra	37
2.2 Protocolo utilizado.....	37
2.3 Tratamento estatístico e determinação do tamanho da amostra	37
3. RESULTADOS	39

4.	DISCUSSÃO	41
5.	CONCLUSÃO	45
6.	BIBLIOGRAFIA.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do úbere (Adaptado Ramos, A. C., 2010)	13
Figura 2 – Patogénese e defesa do úbere (Wattiaux, M. A., n/d)	15
Figura 3 - Mastite Aguda com edema do quarto afetado (Blowey & Weaver, 2011)	17
Figura 4 – Mastite Crónica: abscessos no parênquima mamário causados <i>Staphylococcus</i> (Blowey & Weaver, 2011)	18
Figura 5 – Palpação do úbere (Hurley, W. L., 2010)	27
Figura 6 - Quarto posterior direito tumefacto devido a Mastite (Hurley, W. L., 2010)	27
Figura 7 – Imagem de alguns flocos (setas vermelhas) num recipiente de fundo branco (Hurley, W. L., 2010)	28
Figura 8 – Recipiente de fundo escuro com bastantes coágulos e um leite seroso, correspondendo a uma Mastite Aguda (Hurley, W. L., 2010)	28
Figura 9 – Raquete e reagente, utilizados na realização do TCM (Hurley, W. L., 2010)	29
Figura 10 - Sistemas de deteção da condutividade elétrica e registo diário em cada ordenha, transmitindo a informação para o computador a fim de estabelecer registos diários da condutividade (Saran & Chaffer, 2000)	30

ÍNDICE TABELAS

Tabela 1- Agentes etiológicos ambientais e contagiosos (Adaptado de Blowey & Edmondson, 2010)	18
Tabela 2- Bactérias com importância para a Saúde Pública (Saran & Chaffer, 2000)	26
Tabela 3 – Score de classificação do TCM, dependendo da quantidade de gel formado (adaptada Philpot & Nickerson, 1991)	29
Tabela 4 – Relação entre o score do TCM e a CCS (adaptada Blowey & Edmondson, 2010).....	30
Tabela 5 – Distribuição das médias de dias de tratamento.....	40
Tabela 6 – Nível de significância entre as duas terapêuticas sobre a variável Resolvido e a variável Refugo	40

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Distribuição da evolução da afeção consoante o tratamento	39
--	----

1. INTRODUÇÃO

Este trabalho aborda o tema Mastites e a análise da eficácia do tratamento efetuado com uma terapia combinada de *Cefquinoma* em explorações leiteiras da área da Grande Lisboa.

1. 1. Estrutura da glândula mamária

Para melhor compreensão do tema, é necessário perceber a estrutura da glândula mamária. O úbere de uma vaca é constituído por quatro quartos independentes, sendo cada quarto composto pela cisterna da glândula, cisterna do teto, ductos coletores e lóbulos de tecido secretor. Estes contêm milhões de sacos microscópicos designados alvéolos, revestidos por células secretoras de leite que são, por sua vez, rodeadas de células musculares que se contraem, expulsando o leite dos alvéolos, durante a ordenha. O leite sai para o exterior pelo canal do teto (Philpot & Nickerson, 1991).

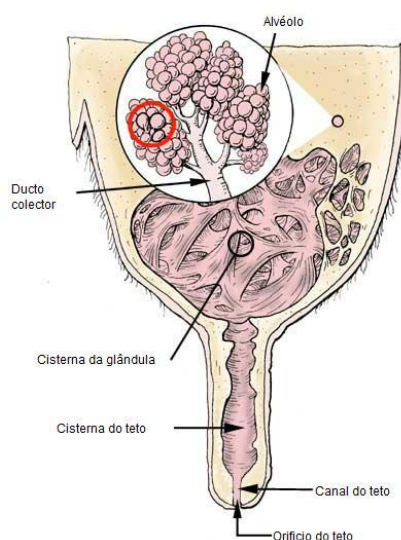


Figura 1 – Estrutura do úbere (Adaptado Ramos, A. C., 2010)

1.1.1. Mastite

A **Mastite** é a afeção mais comum do úbere e consiste na reação inflamatória dos tecidos secretores da glândula mamária, como resposta a lesões traumáticas, infeções

bacterianas e fúngicas. A palavra **Mastite** deriva do grego (*masto-* + *-ite*) que significa respetivamente seio e inflamação (Saran & Chaffer, 2000).

1.1.2. Patogénese

A transferência dos microrganismos ambientais ocorre, preferencialmente, entre ordenhas, período durante o qual se dá a transferência do ambiente para a ponta do teto. Contudo, se a transferência se der durante a ordenha, significa que o agente responsável é contagioso. É necessária a presença de um vetor que leve o microrganismo até à ponta do teto, como por exemplo as máquinas de ordenha, as mãos do ordenhador, os panos utilizados, etc (Blowey & Edmonson, 1995).

Após a transferência do microrganismo para a ponta do teto, este invade o mesmo de duas maneiras diferentes consoante seja contagioso (A) ou ambiental (B) (Blowey & Edmonson, 1995): A) Crescimento através do canal - o microrganismo contagioso começa por formar uma colónia na ponta do teto multiplicando-se. Em seguida a colónia cresce e migra para a cisterna do teto; B) Propulsão através do canal - acontece no caso dos microrganismos ambientais que são “empurrados” através do fluxo inverso do leite, levando-os desde o canal até à cisterna da glândula.

Outra diferença entre estas duas formas de invasão do canal consiste na capacidade de aderência de cada microrganismo, uma vez que os contagiosos possuem uma grande capacidade de adesão, enquanto que os ambientais não (Blowey & Edmonson, 1995).

Após a transferência e invasão, segue-se a etapa da infeção, na qual ocorre a proliferação dos microrganismos e a invasão do tecido mamário, originando inflamação que produz a mastite propriamente dita (Radostits et al., 2007).

A mastite varia entre a subclínica à hiperaguda, consoante os sinais clínicos apresentados, como calor, rubor, dor e edema, em alguns casos na hiperaguda gangrena e abscessos, na mastite crónica atrofia da glândula (Radostits et al., 2007).

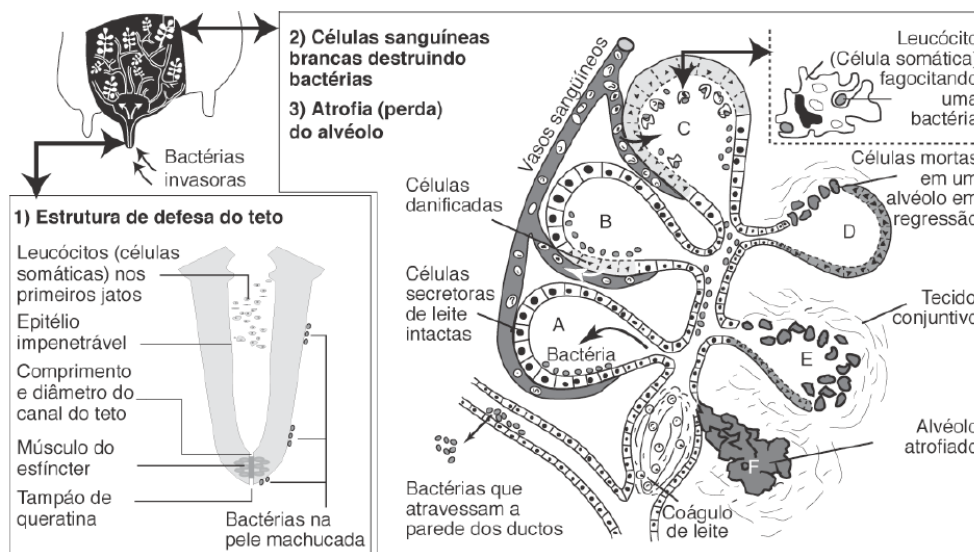


Figura 2 – Patogênese e defesa do úbere (Wattiaux, M. A., n/d)

1.2. Resposta inflamatória

O leite de uma vaca saudável, apresenta uma pequena quantidade de células somáticas que são, macrófagos (66 – 88%), neutrófilos (<11%), linfócitos (10 – 27%) e células epiteliais (0 – 7%) (Radostits et al., 2007).

Quando os microrganismos invadem o canal do teto, estes deparam-se com uma nova linha de defesa, os leucócitos e as células de descamação do epitélio secretor. Uma glândula mamária saudável, apresenta uma baixa concentração de células somáticas (<100,000/ml), sendo a sua maioria macrófagos (Bradford P. S., 2009).

No entanto, quando os agentes patogênicos são detetados, os macrófagos e as células epiteliais libertam citocinas e quimiocinas que despoletam um afluxo de neutrófilos. Para ser eficaz, este afluxo, tem de ser rápido e abrangente de modo a conter a infeção (Bradford P. S., 2009).

Numa infeção aguda, os neutrófilos são as células predominantes no leite mastítico, podendo exceder concentrações superiores a 1 milhão/ml, os macrófagos, os linfócitos e as células de descamação do epitélio secretor estão também presentes no leite mastítico mas em menor concentração (Bradford P. S., 2009).

Segundo Bradford P. S. (2009), o papel dos neutrófilos é preponderante na eliminação de mastites. A resposta destes á infecção desenvolve-se em quatro fases: recrutamento, fagocitose, morte intracelular e apoptose. Alguma alteração que ocorra numa destas fases, aumenta a severidade ou duração da mastite (Bradford P. S., 2009).

O recrutamento inicial de neutrófilos, depende da libertação de fatores quimiotáticos pelos macrófagos e células epiteliais, uma vez que a presença de organismos no leite, por si só, não é estimulante o suficiente, dado que nem os microrganismos nem as toxinas são suficientemente quimiotáticos para o recrutamento dos mesmos (Bradford P. S., 2009).

A fagocitose depende da ativação dos neutrófilos, durante a diapedese e quimiotaxia. Esta ativação resulta num aumento da regulação sobre os recetores de superfície que facilita a mesma (Bradford P. S., 2009).

A apoptose, consiste na eliminação imediata dos neutrófilos que tenham completado todas as suas “fases antimicrobianas”, a fim de evitar uma possível libertação do seu conteúdo intracelular e causar danos nos tecidos (Bradford P. S., 2009).

A eliminação só é completa quando os neutrófilos sofrem a apoptose e em seguida os seus fragmentos são fagocitados e removidos pelos macrófagos (Bradford P. S., 2009).

Os macrófagos são os leucócitos predominantes no chamado leite normal, sendo ultrapassados em grande número pelos neutrófilos durante a mastite. Estes ingerem e matam microrganismos como os neutrófilos e têm uma grande importância na mastite crónica e durante o período seco (Bradford P. S., 2009).

1.3. Classificação das Mastites

Esta afeção pode ser classificada, em **Mastite Clínica** ou **Mastite Subclínica** de acordo com o grau de inflamação.

A **Mastite Clínica** caracteriza-se pela existência de edema, inflamação, dor do úbere e alterações do leite como presença de coágulos, grumos e alterações da cor do soro com

possibilidade de aparecimento de sangue ou pus. Pode ainda subdividir-se em Mastite Clínica Aguda, Hiperaguda ou Subaguda, que varia consoante a intensidade dos sinais clínicos apresentados (Philpot & Nickerson, 1991).

A Mastite Aguda apresenta a sintomatologia anteriormente mencionada e sinais sistémicos, como febre e falta de apetite. Já a Mastite Hiperaguda apresenta todos os sinais mencionados, e ainda depressão, extremidades frias, diminuição do reflexo pupilar, diarreia, desidratação e taquipneia. Ao contrário da Mastite Aguda e Hiperaguda, a Subaguda é muitas vezes classificada como uma Mastite Clínica leve pois raramente apresenta os sinais referidos, apenas uma ligeira alteração do leite, como presença de grumos (Philpot & Nickerson, 1991).



Figura 3 - Mastite Aguda com edema do quarto afetado (Blowey & Weaver, 2011)

A **Mastite Subclínica** é uma forma de mastite muito subtil, que não apresenta sintomatologia nem alterações aparentes do leite, sendo por isso necessária a utilização de meios de diagnóstico complementares para a deteção de microrganismos ou dos produtos resultantes da inflamação como as células somáticas. Esta mastite continua por alguns a ser desvalorizada quanto à sua prevalência e importância económica, visto que o leite destas vacas “parece normal” (Philpot & Nickerson, 1991).

Segundo Philpot & Nickerson (1991) a Mastite Subclínica é importante porque é quinze a quarenta vezes mais prevalente que a Mastite Clínica, normalmente precede a forma clínica, tem uma longa duração, a sua deteção é difícil, reduz muito a produção de leite e diminui a sua qualidade.

A **Mastite Crônica**, advém quer da forma Clínica quer da Subclínica. Apresenta uma sintomatologia intermitente, tende usualmente a criar progressivamente tecido de cicatrização e a sofrer alterações de tamanho e forma, acompanhadas por uma redução na produção de leite (Philpot & Nickerson, 1991).



Figura 4 – Mastite Crônica: abscessos no parênquima mamário causados por *Staphylococcus* (Blowey & Weaver, 2011)

1.4. Etiologia

Os agentes etiológicos causadores de mastite encontram-se a viver no próprio animal ou no ambiente que o rodeia. Em relação à etiologia pode classificar-se de Mastite Ambiental ou Mastite Contagiosa.

Tabela 1 – Agentes etiológicos ambientais e contagiosos
(Adaptado de Blowey & Edmondson, 2010)

Agentes Ambientais	Agentes Contagiosos
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Mycoplasma spp.</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Corynebacterium bovis</i>
<i>Citrobacter sp</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
<i>Pseudomonas spp</i>	
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	
<i>Streptococcus uberis</i>	
Algas	
Leveduras e Fungos	

1.4.1. Microrganismos Contagiosos

Staphylococcus aureus

É uma bactéria Gram-positiva, contagiosa, que coloniza principalmente a glândula mamária, o canal do teto e a pele quando esta se apresenta traumatizada. A sua forma de apresentação mais comum é a crónica, em geral subclínica que por vezes se converte em aguda segundo a etapa da lactação em que a vaca se encontra, como por exemplo o pós-parto. A sua transmissão dá-se principalmente através das máquinas de ordenha, das mãos do ordenhador e de todo o material usado na própria ordenha (panos, esponjas, etc.). Após o estabelecimento da infeção na glândula mamária, esta evolui para uma inflamação crónica, em que se dá um aumento da CCS e à palpação se sente o úbere firme e fibroso (Saran & Chaffer, 2000).

Quando a mastite é subclínica, esta apresenta sinais pouco específicos como leite com flocos, coágulos, aguado e TCM positivo. A mastite aguda e hiperaguda, não são comuns, tendo uma aparição intermitente. Neste quadro a vaca pode apresentar a temperatura elevada, inapetência, úbere tumefato, doloroso ao toque e quente. Já o leite apresenta flocos, coágulos e muito provavelmente pus (Saran & Chaffer, 2000).

Para confirmação do agente etiológico causador da mastite é necessário recorrer a testes laboratoriais e realizar uma cultura bacteriológica. A mastite causada por *S. aureus* é bastante difícil de tratar, porque provoca uma vasta destruição do tecido glandular do úbere, originando tecido cicatricial que impede a distribuição adequada de antibiótico (Saran & Chaffer, 2000; Rebhun, 1995).

Streptococcus agalactiae

É um coco gram-positivo, catalase-negativo. Sem um adequado plano de prevenção e controlo, é considerada umas das mais importantes causas de perdas económicas para os produtores (James, M. 2002). Pode viver por longos períodos na glândula mamária mas sobrevive por um curto período de tempo no ambiente em determinadas condições. É um agente muito contagioso, sendo a sua principal fonte de contágio o úbere de vacas infetadas e

a sua transmissão ocorre principalmente na ordenha (mãos do ordenhador e utensílios usados durante a mesma, como por exemplo panos, esponjas, etc.) (Saran & Chaffer, 2000).

Strep. agalactiae, tende a quebrar as barreiras de defesa do úbere, entrando pelo canal do teto e migrando através do leite pelo respetivo quarto. Ao penetrar no epitélio acinar, esta causa a saída de neutrófilos para o lúmen, originando a mastite (clínica ou subclínica). Posteriormente à infeção primária, o epitélio acinar cicatriza, resultando numa mastite crónica que apresenta uma diminuição na produção de leite, um aumento na contagem de células somáticas (CCS), fibrose e atrofia do quarto afetado. Maioritariamente as mastites que têm como agente etiológico o *Strep. agalactiae*, são subclínicas, aparecendo esporadicamente alguns casos de mastite clínica, apresentando uma sintomatologia leve a moderada com alterações macroscópicas do leite, como a presença de coágulos e grumos (Saran & Chaffer, 2000; James, M., 2002; Philpot, W. N. & Nickerson, S. C., 1991).

Mycoplasma spp.

M.bovis, é a bactéria mais comum do Género *Mycoplasma*, causadora de surtos de mastite aguda que se desenvolve em mastites crónicas. Este microrganismo pode afetar apenas um quarto, sendo a sua dispersão mais frequente por dois ou mais quartos (Rebhun, 1995). Dado tratar-se de uma bactéria ubiquitária, esta pode ser encontrada nas membranas e secreções mucosas do trato respiratório e urogenital. A terapêutica conhecida para o tratamento de mastites não tem qualquer efeito neste microrganismo, sendo a única opção do produtor a recuperação espontânea ou o refugio dos animais afetados que, neste caso, é o mais recomendável visto ser contagioso. A única alteração apresentada pelos animais afetados é a drástica quebra na produção de leite (Rebhun, 1995).

Corynebacterium bovis

É um bacilo gram-positivo, relativamente comum e extremamente contagioso, sendo na sua maioria associado a Mastite Subclínica. Apresenta como principais reservatórios a glândula mamária e o canal do teto, disseminando-se com muita facilidade entre as vacas, em explorações que apresentam défice ao nível da higiene na ordenha, ou seja, em que o pré-dipping e o pós-dipping não são realizados com um germicida adequado. Após a infeção, o

animal pode permanecer infectado por um longo período de tempo, chegando a meses (Rdostits et al., 2007).

A infecção intramamária causada pelo *C. bovis* é muito associada a Mastite Subclínica, como mencionada anteriormente, mas pode apresentar alguns sinais clínicos, como um aumento moderado de CCS, uma ligeira alteração no TCM e ocasionalmente um endurecimento da glândula mamária. É uma bactéria controlável com a implementação de programas de prevenção, que visam regras de higiene na ordenha (Rdostits et al., 2007).

Streptococcus dysgalactiae

Strep. dysgalactiae é um coco gram-positivo. Ao contrário do *Strep. agalactiae*, este sobrevive bem no ambiente sendo, por isso, considerado tanto contagioso como ambiental. É comumente encontrado na pele do teto, principalmente quando esta se encontra lesionada e também nas amígdalas, o que proporciona a transmissão a vitelas, novilhas e vacas secas (parte contagiosa) (Blowey & Edmonson, 2000).

Este microrganismo encontra-se muitas vezes como agente concomitante na mastite gangrenosa causado por *Arcanobacterium pyogenes* e na mastite aguda causada por *S. aureus* (Saran & Chaffer, 2000). A sintomatologia apresentada, febre e inflamação do úbere, demonstra-se inespecífica pelo que, para um diagnóstico definitivo, é necessária a realização de cultura microbiológica. O controlo e prevenção deste agente passa pela melhoria das condições da ordenha e manejo que visem a conservação da integridade dos tetos (Rebhun, 1995).

1.4.2. Microrganismos Ambientais

Coliformes

Os coliformes, são bactérias ambientais pertencentes à Família *Enterobacteriaceae*, bacilos gram-negativos causadores de mastite, sendo os mais prevalentes: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter sp.* (Blowey & Edmonson, 2010).

A *E. coli* é o segundo maior microrganismo ambiental causador de mastite, precedido do *S. uberis* (Blowey & Edmonson, 2010).

Comumente encontrados nas fezes, solo, águas sujas e camas, são causadores de infecções primárias em vacas confinadas por longos períodos de tempo, quando as condições de alojamento e higiene são deficitárias (calor, humidade, etc.), sendo mais frequentes no Verão (Blowey & Edmonson, 2010; Rebhun, 1995).

Os coliformes chegam à glândula mamária através do canal do teto, local onde se vão deparar com a primeira barreira de proteção. Ao contrário das outras bactérias mencionadas, estas não aderem aos ductos nem aos alvéolos da glândula mamária, sendo a rápida proliferação e a produção de endotoxinas, condições essenciais para o desenvolvimento de Mastite Aguda. Esta Mastite Aguda pode progredir para uma Mastite Hiperaguda com envolvimento sistémico, que pode mesmo levar à morte do animal. O animal apresenta como sinais locais o quarto infetado quente, edemaciado e rijo, o leite parece mais aquoso e apresenta uma temperatura corpórea elevada, acima dos 40°C e ainda estase ruminal, íleos e diminuição da absorção de cálcio por parte do intestino, etc. (Rebhun, 1995).

Segundo Philpot, W. N. & Nickerson, S. C. (1991) cerca de 50% infeções por Coliformes, apresentam uma duração curta (menos de 10 dias) e tendem a curar espontaneamente; por volta de 70% persistem menos de 30 dias e em alguns casos podem persistir mais de 100 dias e originar surtos de Mastite Clínica Aguda.

Pseudomonas spp

São bactérias gram-negativas, sendo a principal causadora de mastite, a *Pseudomonas aeruginosa*, embora haja outras *Pseudomonas* que causam a mesma afeção. Usualmente encontradas no ambiente das explorações, em águas de lavar os úberes, nas mangueiras da sala de ordenha, nas fezes, em máquinas de ordenha não higienizadas, etc., podem também ser transmitidas à vaca através de infusões intramamárias, seringas, etc (Radostits et al., 2007). Como os Coliformes, as *Pseudomonas*, também produzem endotoxinas que podem resultar numa toxemia juntamente com o aumento da temperatura do animal (Philpot & Nickerson, 1991).

Causadora de Mastite Aguda, apresenta necrose, o quarto afetado permanece duro, tumefato e quente, o leite apresenta-se seroso e pode também apresentar-se sanguinolento com coágulos e a CCS apresenta-se elevada. Após a infecção inicial, o quarto afetado pode manter-se duro, a produção de leite diminui drasticamente, podendo mesmo cessar ou o quadro clínico melhora ligeiramente, embora o leite possa apresentar coágulos ou pus. É possível a ocorrência de Mastite Crônica, com episódios ocasionais de Mastite Clínica. Para um diagnóstico definitivo, o recomendável é fazer culturas bacterianas, pois as vacas não apresentam uma sintomatologia específica (Rebhun, 1995).

Staphylococcus coagulase negativa

São cocos, gram-positivos conhecidos por causar Mastites tanto Clínicas como Subclínicas com aumento da CCS. *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. epidermis* e *S. xylosus*, são algumas das bactérias pertencentes a este grupo. Habitualmente colonizam a pele, a ponta e o canal do teto, sendo difícil por isso decifrar se são causa de Mastite Clínica, Subclínica ou apenas uma simples contaminação da ponta do teto (Blowey & Edmondson, 2010). Estes microrganismos tendem a aparecer quando as técnicas de ordenha são impróprias, a higiene é diminuta, os dippings não são efetuados convenientemente e quando a pele do teto sofre algum tipo de agressão. Normalmente, não apresentando sinais clínicos, as Mastites causadas por *S. coagulase negativa*, apresentam um déficit na produção leiteira, o TCM alterado e um aumento da CCS, como referido anteriormente. Para controlar o seu aparecimento, os produtores devem melhorar os níveis de higiene da ordenha, fazer manutenção e calibração regular das máquinas de ordenha, utilizar iodo no pós-dipping e tentar eliminar ao máximo todas as causas de irritação da pele do teto (Rebhun, 1995).

Streptococcus uberis

Coco, gram-positivo, ubiqüitário em toda a exploração, devido à contaminação fecal, das camas e do ambiente. Colonizam principalmente a pele do teto ou feridas que este possa ter. Falhas na limpeza e preparação do úbere para a ordenha são, sem dúvida, algumas das causas que predispõem para o aparecimento de Mastite por *S. uberis*, assim como por outros agentes ambientais (Rebhun, 1995).

O grande número de infecções ocorre no início da lactação e no fim do período seco. A Mastite Aguda causada pelo *S. uberis*, apresenta o quarto afetado edemaciado, tumefato e firme, sinais clínicos pouco específicos. Para além dos sinais já referidos, febre e inapetência são também muitas vezes associados a este tipo de mastite. Em relação ao leite, este é mais aquoso, apresentando coágulos. Como os sinais clínicos apresentados são pouco específicos, é imprescindível a realização de cultura bacteriológica, até para diferenciação de outros agentes ambientais (Rebhun, 1995).

Prototheca spp

Prototheca spp. é uma alga, sem clorofila, unicelular e de distribuição universal, que pode provocar Mastite em bovinos. Apenas a *P. wickerhamii* e a *P. zopfii* são até agora consideradas patogénicas, apesar de existirem 5 espécies diferentes. Usualmente encontrada em lama, fezes, água, charcos, seiva de árvores, em animais (porcos, gatos, cães, bovinos, etc...) e nas suas excreções que, no caso dos bovinos, são fezes e leite (Bexiga, et al., 2003).

A *Prototheca* é um microrganismo muito resistente, sobrevivendo à digestão, a um pH entre 3 e 11 e por vezes à pasteurização (Bexiga, et al., 2003).

Habitualmente as infecções causadas por este agente são Mastites Crónicas e Subclínicas que apresentam uma resistência à antibioterapia aplicada e lesões granulomatosas à observação histológica. A sua transmissão é efetuada durante a ordenha de vaca para vaca, como um agente ambiental (Bexiga, et al., 2003).

Em termos de quadro clínico, normalmente não apresenta sinais sistémicos, apenas leite mais aquoso, glândula mamária mais firme, diminuição da produção de leite do quarto afetado e um aumento da CCS. Para um diagnóstico definitivo, faz-se cultura do organismo e identificação microscópica. Devido à falha no tratamento, é aconselhado ao produtor o refugo de todas as vacas que apresentem Mastite por *Prototheca spp* (Rebhun, 1995; Divers & Peek, 2008).

Fungos

Os fungos infetam a glândula mamária de forma iatrogénica, através de seringas, das cânulas usadas na terapia ou através de uma sobredose de infusões mamárias. O principal fungo causador de mastite é *Candida spp*, sendo quase sempre secundária a uma Mastite Aguda de origem bacteriana, em que se aplicou uma terapia, pois alguns fungos crescem bem em meios com antibiótico (Rebhun, 1995; Divers & Peek, 2008).

As Mastites Fúngicas, apresentam um inchaço drástico e generalizado do quarto afetado, uma consistência dúbia e um leite que varia desde ligeiramente aquoso até à presença de flocos e coágulos, variando muito de dia para dia (Rebhun, 1995; Divers & Peek, 2008).

Em relação a sinais sistémicos as vacas afetadas, podem ou não apresentar febre, que varia entre 39.44°C e 41.11°C. Quanto ao diagnóstico, o mais correto é fazer cultura, mas muitas vezes consegue-se chegar a um diagnóstico através de um historial crónico, em que a grande maioria das terapêuticas intramamárias já foram realizadas mas sem sucesso, juntamente com o fato de a vaca apresentar uma boa condição sistémica. A cura pode ser espontânea após a interrupção da antibioterapia, demorando entre 2 a 6 semanas (Rebhun, 1995; Divers & Peek, 2008).

1.5. Importância da Mastite na Saúde Pública

Apesar da grande importância dos agentes etiológicos descritos no capítulo anterior, existem outros, que serão descritos na tabela seguinte, que têm uma importância extrema. São bactérias que aparecem muito raramente, mas quando acontece, apresentam um grande risco para a saúde pública. Estas bactérias são causadoras de afeções nos humanos e são transmitidas através do leite. Podem se excretadas diretamente pela glândula mamária no leite ou serem acopladas ao mesmo através da pele e mucosas contaminadas do animal ou das mãos contaminadas do ordenhador (Saran & Chaffer, 2000).

Microrganismo	Tipo de Mastite	Doença que causa no humano
<i>Listeria monocytogenes</i>	Mastite leve e crônica	Meningite, Septicemia, Pneumonia e Endocardite
<i>Campylobacter jejuni</i>	Pode causar Mastite ou ser só isolado no úbere sem causar afeção	Enterite
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Pode induzir o aumento da CCS e é isolada esporadicamente em amostras de leite	Enterite, Pseudoapendicite e Artrite
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Mastite lobular infiltrativa ou tuberculose miliar	Tuberculose
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	Pode ser isolado no leite, atingindo o úbere dentro dos macrófagos	Suspeita de originar Doença de Crohn
<i>Brucella abortus</i>	Mastite Clínica ou Subclínica	Infertilidade e Aborto
<i>S. aureus</i>	Mastite Clínica ou Subclínica	Infeções diversas, Enterotoxemia (vômitos e diarreia)
<i>Strep. agalactiae</i>	Mastite Clínica ou Subclínica	Bacteriemia, Endocardite e Meningite neonatal
<i>Salmonella sp.</i>	-	Diarreia, febre e vômitos
<i>E. coli</i>	-	Enterotoxigénica e Diarreia Infantil

Tabela 2 – Bactérias com importância para a Saúde Pública (Saran & Chaffer, 2000)

1.6 Detecção e Diagnóstico de Mastites

Para uma vigilância mais atenta de Mastites, é necessário que haja uma complementaridade dos testes de campo com testes laboratoriais podendo estes ser realizados, não só apenas num animal , mas em toda a população da exploração.

Testes de Campo

- Observação e Palpação do úbere: este procedimento deverá ser preferencialmente efetuado logo após a ordenha quando o úbere se encontra vazio. Aí podem ser detetadas alterações no úbere como aumento da temperatura, endurecimento do mesmo, alteração da cor e presença de massas. A palpação do úbere pode ser dolorosa (Hurley, W. L., 2010).

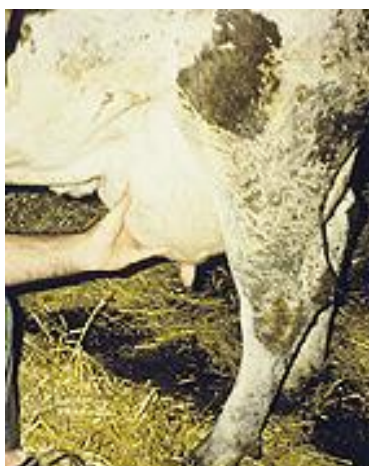


Figura 5 – Palpação do úbere (Hurley, W. L., 2010)



Figura 6 – Quarto posterior direito tumefacto devido a Mastite (Hurley, W. L., 2010)

- Observação do leite (Strip test): usualmente esta observação faz-se na altura da ordenha, recolhendo os primeiros jatos de leite para um recipiente de fundo escuro. Este exame permite a identificação de vacas mastíticas que precisem de tratamento e a deteção de leite mastítico que não deverá ir para o tanque. As alterações observáveis variam desde, descoloração, presença de flocos, grumos e coágulos até um aspeto aquoso (Hurley, W. L., 2010).



Figura 7 – Imagem de alguns flocos (setas vermelhas) num recipiente de fundo branco (Hurley, W. L., 2010)



Figura 8 – Recipiente de fundo escuro com bastantes coágulos e um leite seroso, correspondendo a uma Mastite Aguda (Hurley, W. L., 2010)

- Teste Californiano de Mastites (TCM): consiste num exame indireto que estima as células somáticas presentes no leite. O TCM para ser viável, deve ser realizado entre o Strip test e a ordenha porque o número de células somáticas tende a elevar-se no decorrer da ordenha permanecendo elevado durante algumas horas (Philpot & Nickerson 1991). O reagente utilizado no TCM é um detergente com a adição de um indicador de pH, sendo o reagente dissolvente

de gordura. Quando adicionado ao leite em partes iguais, dissolve a parede celular e a parede nuclear dos leucócitos (que são principalmente gordura). Ao dissolver a parede nuclear, o DNA é libertado do núcleo e aglomera-se formando um gel (Mellenberger, R., 2001).



Figura 9 – Raquete e reagente, utilizados na realização do TCM (Hurley, W. L., 2010)

O grau de gelificação é depois classificado de acordo com a seguinte tabela:

Tabela 3 – Score de classificação do TCM, dependendo da quantidade de gel formado (adaptada Philpot & Nickerson, 1991)

Score	Gel
0	Nenhum
T (Vestígios)	Ligeiro
1	Ligeiro a Moderado
2	Moderado
3	Denso

A formação de gel está relacionada com a quantidade de células somáticas presentes no leite, como se pode verificar nos dados da tabela abaixo inserida:

Tabela 4 – Relação entre o score do TCM e a CCS
(adaptada Blowey & Edmondson, 2010)

TCM	CCS aproximado
Negativo	0 – 200,000
T (Traço)	150,000 – 500,000
1	400,000 – 1.000,000
2	800,000 – 5.000,000
3	>5.000,000

- Condutividade elétrica: é um teste rápido, elaborado pelas próprias máquinas de ordenha, que deteta as alterações iónicas do leite, causadas pelo processo inflamatório e proliferação bacteriana. Os eletrólitos importantes a sofrerem alterações na sua concentração são o Na⁺ e Cl⁻ que aumentam e o K que diminui (Philpot & Nickerson 1991).



Figura 10 – Sistemas de deteção da condutividade elétrica e registo diário em cada ordenha, transmitindo a informação para o computador a fim de estabelecer registos diários da condutividade (Saran & Chaffer, 2000)

- Indicadores de pH: o leite “normal” apresenta um pH aproximadamente entre 6.5 e 6.7; por sua vez, o leite mastítico pode atingir um pH de 7.4. Este teste, consiste na utilização de tiras medidoras de pH que detetam a alcalinidade dos quartos mastíticos, sendo amplamente utilizado na Europa (Divers & Peek, 2008).

Testes Laboratoriais

- Contagem de Células Somáticas: permite apurar o número total de células somáticas presentes no leite, muito utilizado nos dias de hoje, como forma de determinar os níveis de infecção, não só num único animal, como em toda a exploração. A CCS de um úbere saudável, pode apresentar até 200.000 cel/ml de leite, conforme apresentado na tabela 4 (Rebhun et al., 1995).
- Cultura Bacteriológica: para a execução deste exame recolhem-se amostras de leite do tanque (total de vacas) ou, em casos específicos, individual, da vaca em questão. A colheita de leite do tanque realiza-se quando se suspeita de agentes contagiosos na exploração como *Staph. aureus* ou *Strep. agalactiae*. (Radostits et. al., 2007).

A quantidade de bactérias observadas, varia consoante o número de vacas infetadas, a produção de leite e o grau de infecção. Uma única cultura bacteriana apresenta baixa sensibilidade e alta especificidade (Radostits et. al., 2007). Para se obter uma primeira triagem aos maiores agentes causadores de mastite, Radostits et al. (2007) é de opinião que a cultura bacteriana do tanque de leite é uma técnica muito útil.

Em relação às colheitas individuais, estas podem ser feitas dos quatro quartos juntos ou de cada quarto em separado, sendo esta última a recomendada, para que se possa aplicar o tratamento adequado, tratando assim apenas os quartos afetados e evitando gastos excessivos.

Para que a colheita de leite origine uma cultura fiável é necessário seguir algumas regras enumeradas em baixo (Blowey & Edmondson, 1995):

- 1- O operador deve apresentar as mãos limpas, lavá-las e secá-las se necessário ou usar luvas;
- 2- Higienizar e secar os tetos que aparentem sujidade e dos quais será recolhida a amostra;
- 3- Descartar os primeiros quatro a seis jatos de leite, de modo a “limpar” o canal do teto que possa conter bactérias;
- 4- Limpar a ponta do teto com algodão, até que este se apresente limpo e então retire a tampa do frasco;

- 5- Colocar o frasco num ângulo aproximado de 45°, deitar alguns jatos de leite para o interior e fechar o frasco de imediato;
- 6- Identificar o frasco com a identificação da vaca, o quarto, a data e o nome da exploração;
- 7- Armazenar a amostra no frio (+4°C), até ser transportada para o laboratório.

1.7. Fatores de risco

São os fatores de risco que influenciam a prevalência da infecção e a incidência de sinais clínicos. Existem dois tipos de fatores de risco: os do animal e os do ambiente.

Fatores de risco do animal

- Idade e número de lactações: a taxa de incidência dos quartos afetados aumenta significativamente com a idade devido, em grande parte, à diminuição da imunidade, relaxamento do esfíncter e dos ligamentos, atingindo a seu pico por volta dos 7 anos de idade. Contudo, há estudos que indicam a existência de mastites nas novilhas, na fase pré-parto (cerca de 45%) (Blood & Rodostitis et al., 1991; Radostits et. al, 2007; Aarestrup & Jensen, 1997).
- Estado de lactação: grande parte das novas infecções que surgem, estão relacionadas com o período seco e/ou nos primeiros 2 meses da fase de lactação, em especial em ambientes de elevada característica patogénica (Radostits et. al, 2007).
- Raça: a incidência de mastite é mais elevada nas Holstein-Friesian. No entanto a ausência de estudos comparativos entre raças que atestem alguma diferença a nível genético, leva a que se aponte como grande causa de incidência de mastite o manejo (Radostits et. al, 2007).
- Ratio de ordenha e Morfologia do úbere e tetos: em explorações em que haja a associação de um elevado ratio de ordenha com um grande diâmetro do canal do teto, usualmente leva a um aumento da CCS ou do risco de infeções

intramamárias (Slettbakk et al., 1995). Há também que ter em consideração outros fatores de risco, nomeadamente, as perdas de leite intermitentes entre ordenhas e a distância do teto ao chão que pode potenciar o desenvolvimento de lesões (Radostits et. al, 2007).

- Condição física do teto: a primeira linha de defesa contra os agentes patogénicos é a ponta do teto, a integridade do tecido deste é fundamental para ativar os mecanismos de defesa contra mastites (Jones & Ward, 1990).

A espessura da pele do teto, é um indicador do seu estado, uma vez que pode aumentar ou diminuir após a ordenha. Um aumento de espessura acima dos 5% é indicativo de afeção, já uma diminuição acima dos 5% não significa o mesmo (Jones & Ward, 1990).

A hiperqueratose do canal do teto é uma condição muito observada nas explorações leiteiras causada maioritariamente pelas máquinas de ordenha. Um sistema de ordenha deficitário pode provocar um aumento do grau de hiperqueratose (Lohuis et al., 1990).

- Higiene do úbere: segundo Schreiner & Ruegg, 2003, um úbere com uma higiene deficitária, associado a um aumento das CCS, origina uma subida da prevalência de infeções intramamárias causadas por agentes contagiosos e não por ambientais.
- Nutrição: após estudos, chegou-se à conclusão que uma nutrição deficitária em vitamina E, A e selénio podem proporcionar o aparecimento de mastites. A utilização de suplementos antioxidantes é benéfica para a saúde do úbere e potencia a diminuição da incidência e duração das mastites clínicas (Radostits et. al, 2007; Jukola et. al 1996).
- Genética: a hereditariedade é um fator que influencia a capacidade de resistência à mastite bem como outros aspetos morfológicos, fisiológicos e imunológicos. No entanto, apesar da hereditariedade ter um peso significativo em determinadas características como tamanho do úbere, comprimento e forma

do teto e morfologia do seu orifício, apenas 0,05% das ocorrências de mastite estão associadas à hereditariedade (Radostits et. al, 2007).

- Outras afeções existentes: retenção de placenta, feridas e lesões de tetos, são algumas das afeções associadas a uma elevada ocorrência de mastites. Também úlceras da sola são frequentemente associadas a infecções por *S. aureus* na primeira lactação, aumentando a probabilidade de lesões nos tetos, devido ao tempo que as vacas passam deitadas (Radostits et. al, 2007).

Fatores de risco do ambiente

Qualidades das instalações e manejo dos animais: para o controlo de mastites há que ter em atenção alguns fatores relacionados com as instalações/manejo como, os tipos de cama, o clima, o tipo de alojamento, etc. Dado que as vacas leiteiras tendem a passar 40 a 65% do seu tempo deitadas, a qualidade e manejo das instalações deve ser o mais criteriosa possível (Radostits et. al, 2007).

Os agentes ambientais multiplicam-se no material das camas, estando os tetos em contacto direto e prolongado com o material contaminado. Para que não haja um crescimento bacteriano no material das camas deverá ser dada atenção especial à humidade, à disponibilidade de nutrientes, à temperatura e ao pH, que devem ser controlados (Radostits et. al, 2007).

As camas são um dos pontos-chave na prevenção de mastites, uma vez que as camas feitas de material orgânico como palha, serradura e aparas são locais perfeitos para o crescimento de agentes. Já as camas inorgânicas, como as de areia, apresentam uma contagem celular muito inferior. Para além do material utilizado nas camas, as suas dimensões, a dimensão do efetivo e a ventilação dos estábulos, também têm de ser tidas em consideração (Radostits et. al, 2007).

Técnicas de ordenha: este é sem dúvida um fator de risco bastante importante, porque as ordenhas devem ser realizadas por pessoas eficientes e com formação específica. As máquinas de ordenha e a sala de ordenha devem

ser sempre limpas e higienizadas, os níveis de vácuo e as tetinas devem ser verificados constantemente para que não haja falhas (Radostits et. al, 2007).

Um úbere e tetos molhados são, em conjunto com lesões do teto, um grande risco para o aparecimento de mastite. Para controlo e prevenção da mastite, deve-se apostar em algumas regras básicas de uma boa ordenha, como por exemplo, utilizar os toalhetes de limpeza apenas uma vez e numa única vaca, realizar o pré e o pós-dipping em todas as ordenhas e higienizar o circuito do leite entre cada ordenha. Regras como estas acima mencionadas são consideradas preventivas e suficientes para evitar a propagação de mastites dentro da exploração (Radostits et. al, 2007).

- Estação do ano: este é um fator que tem uma variabilidade elevada, dependendo da área geográfica e do clima da zona em questão. A taxa de incidência de mastite é mais elevada durante os partos de Inverno ou Primavera nas áreas tropicais e subtropicais, devido ao aumento da pressão associada ao aumento da humidade. Já nas áreas temperadas o aumento da ocorrência de mastites, dá-se quando as vacas parem durante longos períodos de estabulação, ou seja, no Outono ou Inverno (Radostits et. al, 2007).

1.8. Terapia Combinada

Há mais de 100 anos que a Mastite é investigada, mas o progresso para obtenção do tão desejado patamar de eficaz prevenção e controlo tem sido lento. Em 1938, começou a haver algum desenvolvimento a nível de métodos de controlo de mastites. Nesse mesmo ano a Munch-Petersen publicou a sua primeira revisão literária sobre mastites (Dodd, F. H., 1983).

Nessa época, havia muitas dúvidas sobre se a erradicação, a imunização, a terapia, a higienização ou o manejo eram de facto as ferramentas ideais pois eram todas possibilidades em aberto. O grande avanço deu-se em 1945, quando a penicilina ficou disponível para uso veterinário, provando ser uma inovação importante (Dodd, F. H., 1983).

Em meados de 1955, ficou claro que a terapia com antibiótico não era tão eficaz como se pensava inicialmente; era sim um componente muito importante para o controlo de mastites

mas, utilizado sozinho sem outras medidas complementares, não era suficiente (Dodd, F. H., 1983).

Com a evolução da medicina, surgiram inúmeros tratamentos possíveis para a Mastite, sendo uns mais eficazes que outros. As terapias combinadas, juntando a terapia sistêmica com a intramamária têm vindo, nos últimos anos, a demonstrar a sua eficácia. A *Cefquinoma* é uma Cefalosporina de 4ª geração, que atua por inibição da síntese da parede celular. Caracterizada pelo seu largo espectro de atividade terapêutica, apresenta uma grande estabilidade contra penicilinas e beta-lactamases (Direção Geral de Veterinária, n/d).

A aplicação de terapia combinada de *Cefquinoma* sistêmico e intramamário, mostrou um aumento da taxa de cura em mastites clínicas induzidas por *E.coli* (Schpigel et al., 1997). O uso desta terapia combinada para além das elevadas taxas de cura, também leva à cura dos quartos afetados com mastite subclínica (Bexiga R. et al., 2012).

1.9 Objetivos

O objetivo do presente trabalho foi o estudo e comparação dos resultados da terapia combinada com *Cefquinoma* 4,5% e outra terapêutica protocolar, avaliando o seu impacto no tempo de tratamento de mastite, em termos de dias e a sua eficácia em termos de cura e retorno dos animais à atividade produtiva.

As fases do estudo contemplaram:

- O levantamento e análise dos dados relativos a 3 explorações leiteiras da Região da Grande Lisboa;
- A identificação dos animais com mastite;
- A análise do tratamento utilizado, tempo de tratamento e evolução clínica;
- O estabelecimento de relação entre tratamento utilizado, dias de duração e ratio de cura.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caraterização da amostra

O presente estudo contemplou a análise de 3 explorações leiteiras da Região da Grande Lisboa, em que foram selecionadas 94 vacas com mastite clínica (apresentavam sinais clínicos e o TCM positivo). Os dados que foram disponibilizados e recolhidos dos livros de tratamentos de cada exploração, para análise diacrónica, referem-se ao período compreendido entre Janeiro de 2011 e Março de 2012, sendo a raça predominante nas 3 explorações a Holstein Frísia.

2.2 Protocolo utilizado

Após o aparecimento de sinais clínicos – edema e tumefação do úbere, dor ao toque e alterações no leite - e confirmação através do TCM, as 94 vacas que foram selecionadas para este estudo, foram divididas em 2 grupos: grupo A (n=47) foi tratado com uma terapia combinada de *Cefquinoma* 4,5% intramuscular e *Cefquinoma* (75mg) intramamário. No grupo B (n=47) - grupo de controlo – os animais foram tratados com a terapia protocolar estipulada que era Amoxicilina + Ácido Clavulânico intramamário.

Para cada animal estudado foram registados, a partir dos dados disponíveis em cada exploração, o tratamento usado (terapia combinada com *Cefquinoma* ou outro protocolo alternativo), o tempo de tratamento e a sua conclusão, adaptando assim este estudo ao quotidiano das explorações. Nas 3 explorações já se efetuavam terapias combinadas com *Cefquinoma*, não sendo novidade como tratamento. No que se refere ao total de dias de tratamento, estes foram tidos em consideração independentemente da evolução da afeção ou seja, os dias de tratamento foram contabilizados até à conclusão - resolução, morte, refugo ou perda funcional de ¼ mamário.

2.3 Tratamento estatístico e determinação do tamanho da amostra

Para operacionalizar os objetivos do presente trabalho, planeou-se um estudo com observações emparelhadas para avaliação dos dias entre as duas terapêuticas instituídas. Para

efeitos do cálculo da dimensão da amostra procedeu-se previamente à colheita de dados e, de acordo com a revisão bibliográfica, à definição da diferença esperada em média de dias de tratamento (1 dia) e o respetivo desvio padrão ($s=0,2$ dias). Para a avaliação da relação entre os dois tipos de terapêutica e a evolução clínica, preconiza-se a aplicação do teste Qui-quadrado e do teste de Cochran. Contudo, os requisitos de aplicação destes testes não foram cumpridos. Preconizou-se a utilização do teste t para amostras independentes mas, não se tendo verificado estes requisitos, procedeu-se a uma abordagem não paramétrica pelo teste de Mann-Whitney.

Utilizou-se o Software PS Power and Sample Size Calculations (Version 3.0, January 2009) para este cálculo. De acordo com este Software são necessários 94 indivíduos (47 pares de observações) de forma a poderem ser encontradas diferenças estatisticamente significativas.

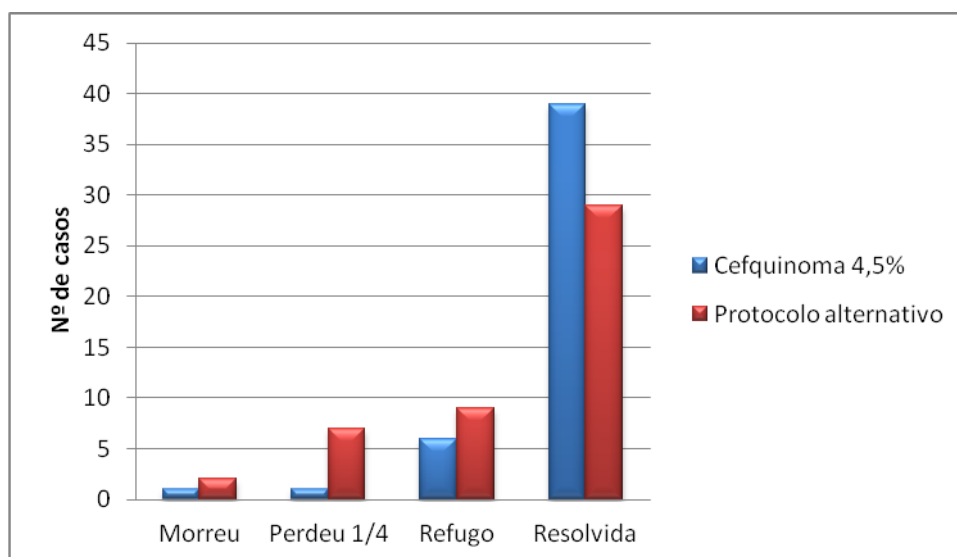
Trabalhou-se com um nível de significância de 5% (logo, $p \leq 0,05$), o que significa que se os valores de p encontrados na análise forem iguais ou inferiores a 0,05 se rejeita a Hipótese nula; tal equivale a dizer que as diferenças encontradas são estatisticamente significativas, com um nível de confiança de 95% ou nível de significância de 5%. Valores de p entre 0,05 e 0,10 serão considerados como tendência.

3. RESULTADOS

Das 47 vacas do grupo A, houve apenas 1 (2,10%) caso de morte e 1 (2,10%) caso de perda funcional do $\frac{1}{4}$ mamário, 6 (12,80%) foram para refugio e 39 (83%) apresentaram a afeção resolvida (gráfico 1).

No grupo B, também com 47 vacas, 2 (4,30%) morreram, 7 (14,90%) apresentaram perda funcional $\frac{1}{4}$ mamário, 9 (19,10%) foram para refugio e 29 (61,70%) obtiveram resolução (gráfico 1).

Gráfico 1- Distribuição da evolução da afeção consoante o tratamento



Na avaliação dos dias, de acordo com a evolução, mediante a terapêutica instituída, verificou-se que, a distribuição das médias de dias de tratamento, devido ao baixo número de casos de Morte e Perda de $\frac{1}{4}$, com a terapia de Cefquinoma 4,5% (apenas 1 caso para cada situação) não é possível apresentar média de dias. Refugio e Resolvida apresentam uma média de respetivamente 3,67 e 3,54 dias. No caso do protocolo alternativo as médias de dias são de 3 dias para Morte, 3,43 dias para Perda de $\frac{1}{4}$, 3,33 dias para Refugio e 3,41 dias para Resolvida (tabela 5).

Tabela 5 – Distribuição das médias de dias de tratamento

Média de dias de tratamento até à obtenção de um resultado				
	Morreu	Perdeu 1/4	Refugo	Resolvida
Terapia combinada Cefquinoma	0 dias	0 dias	3,67 dias	3,54 dias
Protocolo alternativo	3 dias	3,43 dias	3,33 dias	3,41 dias

Embora o número de animais sujeitos aos dois tipos de tratamento seja igual não se efetuaram testes emparelhados, uma vez que estes grupos eram distintos. Desta forma, na avaliação dos dias de recuperação entre as duas terapêuticas optámos por uma abordagem de amostras independentes.

Após a realização dos testes estatísticos, estes sugerem que não existem diferenças estatisticamente significativas entre as duas terapêuticas (p-value=0,528) como demonstrado na tabela 6.

Tabela 6 – Nível de significância entre as duas terapêuticas sobre a variável Resolvido e a variável Refugo

<i>p</i>(nível de significância)	Resolvida	Refugo
Terapia combinada Cefquinoma vs Protocolo alternativo	0,582	0,864

De forma similar, a análise da evolução para o Refugo não detetou diferenças estatisticamente significativas entre as duas terapêuticas (p-value=0,864) como ilustrado na tabela 6.

4. DISCUSSÃO

O setor leiteiro tem uma grande importância para a economia portuguesa e um peso significativo na produção agrícola nacional (cerca de 11% da produção agrícola nacional em 2009). O número de produtores tem vindo a reduzir drasticamente nos últimos anos (cerca de 85% entre 1993/94 e 2009/10) enquanto aumentam as dimensões médias das explorações, havendo um nível de produção estabilizado. Isto é resultado de um aumento da especialização, da escala de funcionamento das explorações e da otimização deste sector em termos territoriais e económicos (Sottomayor, M., Costa, L. & Ferreira, M. P., 2012).

Esta tendência manifesta-se essencialmente nos seguintes aspetos:

- I. Entre 2005/2006 e 2009/2010 registou-se o crescimento do número de produtores, apenas nos escalões superiores a 400 toneladas (Fenalac, 2011);
- II. Entre 2005/2006 e 2009/2010 verificou-se um decréscimo de 60% no número de produtores no escalão inferior a 20 toneladas (Fenalac, 2011);
- III. Entre 2005/2006 e 2009/2010 ocorreu um aumento das entregas de leite, apenas nos escalões superiores a 400 toneladas (Fenalac, 2011).

A acompanhar o referido aumento da dimensão média das explorações leiteiras está o aumento do seu nível de especialização e produtividade. Atualmente 90% do efetivo e da margem bruta total no Continente são explorações com uma orientação técnico-económica especializada na produção de leite. Aproximadamente 50% da produção nacional é garantida por apenas 10% das explorações (Sottomayor, M., Costa, L. & Ferreira, M. P., 2012).

Não só em termos nacionais, mas também ao nível da União Europeia, a exploração leiteira é uma das principais atividades agrícolas, contribuindo direta e indiretamente para o PIB e para o emprego no sector primário. Segundo dados disponíveis, no ano de 2008, cerca de 1 milhão de agricultores produziu 150 milhões de toneladas de leite num valor superior a 40mil milhões de euros, o que corresponde a 14% da produção agrícola da UE (Allen, 2010). Nesse mesmo ano, calcula-se que a indústria transformadora de produtos lácteos tenha proporcionado emprego a 400 000 pessoas na UE. Desta análise ressalta a importância económica da produção leiteira e a sua influência em sectores como o da transformação e o da

produção de carne. Só na União Europeia, cerca de 60% da carne bovina é proveniente de gado leiteiro, 40% do leite é transformado em queijo e 30% é usado para produtos lácteos frescos (segmentos com maior crescimento de consumo na UE), sendo os restantes 30% da produção transformados em manteiga, leite em pó e caseína (Sottomayor, M., Costa, L. & Ferreira, M. P., 2012).

A União Europeia ainda é, a nível Mundial, dominante no que diz respeito à produção de leite, embora já não detenha a liderança do comércio internacional (Sottomayor, M., Costa, L. & Ferreira, M. P., 2012). Em Portugal a tendência registada é, em tudo idêntica à da UE. Os números disponíveis indicam que o sector dos laticínios representou entre 2003 e 2005 cerca de 11,5% da produção agrícola nacional (GPP, 2007) e 11% em 2009, sendo 94,65% da produção assegurada por explorações leiteiras de vacas.

Segundo Santos M. V. (2010), perante este cenário altamente competitivo e no qual as margens de lucro associadas à atividade têm vindo a diminuir, a gestão diária de uma exploração centra-se em dois polos fundamentais: manter a qualidade do leite produzido e obter a redução de custos de exploração. Em ambos os casos a ocorrência de quadros de mastite é um fator de grande influência. Sendo a mastite mundialmente reconhecida como a doença do gado leiteiro que mais prejuízos causa às explorações, a sua redução e controlo pode proporcionar uma diminuição de perdas de produção, menores custos de tratamentos associados, redução da quantidade de leite descartado e de descartes involuntários.

Presentemente, e sendo a mastite um assunto exaustivamente estudado ao longo das últimas décadas, existem diversos protocolos de prevenção e controlo devidamente testados, em termos da sua eficácia. No entanto, e devido ao facto da mastite ser uma afeção multifatorial, nenhuma medida aplicada de forma isolada apresenta, per si, sucesso total no controlo da doença. O sucesso da prevenção e controlo advém da utilização conjunta de uma série de medidas, aplicadas às especificidades de cada exploração. Há ainda que ter em consideração a avaliação custo-benefício das medidas a aplicar e a rapidez de resolução do problema com o consequente retorno económico para o produtor.

É nesta linha que se insere a pesquisa efetuada com a terapia combinada de *Cefquinoma*. Os resultados obtidos demonstram que, a terapia combinada de *Cefquinoma* apresenta uma taxa de cura mais elevada que o outro protocolo alternativo, como mencionado

em Bexiga et al. (2012), em Shpigel et al. (1997) e em Cannas da Silva, J. & Gonçalves, R. R. (2012).

Em relação ao tempo de tratamento até a obtenção de cura, pode-se afirmar não existir diferença significativa, uma vez que o número médio de dias de tratamento com *Cefquinoma* é 3,54 dias, e o número médio de dias de tratamento com outro protocolo é de 3,41 dias, o que não corrobora as conclusões apresentadas por Kleen et al (2009). Apesar da média de dias de tratamento ser ligeiramente superior com o *Cefquinoma*, este apresenta uma diminuição comparativamente à outra terapêutica, em que os valores de refugo, morte e perda de ¼ mamário são inferiores aos valores apresentados pelo grupo de protocolo alternativo.

Ao usar *Cefquinoma* como terapia combinada é potencializada a cura, uma vez que o grupo de *Cefquinoma* apresenta 39 mastites resolvidas ou seja, curadas, e o grupo da terapêutica alternativa apresenta 29 resolvidas.

Segundo Booth & McDonald (1992), as cefalosporinas têm uma grande utilização em diversas infecções, pois demonstram uma eficácia comprovada tanto sobre bactérias Gram-negativas como Gram-positivas. O uso deste antibiótico deve ser regrado e responsável uma vez que pode ter efeitos adversos (Ettinger & Feldman, 1997) embora de rara ocorrência, como: diarreia, irritação gástrica, reações de hipersensibilidade, nefrotoxicidade, etc.

Além dos efeitos secundários referidos há ainda que ter em consideração que, nos últimos anos, a *E. coli* tem vindo a demonstrar resistência às cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações. Segundo DEFRA (2010), estudos conduzidos demonstram que essa resistência é particularmente notada em novilhas que tenham sido alimentadas com leite descartado. Este leite poderá ter uma concentração elevada de resíduos devido ao facto de que a mastite, doença que mais afeta as explorações leiteiras, pode ser tratada com infusões intramamárias; sendo a excreção na primeira ordenha, após o tratamento, a que poderá ter maior concentração de resíduos.

NOAH (2011), defende que não há evidências comprovadas de que a resistência hospitalar, que tem vindo a aumentar nos últimos anos, possa estar correlacionada com a utilização de antibióticos em animais de consumo e que o risco de transmissão de bactérias resistentes é mínimo, uma vez que o leite é pasteurizado e a carne cozinhada.

No entanto, esta é uma questão que está longe de ser consensual a nível mundial e espera-se que os diversos estudos em curso e os programas de monitorização implementados, possam trazer luz á discussão.

5. CONCLUSÃO

Apesar do estudo, esforço e desenvolvimento de estratégias e métodos de controlo para minimizar a ocorrência de Mastites, esta continua a ser a doença mais importante a nível económico para as explorações leiteiras, afetando diretamente não só os produtores, mas também a indústria de transformação e até mesmo o consumidor final, a nível mundial. É devido ao nível de impacto e também ao fato de que a taxa de prevalência continua a ser bastante elevada, que o tratamento para Mastites está em constante pesquisa e evolução por forma a encontrar formas de controlo economicamente viáveis.

Após conclusão e reflexão do estudo efetuado, existem alguns pontos importantes a salientar. Apesar das diferenças dos tempos médios de tratamento das duas terapêuticas, não serem significativas, a terapia combinada de *Cefquinoma* 4,5% tem uma influência muito positiva a nível da evolução da afeção em qualquer um dos seus desfechos (morte, resolução, perda $\frac{1}{4}$ e refugo). Contudo, o resultado obtido não teve significância estatística. Se o estudo tivesse abrangido uma amostra maior (limitações dos dados disponíveis face ao número de explorações aderentes à terapia), as variações poderiam ser mais significativas, no que diz respeito aos dados de evolução da Mastite.

O uso de *Cefquinoma* bem como de todos os antibióticos deve ser ponderado e responsável, uma vez que o uso excessivo pode levar ao desenvolvimento de resistências.

Num futuro próximo, seria muito interessante repetir um estudo deste género com uma amostra superior, por forma a complementar os dados agora obtidos. Um estudo desta natureza é, sem dúvida, uma mais-valia para os Médicos Veterinários no auxílio ao tratamento de uma das doenças que mais afeta as explorações leiteiras e que para os produtores, leva a uma diminuição de perdas económicas e a uma melhoria do bem-estar dos efetivos leiteiros.

6. BIBLIOGRAFIA

Aarestrup, F.M., Jensen, N.E. (1997). Prevalence *and duration of intramammary infection in Danish heifers during the peripartum period*. J. Dairy Sci. 80, 307–312

Allen, F., 2010, “Futura Estratégia para o Setor Leiteiro Europeu para o Período de 2010-2015 e Anos Subsequentes”, Projecto de Parecer NAT/450, Comité Económico e Social Europeu, Bruxelas, Janeiro.

Bexiga, R., Cavaco, L., Vilela C. L. (2003). *Isolamento de Prototheca zopfii a partir de leite bovino*. Reviste Portuguesa de Ciências Veterinárias, 98, 33-38

Bexiga, R., David, P., Cannas da Silva, J., Preto, A., Teixeira, T. (2012). Combined therapy with intramammary and systemic cefquinome for the treatment of clinical mastitis. Poster apresentado no XXVII Congresso Mundial de Buiatria, Lisboa, Portugal.

Blood, D. C. & Radostits, O. (1991). M.Clínica veterinária. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap . 15. mastite p. 424 – 463

Blowey, R. & Edmondson, P. (2010). *Mastitis control in dairy herds*. (2^a Ed). Farming Press Books, United Kingdom.

Blowey, R. & Edmondson, P. (1995). *Mastitis control in dairy herds, An illustrated and practical guide*. (1^a Ed). Farming Press Books, United Kingdom.

Blowey, R. & Weaver, A. (2011). Color Atlas of Diseases and Disorders of Cattle. (3^aEd). Mosby Elsevier.

Booth, N.H.; McDonald, L. M. (1992). Farmacologia e terapêutica em veterinária. (6^a Ed.) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro

Bradford, P. S. (2009). Large Animal Internal Medicine. (4^a Ed.) Mosby Elsevier, USA.

Cannas da Silva, J. & Gonçalves, R. R. (2012). New therapy applications in dairy cows in severe end extreme conditions with Cefequinome 4,5% - a field trial. Poster apresentado no XXVII Congresso Mundial de Buiatria, Lisboa, Portugal.

Carneiro, E. (2007). *Qualidade do leite e o seu impacto na economia da exploração*. Apresentado no Seminário Anil – Contributos para a competitividade do sector leiteiro, Lisboa, Portugal. Acedido em 9 Maio 2012 em <http://www.anilact.pt/documentos/seminovec.pdf>

DEFRA (2010). Selection of ESBL-resistance in calves feed waste milk containing antibiotic residues. Acedido em 29 Novembro 2012 <http://randd.defra.gov.uk/Default.aspx?Menu=Menu&Module=More&Location=None&Completed=0&ProjectID=17262>

Direção Geral de Veterinária. (n/d). Resumo das características do medicamento: Cobactan 4.5%. Acedido em 2 Setembro 2012, <http://www.apifarma.pt/symposiumvet/Paginas/default.aspx>

Divers, T. J. & Peek, S. F, (2008). *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*. (2ªEd). Saunders Elsevier.

Dodd, F. H. (1983). *Mastitis—Progress on Control*. Journal of Dairy Science, 66, 1773- 1780

Enevoldsen, C., Gröhn, Y. T., Thysen, I., (1995). *Dairy cow characteristics related to Staphylococcus aureus isolation from quarter samples*. Journal of Dairy Research, 62.

Ettinger, S.J.; Feldman, E.C., (1997). *Tratado de Medicina Interna Veterinária*. (4ªEd) Manole LTDA, São Paulo

Fenalac, 2011, “O Presente e a Perspectiva Futura da Produção de Leite”, apresentação na Frilac, Outubro, Aveiro.

GPP, 2007, “Leite e Lacticínios: Diagnóstico Setorial”, Gabinete de Planeamento e Políticas, Acedido em 2 Outubro 2012 http://www.gppaa.min-agricultura.pt/pbl/Diagnosticos/Leite_Diagnostico_Setorial.pdf

Huijps et al. (2010). Costs and efficacy of management measures to improve udder health on Dutch dairy farms. *Journal of Dairy Sci.* 93 :115-124

Hurley, W. L. (2010). Mastitis Case Studies: Detection of Mastitis. Univerity of Illinois, U.S.A. Acedido em 6 Maio 2012, <http://classes.ansci.illinois.edu/ansc438/mastitis/detection.html>

James, M. (2002). Identification, Control, and Eradication of *Streptococcus agalactiae* Mastitis in Dairy Herds. Indiana Animal Disease Diagnostic Laboratory, Purdue University, USA. Acedido em 4 Maio 2012, <https://www.addl.purdue.edu/newsletters/2002/spring/samdh.shtml>

Jones, G. F. & Ward, G. E. (1990). *Evaluation of systemic administration of gentamicin for treatment of coliform mastitis in cows*. *Journal of the American Veterinary Medical Association* Vol. 197 No. 6 pp. 731-735

Jukola, E., Hakkarainen, J., Saloniemi, H., Sankari, S. (1996). Blood Selenium, Vitamin E, Vitamin A, and β -Carotene Concentrations and Udder Health, Fertility Treatments, and Fertility. *Journal of Dairy Science*, 79, 838

Kleen, J. L., Barrett, D. C., Courcier, E. & Biggs, A. M. (2009). Comparison of two treatments for clinical mastitis using cefquinome (Cobactan®). Poster apresentado na British Mastitis Conference, Stoneleigh Park, Inglaterra

Lohuis, M. C.A.J., Schukken, H. Y., Verheijden, M. H. J., Brand, A. Van Miert, M. A. P. J. S. A. (1990). Effect of Severity of Systemic Signs During the Acute Phase of

Experimentally Induced *Escherichia coli* Mastitis on Milk Production Losses. Journal of Dairy Science, 73, 333-342.

Lópes, H.S., Brumbaugh, G.W., Trigos, G.M. Bases farmacológicas Del tratamiento de la mastitis bovina. Vet. Méx. 27(1), 63-82, 1996.

Mellenberger, R. (2001). California Mastitis Test (CMT): An Invaluable Tool for Managing Mastitis. Dept. of Animal Sciences, Michigan State University, USA.

National Office of Animal Health (2011). Tehe use of Cephalosporins in Animal Health. Acedido a 29 Novembro 2012 <http://www.noah.co.uk/issues/briefingdoc/bd29.pdf>

Philpot, W. N. & Nickerson, S. C. (1991). *Mastitis: Counter attack* (pp. 3-44). Babson Bros., U.S.A

Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W., Constable, P. D. (2007). *Veterinary Medicine, A textbook of diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. (10ª Ed). Saunders Elsevier

Ramos, A. C. (2010). Breve introducción a la anatomia de la ubre y a la fisiologia del ordeño. Acedido em 28 Abril 2012 http://ocw.upm.es/produccion-animal/ordeno-mecanico/Tema_1._Anatomia_y_Fisiologia

Rebhun, W. C. (1995). Diseases of Dairy Cattle. Williams & Wilkins, U.S.A

Santos, M. V. (2010). Custo-benefício de medidas de controle e prevenção de mastite. Acedido em 17 Setembro 2012 www.milkpoint.com.br

Saran, A. & Chaffer, M. (2000). *Mastitis y Calidad de Leche* (pp. 9-10). Inter-Médica Editorial

Schreiner, D. A., Ruegg, P. L. (2003). Relationship Between Udder and Leg Hygiene Scores and Subclinical Mastitis. Journal of Dairy Science, 86, 3460

Sérieys, F., Raguet, Y., Goby, L., Schmidt, H., &Friton, G. (2005). Comparative efficacy of local and systemic antibiotic treatment in lactating cows with clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 88, 93-99

Shook, G. E., Schutze, M. M. (1994). Selection on Somatic Cell Score to Improve Resistance to Mastitis in the United States. *Journal of Dairy Science*, 77, 648.

Shpigel, N. Y., Levin, D., Winkler, M., Sara, A., Ziv, G., Bottner, A. (1997). Efficacy of cefquinome for treatment of cows with mastitis experimentally induced using E. coli. *Journal of Dairy Science*, 80, 318-323.

Slettbakk, T., Jørstad, A., Farver, T.B. and Holmes, J.C. (1995) Impact of milking characteristics and morphology of udder and teats on clinical mastitis in first- and second-lactation Norwegian cattle. *Preventive Veterinary Medicine* V. 24, Issue 4, 235-244.

Sottomayor, M., Costa, L. & Ferreira, M. P. (2012). Impacto da Reforma da PAC Pós-2013 no sector do Leite em Portugal. CEGEA da Universidade Católica Portuguesa, elaborado para a FENALAC

Wattiaux, M. A. Essenciais em Gado Leiteiro. 23) Mastite: A Doença e a sua Transmissão. Instituto Babcock para Pesquisa e Desenvolvimento da Pecuária Leiteira Internacional, University of Wisconsin-Madison, USA. Acedido a 10 de Agosto de 2012, de <http://babcock.wisc.edu/pt-br/node/124>

Watts, J. L., Lowery, D. E., Teel, J. F., Rossbach, S. (2000). Identification of *Corynebacterium bovis* and other Coryneforms Isolated from Bovine Mammary Glands. *Journal of Dairy Science*, 83, 2373-2379.