



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Clínica e cirurgia de espécies pecuárias

Estudo dos agentes ambientais em mastites clínicas

Patrícia Manuel Quintas Ricardo

Orientador: Professor Doutor José Alberto Caeiro
Potes

Coorientadora: Joana Filipa Vilas Boas Correia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Relatório de Estágio

Évora, 2014



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Clínica e cirurgia de espécies pecuárias

Estudo dos agentes ambientais em mastites clínicas

Patrícia Manuel Quintas Ricardo

Orientador: Professor Doutor José Alberto Caeiro
Potes

Coorientadora: Joana Filipa Vilas Boas Correia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Relatório de Estágio

Évora, 2014

"Success is not final, failure is not fatal: it is the courage to continue that counts."
Winston Churchill

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao professor José Potes por ter aceite ser o meu orientador e por ter sido o intermediário que possibilitou a realização deste estágio. Agradeço ainda toda a atenção e disponibilidade demonstrada não só neste último ano, mas ao longo de todo o curso.

A todos os Professores que durante os cinco anos de curso me mostraram a nobreza desta minha futura profissão.

À dra Joana Correia, minha coorientadora pela possibilidade de a acompanhar durante os cinco meses de estágio, pelos ensinamentos, pelos bons momentos passados e pela amizade que ficou.

À Cooperativa Agrícola de Vila do Conde, na pessoa do Sr. José Capela, pela cedência do material e instalações para a realização do trabalho experimental.

A todos os produtores pela simpatia demonstrada ao longo do estágio e àqueles que aceitavam recolher amostras das “mastites de aguadilha” e simpaticamente as entregavam no laboratório.

À Minda, Lúcia, Sara, dra Alice, Engenheira Isabel, Sr. Cruz e colegas estagiários que tão bem me receberam em Vila do Conde e me acompanharam durante todo o estágio.

Aos meus pais, pelo esforço que ambos fizeram ao longo deste percurso de seis anos para me poderem proporcionar uma vida que eles nunca tiveram. Espero um dia poder-vos retribuir à altura e agradeço-vos toda a confiança que sempre depositaram em mim.

À minha madrinha e tio Manuel pela presença constante e apoio ao longo destes 24 anos.

Ao meu irmão, cunhada e sobrinhos por tornarem a minha vida mais feliz.

Ao Osvaldo, pela presença constante ao longo dos últimos 8 anos, pelos conselhos sábios, pelas horas a que te obriguei a ouvir histórias de “bichos” e por toda a dedicação e carinho.

Às minhas queridas “Just”: Marta, Catarina e Stéphanie pela amizade “à primeira vista”. Já lá vão seis anos de gargalhadas, histórias mirabolantes, conversas até de madrugada, muitos trabalhos e muitas horas de estudo! Obrigada pelo apoio incondicional. Sem vocês este percurso teria sido muito mais difícil.

Aos muitos colegas do curso que contribuíram para que estes seis anos tenham sido os melhores da minha vida.

Resumo

Do presente relatório constam a descrição das atividades desenvolvidas no âmbito do estágio curricular do Mestrado Integrado de Medicina Veterinária, assim como uma revisão bibliográfica referente às mastites bovinas, nomeadamente as de origem ambiental. Por fim, é apresentado um trabalho experimental desenvolvido, cujo objetivo foi estudar os agentes ambientais responsáveis por mastites clínicas com visível descoloração do leite.

Atualmente, as mastites bovinas representam o maior desafio da indústria leiteira e são, não só uma preocupação entre produtores, mas também entre os consumidores que são cada vez mais exigentes com a qualidade dos produtos lácteos.

Ao longo das últimas décadas, os agentes contagiosos têm vindo a perder importância para os agentes ambientais, sendo estes apontados como os principais responsáveis pela incidência de mastites clínicas.

O carácter adaptativo dos agentes maioritários ambientais, nomeadamente *Escherichia coli* e *Streptococcus uberis*, é referido por vários autores e parece estar evidente no trabalho experimental conduzido.

Palavras-chave: mastites clínicas, *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, agentes ambientais

Abstract

Clinic and surgery of livestock species: a study of environmental agents in clinical mastitis

This report contains the description of the activities carried out under the traineeship of Master of Veterinary Medicine, as well as a literature review related to bovine mastitis, particularly those on environmental origin. Finally, an experimental work aimed to study the environmental agents responsible for clinical mastitis with visible discoloration of milk is presented.

Currently, bovine mastitis presents the greatest challenge on dairy industry and is not only a concern among producers but also among consumers who are increasingly demanding high quality of dairy products.

Over the past decades, infectious agents have been losing importance to environmental agents, which are pointed out as the main responsible for the incidence of clinical mastitis.

The adaptive nature of the majority environmental agents, including *Escherichia coli* and *Streptococcus uberis*, is mentioned by several authors and seems to be evident in the experimental work here conducted.

Keywords: clinical mastitis, *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, environmental agents

Índice Geral

Agradecimentos.....	iv
Resumo	v
Abstract	vi
Índice de gráficos	x
Índice de tabelas	x
Índice de figuras	xi
1. Introdução.....	xii
Lista de abreviaturas	xiii
1.1. Apresentação do local de estágio	1
2. Casuística.....	3
2.1. Apresentação e descrição das atividades desenvolvidas.....	3
2.2. Distribuição por espécies	3
2.3. Distribuição por áreas de intervenção.....	4
2.4. Medicina Preventiva	5
2.5. Controlo reprodutivo.....	9
2.5.1. Diagnósticos de gestação	9
2.5.2. Exame da vaca no pós-parto	10
2.5.3. Avaliação do desenvolvimento ovárico em novilhas.....	10
2.5.4. Confirmação da gestação na pré-secagem	10
2.5.5. Sincronização deaios.....	10
2.6. Clínica de ambulatório.....	14
2.6.1. Clínica médica	14
2.6.1.1. Sistema digestivo	15
2.6.1.1 Sistema músculo-esquelético.....	18
2.6.1.2. Sistema cardiovascular	18
2.6.1.3. Sistema reprodutivo.....	19
2.6.1.4. Doenças metabólicas	21
2.6.1.5. Pele e glândulas anexas	21
2.6.1.6. Doenças infecciosas.....	22
2.6.1.7. Neonatologia	24
2.6.2. Exames complementares de diagnóstico.....	25
2.6.3. Clínica cirúrgica	26
2.7. Controlo da qualidade do leite.....	27
2.7.1. Provas de estábulo.....	27
2.7.2. Teste Californiano de Mastites	28
2.7.3. Colheita de amostras.....	29

2.7.4.	Cultura bacteriológica.....	30
2.7.5.	Tratamento e medidas a tomar.....	32
3.	Revisão bibliográfica.....	38
3.1.	Introdução.....	38
3.2.	Mastites.....	40
3.2.1.	Definição.....	40
3.2.2.	Anatomia e fisiologia da glândula mamária.....	40
3.2.3.	Mecanismos de defesa.....	41
3.2.4.	Defesas anatómicas.....	42
3.2.5.	Defesas celulares.....	42
3.2.6.	Fatores solúveis.....	43
3.3.	Patogénese.....	45
3.3.1.	Resposta inflamatória.....	45
3.4.	Tipo de mastites.....	47
3.5.	Fatores predisponentes.....	47
3.5.1.	Fatores de risco do animal.....	47
3.5.2.	Fatores de risco ambiental.....	48
3.5.3.	Fatores de risco associados à rotina de ordenha.....	49
3.5.4.	Fatores de risco dos agentes patogénicos.....	51
3.6.	Etiologia.....	51
3.6.1.	Agentes contagiosos.....	52
3.6.1.1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	52
3.6.1.2.	<i>Streptococcus agalactiae</i>	53
3.6.1.3.	<i>Staphylococcus coagulase negativo</i>	54
3.6.1.4.	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	54
3.6.1.5.	<i>Corynebacterium bovis</i>	55
3.6.1.6.	<i>Mycoplasma spp</i>	55
3.6.2.	Agentes ambientais.....	56
3.6.2.1.	Coliformes.....	57
3.6.2.1.1.	<i>Escherichia coli</i>	57
3.6.2.1.1.1.	Fatores de virulência.....	57
3.6.2.1.1.2.	Resposta inflamatória.....	59
3.6.2.1.1.3.	Severidade.....	59
3.6.2.1.1.4.	Fatores que afetam a severidade.....	59
3.6.2.1.1.5.	Danos teciduais e perda de produção.....	60
3.6.2.1.1.6.	Persistência das IIM.....	61
3.6.2.5.	Outras bactérias Gram-negativo.....	63

3.6.2.5.1.	<i>Serratia spp.</i>	63
3.6.2.5.2.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	64
3.6.2.6.	Estreptococcus ambientais	64
3.6.2.6.1.	<i>Streptococcus uberis</i>	65
3.6.2.6.2.	Fatores de virulência	65
3.6.2.6.3.	Resposta inflamatória	66
3.6.2.6.4.	Fatores de risco do animal	67
3.6.2.6.5.	Persistência da infeção	67
3.6.2.7.	Terapêutica para estreptococcus ambientais	68
3.6.2.8.	Controlo	68
3.6.3.	<i>Trueperella pyogenes</i>	68
3.6.4.	Leveduras	69
3.6.5.	<i>Prototheca spp.</i>	69
3.7.	Impacto económico das mastites	70
4.	Trabalho experimental	72
4.1.	Introdução	72
4.2.	Materiais e Métodos	73
4.2.1.	Amostragem	73
4.2.2.	Identificação do agente infeccioso	73
4.2.3.	Análise de dados	73
4.3.	Resultados	75
4.3.1.	Agentes identificados	75
4.3.2.	Relação do agente identificado com o aspeto da amostra	77
4.3.3.	Relação entre o agente identificado e os DEL	79
4.3.4.	Relação entre o aparecimento de mastites clínicas e as condições climatéricas 80	80
4.4.	Discussão dos resultados	81
4.4.1.	Agentes identificados	81
4.4.2.	Relação do agente identificado com o aspeto da amostra	82
4.4.3.	Relação entre o aparecimento de mastites clínicas e as condições climatéricas 84	84
4.5.	Conclusão	86
4.6.	Conclusão geral	86
5.	Bibliografia	87

Índice de gráficos

Gráfico 1 – Distribuição de animais por espécie (n=5386)	4
Gráfico 2 – Distribuição dos animais em percentagem pelas várias áreas de intervenção	5
Gráfico 3 – Número de animais intervencionados na clínica de ambulatório	14
Gráfico 4 – Distribuição (FR) dos casos clínicos assistidos nas várias áreas de intervenção ...	15
Gráfico 5 - Concentração de FNT - α no leite após IIM com <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>S. marcescens</i>	62
Gráfico 6 –Distribuição dos agentes etiológicos identificados nas 83 amostras em estudo	76
Gráfico 7 – Distribuição do número de agentes etiológicos isolados segundo o grau de descoloração da amostra	78
Gráfico 8 – Distribuição do número de amostras segundo a sua descoloração entre agentes Gram negativo e estreptococos	79
Gráfico 9 – Relação entre a precipitação mensal e o número de mastites clínicas verificadas nesse período de tempo.....	80
Gráfico 10 – Ocorrência de mastites clínicas ao longo da lactação por agentes Gram negativo e estreptococos ambientais.....	83

Índice de tabelas

Tabela 1 – Número de animais registados por área de intervenção	4
Tabela 2 – Comparação entre vantagens e desvantagens da utilização de vacinas vivas e vacinas inativadas.	6
Tabela 3 – Características e modo de administração das vacinas aplicadas	7
Tabela 4 – Número de casos clínicos (Fa) registados por áreas de	15
Tabela 5 – Distribuição absoluta e relativa das várias afeções registadas no sistema digestivo16	
Tabela 6 - Distribuição absoluta e relativa das várias afeções registadas no sistema músculo-esquelético.....	18
Tabela 7 - Distribuição absoluta e relativa das várias afeções registadas no sistema reprodutivo	19
Tabela 8 – Distribuição absoluta e relativa das principais causas de distócias no decorrer do estágio	20
Tabela 9 –Distribuição absoluta e relativa das doenças metabólicas	21
Tabela 10 - Distribuição absoluta e relativa das afeções da pele e glândulas anexas.....	22
Tabela 11 – Distribuição absoluta e relativa das doenças infecciosas diagnosticadas.....	22
Tabela 12 - Distribuição absoluta e relativa dos casos registados na área da neonatologia	25
Tabela 13 - Distribuição absoluta e relativa dos exames complementares de diagnóstico	25
Tabela 14 - Distribuição absoluta e relativa das intervenções cirúrgicas	26
Tabela 15 – Relação entre o grau e o nº de células somáticas	29
Tabela 16 – Enumeração das principais características dos meios de cultura utilizados.....	31
Tabela 17 – Testes secundários para identificação de agentes isolados.....	32
Tabela 18 - Resumo das principais fontes de infeção, propagação e medidas a adotar no controlo de mastites segundo o agente isolado.....	34
Tabela 19 – Relação entre as mastites contagiosas e as mastites ambientais.....	39
Tabela 20 – Resumo das funções biológicas das defesas celulares inatas e adquiridas da glândula mamária	43

Tabela 21 - Resumo das funções biológicas dos fatores solúveis da glândula mamária	45
Tabela 22 – Principais agentes etiológicos das mastites bovinas	52
Tabela 23 – Resultados das análises microbiológicas: agentes	76
Tabela 24 – Agentes etiológicos identificados nas amostras consideradas “contaminadas”	76
Tabela 25 – Número de amostras segundo o agente etiológico isolado e classificação do seu aspeto	78
Tabela 26 – Número de amostras segundo o grupo de agentes ambientais isolados (gram – e estreptococos) e a sua ocorrência durante a lactação	79
Tabela 27 – Comparação entre os resultados obtidos no presente trabalho experimental e os resultados referidos pela bibliografia	82

Índice de figuras

Figura 1 – Distribuição regional do efetivo de bovinos em regime intensivo por concelho	1
Figura 2 – Representação esquemática do protocolo vacinal de Startvac®	8
Figura 3 – Representação esquemática do protocolo de sincronização PGF2 α	11
Figura 4 – Representação esquemática do protocolo Progesterona + PGF2 α	12
Figura 5 – Representação esquemática do protocolo GnRH + PGF2 α	12
Figura 6 – Aspeto típico de fezes de animais com disenteria de inverno	17
Figura 9 – Luxação coxo-femural	18
Figura 10 – Aspeto da distócia ao exame físico	21
Figura 11 - <i>Schistosoma reflexus</i> após realização da cesariana	21
Figura 14 – Cesariana para resolução de distócia por <i>Schistosoma reflexus</i>	27
Figura 15 – Sutura de Bhüner	27
Figura 16 – Diagrama esquemático dos procedimentos efetuados na cultura microbiológica no laboratório da CAVC	31
Figura 17 – a) Diagrama de secção longitudinal ilustrativo da estrutura anatómica do úbere e aparelho suspensor	41
Figura 18 – Diagrama ilustrativo da estrutura do canal do teto: rolhão de queratina e músculo esfíncter	42
Figura 19 - Diagrama ilustrativo da resposta inflamatória da glândula mamária	46
Figura 20 - Parque de maternidade com elevada conspurcação fecal	49
Figura 21 – Animal deitado no corredor onde é possível visualizar o nível de conspurcação fecal. Esta situação é especialmente problemática se ocorrer logo após a ordenha	49
Figura 22 – Fenómeno de <i>liner slips</i> : o impacto na ponta do teto é causado pela entrada do ar entre o teto e a tetina, resultando num desequilíbrio da pressão no coletor de leite	51
Figura 23 – Representação esquemática do lipopolissacarídeo	58
Figura 25 – Grupos constituídos para avaliação do aspeto de cada amostra segundo o grau de descoloração apresentada e a presença ou ausência de farrapos	77
Figura 26 – Parque exterior onde é possível visualizar a elevada conspurcação fecal e humidade presente. Esta foto foi captada logo após o final da ordenha	85

1. Introdução

Este relatório tem como objetivo a exposição das actividades acompanhadas e desenvolvidas ao longo do estágio curricular do Mestrado Integrado de Medicina Veterinária.

O estágio teve início no dia 14 de outubro de 2013 e terminou no dia 03 de março de 2014. Através da sua realização foi possível aplicar de forma prática os conhecimentos adquiridos ao longo do curso, adquirir novos conhecimentos nas mais diversas áreas relacionadas com os bovinos de leite, e ainda competências ao nível do trabalho laboratorial desenvolvido no âmbito da qualidade do leite.

O tema de revisão “estudo dos agentes ambientais em mastites clínicas” foi escolhido por ser uma problemática, não só na área geográfica de realização do estágio, mas também por se verificar em todo o mundo. O trabalho experimental apresentado procura determinar os agentes isolados em mastites clínicas, e verificar se os achados se encontram de acordo com a bibliografia, procurando explicar a prevalência destes agentes ambientais.

Lista de abreviaturas

Ac – Anticorpo
ADN – Ácido desoxirribonucleico
BEA - Agar biliar esculina
BHI – *Brain Heart Infusion*
BRSV – *Bovine Respiratory Syncytial Virus*
BVDV - *Bovine Viral Diarrhoea Virus*
CAVC – Cooperativa Agrícola de Vila do Conde
CCS – Contagem de Células Somáticas
DAD – Deslocamento de abomaso à direita
DAE – Deslocamento de abomaso à esquerda
DEL – Dias Em Leite
Fa – Frequência absoluta
FNT- α – Fator de Necrose Tumoral alfa
Fr – Frequência relativa
GnRH – Hormona Libertadora de Gonadotrofinas
IA – Inseminação Artificial
IBRV - *Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus*
IG – imunoglobulina
IIM – Infecção Intra- Mamária
IL – Interleucina
LPS – Lipopolissacarídeo
MC – Mastite clínica
MSA – Agar sal manitol
PGF2 α – Prostaglandina dois alfa
PMN – Polimorfonucleados
PRID - *Progesterone-releasing intravaginal device*
PTR – Palpação Transrectal
RMF – Retenção das membranas fetais
RPF - Agar plasma e fibrinogénio de coelho
SaaC - Complexo antigénico associado ao *Slime*
SCN – *Staphylococcus coagulase negativo*
SUAM - *Streptococcus uberis adhesion molecule*
TCM – Teste Californiano de Mastites
UFC – unidades formadoras de colónias

1.1. Apresentação do local de estágio

O estágio curricular decorreu na Cooperativa Agrícola de Vila do Conde (CAVC), localizada no concelho de Vila do Conde, distrito do Porto, região de Entre-Douro e Minho, Portugal.

A região de Entre-Douro e Minho, de acordo com Soares *et al* (2007) representa 47% do efetivo leiteiro de Portugal continental, manifestando deste modo a modificação da estrutura do setor produtivo conduzindo a uma intensificação e concentração regional.

O concelho de Vila do Conde faz parte, a par de Barcelos e Póvoa do Varzim, dos três concelhos a nível nacional que comportam cerca de 25% do efetivo leiteiro de Portugal, em explorações de regime intensivo (figura 1).

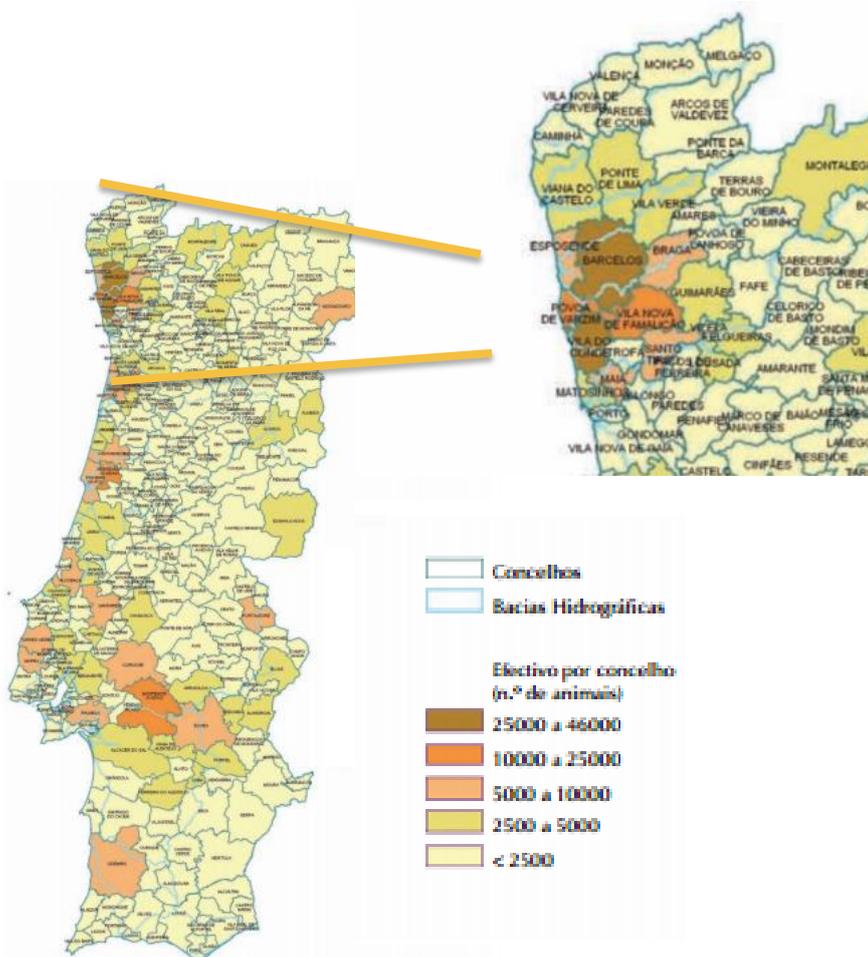


Figura 1 – Distribuição regional do efetivo de bovinos em regime intensivo por concelho (fonte DGV *in* : Soares *et al*, 2007)

A CAVC tem como missão o apoio da atividade agrícola do concelho com especial enfoque para as explorações de bovinos de leite. Conta com a existência de várias seções que para além de prestarem serviços nas mais variadas áreas, desenvolvem programas de investigação no sentido de se adquirir novos conhecimentos e capacidades relativas à produção de leite. A formação dos colaboradores e produtores é umas prioridades da CAVC.

2. Casuística

2.1. Apresentação e descrição das atividades desenvolvidas

Na CAVC surgiu a oportunidade de acompanhar o trabalho desenvolvido nas várias áreas que se relacionam diretamente com os bovinos de leite.

As atividades desenvolvidas estiveram relacionadas, na sua maior parte, com os serviços que competem ao Médico Veterinário realizar nas mais diversas áreas. No entanto, existiu a oportunidade de acompanhar o trabalho desenvolvido pelo departamento de Nutrição e, através de equipas multidisciplinares formadas por Engenheiros Zootécnicos e Médicos Veterinários, procurar encontrar soluções para problemas comuns. Esta experiência demonstrou que o trabalho interdisciplinar é um ponto-chave no sucesso de qualquer exploração de bovinos de leite.

Foram frequentadas também várias formações com componentes teóricas e práticas, umas destinadas aos Médicos Veterinários da CAVC, outras que tinham como público-alvo os produtores. Destas, salientam-se as que permitiram o contato direto com as dúvidas e opiniões dos produtores e que mostraram o quanto é importante a comunicação entre o Médico Veterinário e o produtor.

Neste capítulo, pretende-se apresentar as atividades desenvolvidas durante os cinco meses de estágio curricular.

De forma a tornar mais prática a apresentação de toda a casuística, esta será dividida nas várias áreas de ação, sendo apresentadas a frequência absoluta (Fa) e a frequência relativa (Fr) correspondente ao número de casos observados dentro da respetiva área, sendo n o número de animais intervencionados.

2.2 Distribuição por espécies

Os bovinos de leite foram, ao longo de todo o estágio, a principal espécie intervencionada. Foram examinados 5181 animais distribuídos pelas várias áreas de atuação.

Num número significativamente menor, foram também consultados caprinos ($n=6$), leporídeos ($n=5$) e canídeos ($n=4$), sendo animais que se encontravam nas explorações e que eram vistos no decorrer das visitas técnico-clínicas (gráfico 1).

Por se tratar de um número de casos de tal modo pouco expressivo, os caprinos, leporídeos e canídeos não constarão na caracterização que se seguirá, sendo esta apenas relativa aos bovinos.

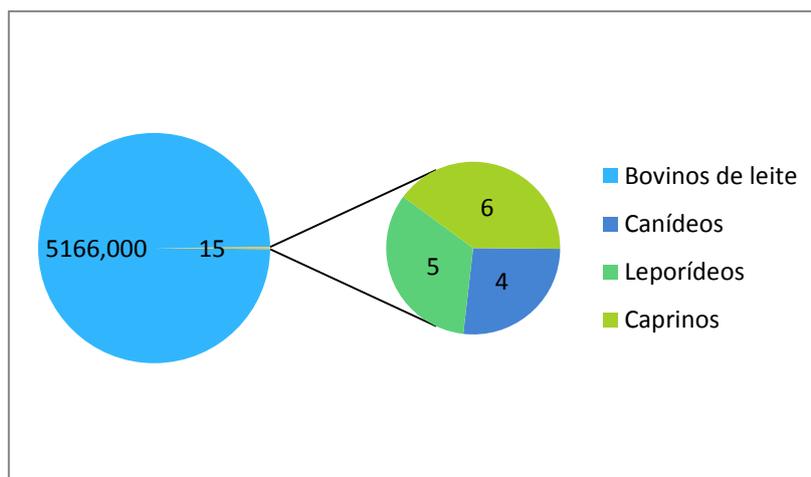


Gráfico 1 – Distribuição de animais por espécie (n=5181)

2.3 Distribuição por áreas de intervenção

No decorrer dos cinco meses de estágio, foram várias as áreas intervencionadas.

Como se pode constatar pela tabela 1, a área do Controlo da Qualidade do Leite foi onde se registou um maior número de animais observados, a saber cerca de 2000 animais. Nesta área, o número de casos apresentados corresponde ao número aproximado de animais submetidos ao Teste Californiano de Mastites. Por representar um volume muito elevado, as amostras e o respetivo processamento no laboratório não foram contabilizados, sendo que será feita uma revisão e caracterização deste trabalho mais adiante.

As visitas mensais às várias explorações com plano de fertilidade contribuíram para que a área do Controlo reprodutivo representasse o segundo lugar com um número de animais contabilizando 1681 animais.

A Medicina preventiva, área que tem vindo a adquirir um papel cada vez mais importante nas explorações de bovinos de leite, contou com cerca de 1100 animais intervencionados.

Por fim, surge a Clínica de ambulatório onde se registaram um total de 385 animais consultados.

Tabela 1 – Número de animais registados por área de intervenção

Áreas de intervenção	
	Frequência absoluta
Medicina preventiva	1100
Controlo reprodutivo	1681
Clínica de ambulatório	385
Controlo da qualidade do leite	+/-2000

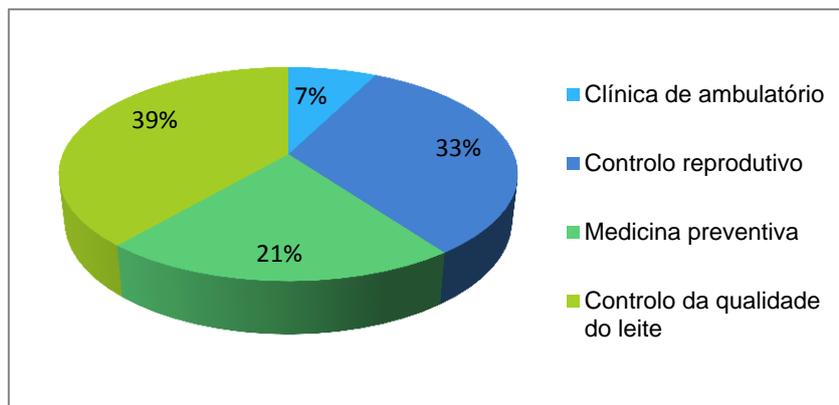


Gráfico 2 – Distribuição dos animais em percentagem pelas várias áreas de intervenção

2.4 Medicina Preventiva

As ações profiláticas realizadas durante o estágio consistiram essencialmente na vacinação de alguns efetivos.

A vacinação tem como objetivo promover o desenvolvimento de imunidade adquirida através da inoculação de agentes ou componentes de agentes não patogénicos embora imunogénicos, ou organismos estreitamente relacionados (Meeusen *et al*, 2007).

As vacinas classificam-se, de modo geral, quanto ao tipo de imunidade conferida em vacinas vivas e vacinas inativadas e quanto à valência, em vacinas monovalentes e polivalentes (Tizard, 2009).

Na tabela 2 são referidas as principais vantagens e desvantagens do uso de vacinas vivas e inativadas.

Em relação à valência, as vacinas monovalentes caracterizam-se por promoverem a imunização apenas contra um agente etiológico enquanto as vacinas polivalentes conferem proteção contra vários agentes. Na prática clínica, as vacinas polivalentes são as mais utilizadas uma vez que o uso deste tipo de vacinas representa um menor número de contenções necessárias e, conseqüentemente, uma diminuição de custos associados à profilaxia.

A existência de um bom plano vacinal não só é fundamental para um máximo desempenho produtivo, sendo que este só é alcançado quando os animais se encontram saudáveis, como também vai originar uma diminuição da incidência e severidade de determinadas patologias doenças e, assim, reduzir as perdas económicas e produtivas (Waldner *et al*, 2014).

O plano vacinal deve ser específico e determinado para cada exploração tendo em conta fatores como o manejo dos animais, instalações físicas, prevalência da doença e o seu custo, e ainda custo da implementação do plano vacinal.

Tabela 2 – Comparação entre vantagens e desvantagens da utilização de vacinas vivas e vacinas inativadas (Adaptado de Tizard, 2009; Waldner *et al*, 2014).

	Vacinas vivas	Vacinas inativadas
Vantagens	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Conferem uma resposta imunitária mais rápida e duradoura 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Probabilidade reduzida de provocar doença devido a virulência residual
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Indução de imunidade humoral e celular 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mais estáveis durante armazenamento
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Conferem imunidade local 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ausência de perigo de transmissão de doença mesmo a animais imunologicamente comprometidos
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Raramente causam reacções de hipersensibilidade pois não necessitam de adjuvantes 	
Desvantagens	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Probabilidade de provocar doença devido a virulência residual 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Conferem uma resposta imunitária mais lenta e de curta duração
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Usadas em animais gestantes podem ocorrer abortos, dependendo do agente viral 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Indução de imunidade humoral e celular limitada ▪ Não conferem imunidade local ▪ Probabilidade de ocorrência de reacções de hipersensibilidade devido ao uso de adjuvantes

A maior parte das explorações visitadas tem um plano vacinal definido que é elaborado e executado pelo Médico Veterinário assistente. No entanto, uma pequena minoria das explorações, sobretudo as de menor dimensão, não possui qualquer plano vacinal.

Os principais agentes infecciosos contra os quais os efetivos leiteiros foram vacinados são: vírus da diarreia viral bovina (BVDV – Bovine Viral Diarrhoea Virus), vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBRV – Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus), vírus respiratório sincicial bovino (BRSV - Bovine Respiratory Syncytial Virus), vírus da parainfluenza-3 e *Clostridium sp.*.

As vacinas escolhidas para proceder à imunização foram vacinas polivalentes cujas características e modo de administração se encontram descritos na tabela 3.

Tabela 3 – Características e modo de administração das vacinas aplicadas

Vacinas				
Nome comercial	Agentes	Dose	Via de administração	Revacinação
Triangle 4®	BVDV, BRSV, IBRV, PI3 inativados	5mL	Subcutânea; Intramuscular	Anual
Rispoval 4®	BVDV, IBRV - inativados PI3, BRSV – vivos modificados	5mL	Subcutânea; Intramuscular	Anual
Covexin 8®	<i>Clostridium perfringens</i> tipo B, tipo C, tipo D; <i>C. novyi</i> ; <i>C. septicum</i> ; <i>C. tetani</i> – toxóides <i>C. chauvoei</i> – cultura completa <i>C. haemolyticum</i> - células	5mL	Subcutânea	Semestral
Startvac®	<i>Staphylococcus aureus</i> (CP8) estirpe SP 140 inativada, com expressão do SaaC; <i>Escherichia coli</i> J5 inativada	2mL	Intramuscular	-

Como parte do plano de controlo de mastites, foram ainda imunizados dois efetivos (com aproximadamente 30 vacas aleitantes e novilhas cada) com a vacina Startvac®.

Esta vacina previne novas infecções por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase-negativa*, *Escherichia coli* e outros coliformes, originando uma redução na severidade das mastites e, conseqüentemente, o decréscimo da contagem individual de células somáticas (CCS), sendo a primeira e única vacina aprovada para este efeito pela Agência Europeia dos Medicamentos. Uma das suas características é a prevenção da formação do biofilme produzido por determinadas estirpes de *Staphylococcus aureus*.

O *Staphylococcus aureus* é considerado o agente etiológico mais importante nas mastites bovinas contagiosas e a sua capacidade de formação de biofilme é, possivelmente, o seu fator de virulência mais relevante no estabelecimento da infecção da glândula mamária (Costerton *et al*, 1999).

Prenafeta *et al*. (2010) referem que a imunização com o componente antigénico SaaC (Complexo antigénico associado ao Slime) expresso pela estirpe *Staphylococcus aureus* SP 140, pode resultar numa proteção contra novas infeções por *S. aureus* e uma redução na multiplicação de *S. aureus* na glândula mamária, devido ao papel ativo dos Ac (anticorpos) anti-SaaC.

Na composição da vacina, entram também bacterinas de *Escherichia coli* J5 que, após a sensibilização do sistema imunitário, vão resultar na produção de Ac anti-E.coli J5. Numa situação de infeção intramamária (IIM), os anticorpos anti-E.coli J5 que vão opsonizar o lipopolissacarídeo da membrana exterior das bactérias gram-negativo (LPS). Estes Ac foram associados a uma maior capacidade de resposta imunitária contra o agente causal resultando num menor período de IIM, e conseqüentemente numa diminuição significativa das perdas de leite e abate devido a mastites clínicas (Wilson *et al*, 2009).

Para que a imunização seja bem-sucedida, é fundamental cumprir o esquema vacinal: todas as vacas e novilhas gestantes devem ser vacinadas de acordo com a figura 2, sendo que, 45 dias antes do parto, deve ser administrada a primeira dose, 35 dias depois, a segunda dose, e, por fim, a terceira e última doses 52 dias pós-parto.

O uso de vacinas anti-mastíticas é parte integrante do plano de controlo de mastites e não substitui nenhuma das outras medidas, como, por exemplo, a higiene da rotina de ordenha, o uso adequado e uma verificação frequente do equipamento da ordenha, terapia adequada na secagem, tratamento das mastites clínicas durante a lactação e uma limpeza frequente das camas e parques. O produtor deve assim ser elucidado que a sua colaboração é fundamental e que é o seu papel que, em parte, vai determinar o sucesso da vacinação.

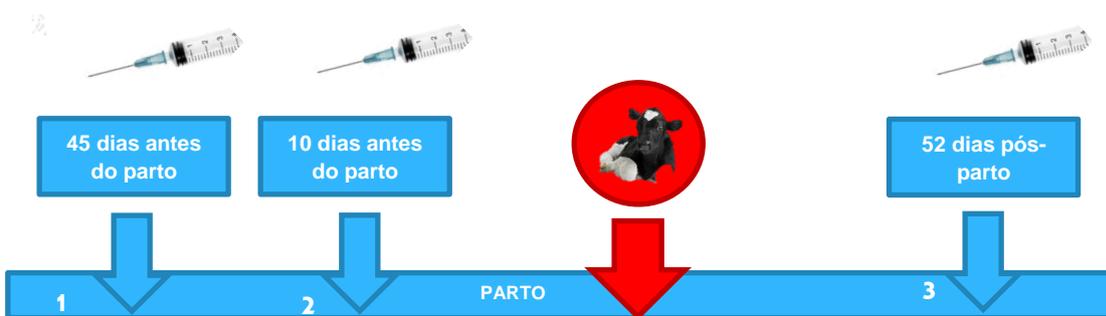


Figura 2 – Representação esquemática do protocolo vacinal de Startvac® (Adaptado de www.hipra.com)

2.5 Controlo reprodutivo

No decorrer do estágio, foram realizadas visitas no âmbito da reprodução a cerca de 20 explorações, com efetivos cuja dimensão total é muito variável entre si (desde 30 a 250 animais).

O Plano de Fertilidade executado para as várias explorações determina visitas de controlo reprodutivo mensais ou bimensais (dependendo da dimensão do efetivo) onde é realizado o diagnóstico de gestação, avaliação da involução uterina, avaliação do desenvolvimento ovário em novilhas, confirmação da gestação na pré-secagem, sincronização de cios e tratamento de patologias reprodutivas diagnosticadas nas visitas.

Em explorações de menor dimensão onde não se verifica a existência de programas informáticos que permitem o registo dos dados reprodutivos, é também prestado apoio ao nível do registo da informação recolhida após a visita no “Mapa de Estábulo”. O “Mapa de Estábulo” possibilita o registo individual dos dados reprodutivos de cada animal de forma simplificada e ainda as ações a implementar no futuro (por exemplo, data de secagem). Foram ainda realizadas visitas para além das agendadas com o objetivo de confirmar o cio e recomendar a altura ideal para se proceder à inseminação artificial (IA).

2.5.1. Diagnósticos de gestação

Diferentes métodos de diagnóstico de gestação têm sido usados para a deteção da presença ou ausência de gestação nos bovinos de leite. Baseados no maneio como o não retorno ao estro, em testes laboratoriais, no exame clínico, como a palpação transrectal (PTR) ou em técnicas de ultrasonografia. Os métodos escolhidos permitem uma identificação dos animais não gestantes e, conseqüentemente, a tomada de medidas para uma nova indução de cio, revelando-se essenciais para a gestão da eficiência produtiva (Noakes *et al*, 2001).

Os diagnósticos de gestação nas explorações assistidas foram realizados com recurso à PTR. Através deste método é possível detetar as alterações morfológicas ocorridas no aparelho reprodutor e inferir se existe ou não gestação.

Os animais são examinados a partir do 35º dia após a IA e, se o resultado for duvidoso na primeira visita, realiza-se um novo diagnóstico de gestação para confirmação, na próxima visita.

A PTR tem a vantagem de ser precisa, rápida e relativamente barata quando comparada com os outros métodos de diagnóstico de gestação. No entanto, para ser bem-sucedida, é necessário experiência do uso desta técnica por parte do Médico Veterinário (Broaddus & Vries, 2005).

A ocorrência de morte embrionária ou fetal subsequente, falha da involução uterina ou a existência de mucómetra, piómetra ou hidrómetra são as principais razões que podem levar a que um diagnóstico de gestação seja falso-positivo. Um diagnóstico falso-negativo pode ocorrer quando é feita uma retração incompleta do útero, problema associado a animais múltiparos com abdómen profundo (Noakes *et al*, 2001).

2.5.2. Exame da vaca no pós-parto

A involução uterina representa o retorno, após o parto, à sua condição pré-gravídica, ocorrendo durante este processo alterações tanto a nível micro e macroscópico como a nível funcional. É esperado que o diâmetro do corno uterino anteriormente gravídico reduza para metade em cinco dias e, o seu comprimento anterior, em quinze (Noakes *et al*, 2001).

Para a avaliação da involução uterina examinaram-se, através da PTR, todos os animais com mais de 30 dias pós-parto. Nesta altura espera-se que tenha ocorrido uma involução completa do útero com a presença de ovários cíclicos.

A falha na involução uterina surgiu, na maior parte dos animais, associada à presença de metrites e endometrites clínicas encontrando-se de acordo com o que é referido por Sheldon *et al* (2008).

2.5.3. Avaliação do desenvolvimento ovárico em novilhas

Durante as visitas foram também observadas novilhas cujos produtores referiam que não manifestavam o cio, apesar de já terem idade para serem inseminadas. Na maioria dos casos, estas novilhas apresentavam-se com baixa condição corporal e um fraco desenvolvimento ovárico, perceptível à PTR. Como tratamento recomendava-se a administração de vitaminas via parenteral.

2.5.4. Confirmação da gestação na pré-secagem

Em algumas explorações onde era prestado o serviço de fertilidade, aos animais prestes a entrarem no período de secagem, era realizada uma reconfirmação do diagnóstico de gestação efetuado anteriormente.

Através da PTR, é possível palpar o frémito da artéria uterina e os cotilédones e, assim, reconfirmar o diagnóstico de gestação como positivo.

2.5.5. Sincronização de cios

Ao longo do tempo, têm sido desenvolvidos vários protocolos de sincronização de estro e/ou ovulação de forma a maximizar as probabilidades de uma fêmea ficar gestante com um número reduzido de inseminações, alguns dos quais sem necessidade de deteção de cios. A maioria destes protocolos consiste na manipulação das ondas de desenvolvimento folicular, estimulação da ovulação em vacas em anestro, regressão do corpo lúteo em vacas cíclicas e sincronização do estro e (ou) ovulação no final do tratamento (Lucy *et al*, 2004; Cavalieri *et al*, 2006).

As hormonas usadas no controlo farmacológico do ciclo éstrico dos bovinos são idênticas (ou análogas) às hormonas reprodutivas naturalmente presentes no hipotálamo (Hormona

Libertadora de Gonadotrofinas - GnRH), ovário (estradiol e progesterona) e útero (Prostaglandina dois alfa - PGF2 α) (Lucy *et al*, 2004).

Os principais protocolos de sincronização implementados nas visitas de fertilidade foram: PGF2 α , progesterona + PGF2 α , GnRH + PGF2 α .

- **PGF2 α** : consiste na administração de uma ou duas doses com um intervalo de 11-14 dias entre si, como é demonstrado na figura 3. A sua eficácia depende da presença de um corpo lúteo responsivo (Lucy *et al*, 2004).

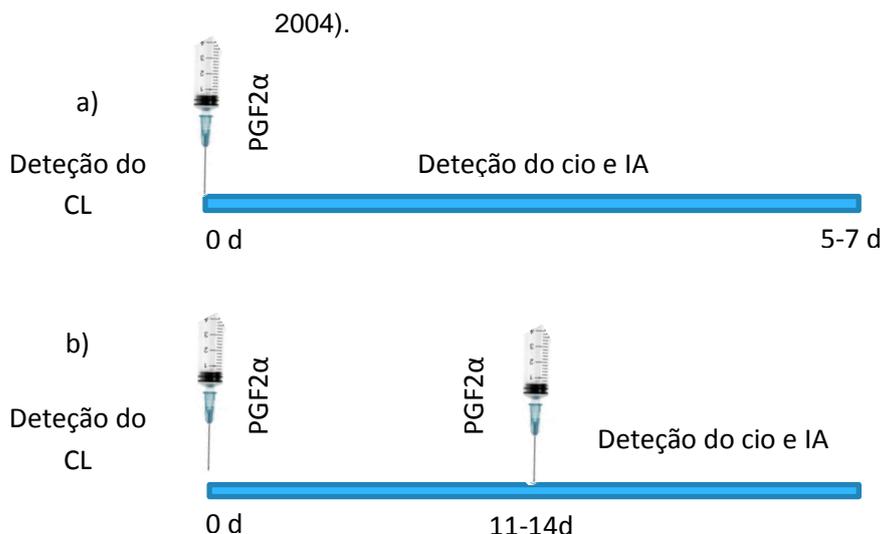


Figura 3 – Representação esquemática do protocolo de sincronização PGF2 α : a) administração única após detecção do CL com detecção do cio e posterior IA; b) administração no dia 0 repetida 11 a 14 dias depois, com detecção do cio e IA.

Este protocolo foi escolhido para vacas que à PTR tinham um corpo lúteo bem desenvolvido, cios difíceis de detetar e/ou um número elevado de IA.

- **Progesterona + PGF2 α** : consiste na utilização de um dispositivo intravaginal PRID (*Progesterone-releasing intravaginal device*) impregnado com progesterona (P4) durante 7 dias seguida de administração de PGF2 α um a dois dias antes da retirada do dispositivo (figura 4). Este método resulta numa melhoria da taxa de gestação, mas a taxa de exibição do cio diminui, quando comparado com os tratamentos de longa duração com progesterona (>12dias) (Lane *et al*, 2008).

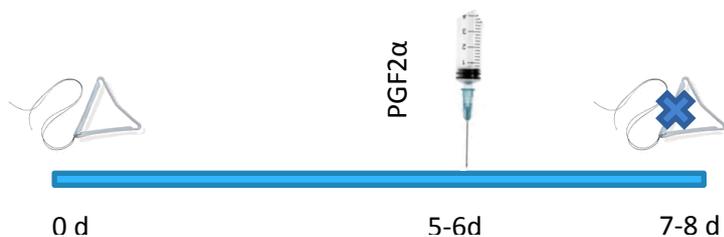


Figura 4 – Representação esquemática do protocolo Progesterona + PGF2α: colocação do dispositivo intravaginal com administração de PGF2α um a dois dias antes da sua retirada; IA fixa 56 +/- 3h após a remoção do dispositivo.

Este protocolo foi usado em vacas não cíclicas ou com elevado número de IA e ainda não estavam gestantes.

- **GnRH + PGF2α:** consiste na administração de GnRH ou análogos seguida, 7 dias mais tarde, pela administração de PGF2α com a IA após a detecção do cio (figura 5). Este protocolo surge como uma alternativa ao Ovsynch (duas injeções de GnRH, 7 dias antes e 48h após a injeção de PGF2α) permitindo, assim, uma diminuição dos custos hormonais, uma vez que existe menos uma administração de GnRH, apresentando, apesar disso, uma taxa de concepção semelhante (Rabiee *et al*, 2005).

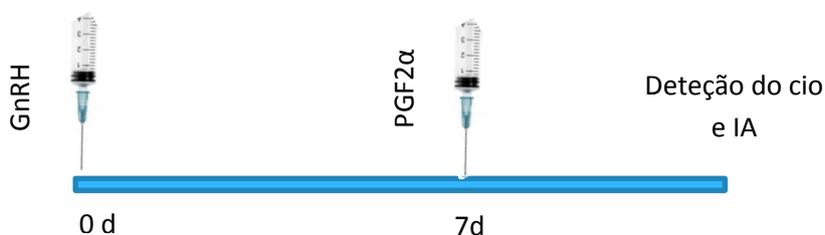


Figura 5 – Representação esquemática do protocolo GnRH + PGF2α: administração de GnRH seguida de administração de PGF2α após 7 dias; após a detecção do cio realizar a IA.

Este foi o protocolo escolhido para vacas não cíclicas ou com elevado número de IA.

No decorrer das visitas de fertilidade foram acompanhados vários casos onde se suspeitou de mortalidade embrionária.

De acordo com Silke *et al*, 2002, um número muito baixo de perdas embrionárias ocorrem nos 8 dias imediatos à fecundação, 70-80% ocorrem entre os 8 e 16 dias após a inseminação, 10% entre os dias 16 e 42 e 5-8% entre o dia 42 e o final de gestação.

Uma patologia reprodutiva encontrada com alguma frequência nos animais examinados durante as visitas foram os quistos foliculares.

Os quistos foliculares caracterizam-se por uma estrutura ovárica anovulatória, mole, preenchida por líquido e com cerca de 25mm de diâmetro à PTR. Cerca de 10 a 13% dos efetivos de bovinos de leite podem desenvolver esta condição, o que pode representar um aumento dos intervalos entre partos de 40 a 50 dias sendo, portanto, uma causa importante de infertilidade e perdas económicas para os produtores (Garverick, 1997).

O tratamento aplicado nestes casos consistiu na administração única de um análogo da GnRH, acetato de buserelina (Receptal®), na dose de 20µg.

Hillman & Gilbert (2007) referem que entre 2/3 a 3/4 dos animais tratados com GnRH respondem ao tratamento e 18 a 23 dias após o seu início manifestam o cio.

2.6 Clínica de ambulatório

A clínica de ambulatório consistiu na realização de consultas em várias explorações sendo estas solicitadas através de contacto telefónico.

A casuística relativa à clínica de ambulatório compreendeu duas áreas de ação: a clínica médica e a clínica cirúrgica.

No decorrer do estágio foram contabilizadas um total de 300 animais consultados cujo diagnóstico foi classificado e distribuído pelos vários sistemas, e 29 procedimentos cirúrgicos.

No gráfico 3 para além do número de animais intervencionados clínica e cirurgicamente, encontra-se ainda referido o número de animais aos quais foram realizados exames complementares de diagnóstico, no seguimento da consulta.

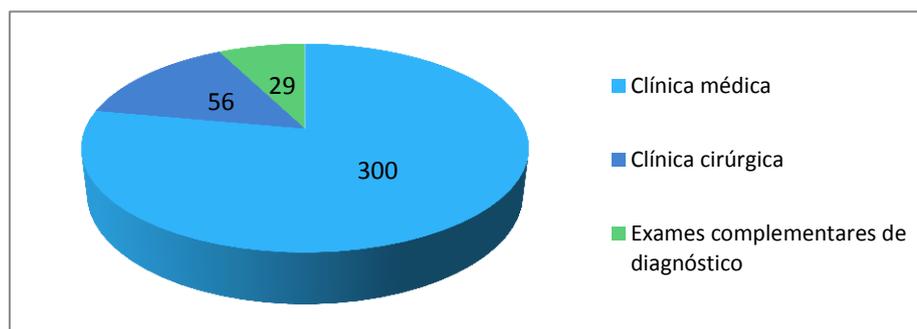


Gráfico 3 – Número de animais intervencionados na clínica de ambulatório

2.6.1. Clínica médica

Foram vários os sistemas orgânicos intervencionados na clínica médica. No entanto, a frequência de casos clínicos entre os sistemas variou, como é possível constatar pela tabela 4. Os problemas relacionados com o sistema reprodutivo foram os que originaram o maior número de consultas, representando uma Fr de 27% de todos os casos clínicos assistidos. As doenças metabólicas surgiram com uma Fr de 19%, seguidas pela neonatologia e sistema digestivo, 13% e 12% respetivamente. No gráfico 3 está representada a Fr dos casos clínicos pelas várias áreas intervencionadas.

Tabela 4 – Número de casos clínicos (Fa) registados por áreas de Intervenção

Áreas de intervenção	
	Número de casos (Fa)
Sistema digestivo	34
Sistema respiratório	27
Sistema músculo-esquelético	5
Sistema cardiovascular	4
Sistema reprodutivo	82
Doenças metabólicas	57
Pele e glândulas anexas	23
Doenças parasitárias	16
Doenças infecciosas	13
Neonatologia	39

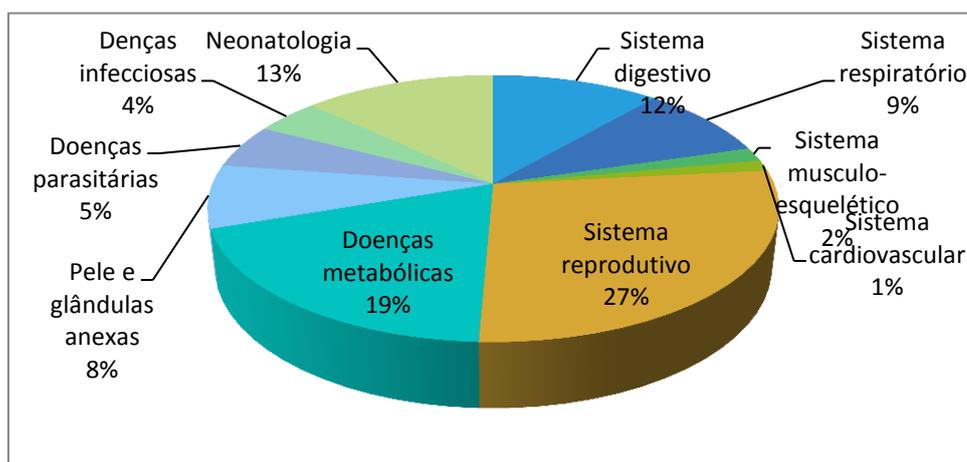


Gráfico 4 – Distribuição (Fr) dos casos clínicos assistidos nas várias áreas de intervenção

2.6.1.1. Sistema digestivo

No decorrer do estágio foram várias as afeções diagnosticadas do foro digestivo (tabela 5).

Os deslocamentos de abomaso à esquerda (DAE) foram a doença digestiva mais frequente, com uma Fa de 15 casos. Destes, apenas dois não foram submetidos a resolução cirúrgica por opção dos produtores.

Os deslocamentos de abomaso à direita (DAD) verificaram-se num número muito menor e, dos três casos acompanhados, apenas dois foram submetidos a tratamento, neste caso, cirúrgico, enquanto o terceiro caso, por o animal se encontrar já bastante debilitado e com uma pneumonia concomitante, o produtor optou por não tratar.

Tabela 5 – Distribuição absoluta e relativa das várias afeções registadas no sistema digestivo

Doenças digestivas		
	Frequência absoluta	Frequência relativa
DAE	15	44,1%
DAD	3	8,8%
Torção do ceco	1	2,9%
Meteorismo	1	2,9%
Disenteria de inverno	3	8,8%
Úlcera perfurada de abomaso	1	2,9%
Indigestão simples	10	29,4%

Foram acompanhados três casos de disenteria de inverno, diagnosticados na mesma exploração no espaço de duas semanas.

A disenteria de inverno é uma doença viral causada por determinadas estirpes de coronavírus bovino. Manifesta-se por surtos súbitos e explosivos de diarreia entre os meses de outubro e abril (meses frios) e afeta quase 100% do efetivo em explorações onde os animais contactem com o vírus pela primeira vez (Metre *et al*, 2007).

Os sinais clínicos manifestam-se em poucos animais de cada vez e incluem diarreia fluída, escura e fétida, perda de apetite, perdas abruptas na produção entre os 10 e 50% e desidratação ligeira a moderada. Em alguns animais, sobretudo aqueles que se encontram na primeira lactação e experienciam a doença pela primeira vez, os sinais clínicos são mais severos e caracterizam-se por diarreia com abundantes coágulos de sangue devido à enterocolite hemorrágica (figura 6), podendo, inclusive, levar à anemia por perda de sangue (Metre *et al*, 2007).

Geralmente a doença é autolimitante circulando pelo efetivo entre 7 a 14 dias, e apenas os animais com sinais clínicos mais severos necessitam de intervenção médica, sendo o tratamento apenas sintomático e recomendado em casos de desidratação severa ou anemia (Metre *et al*, 2007).

Nos casos acompanhados, o tratamento instituído teve como objetivo compensar as perdas de sangue severas através da administração de um fármaco anti-anémico, Fercobsang 12®, constituído por ferro, tiamina, vitaminas do complexo B.



Figura 6 – Aspeto típico de fezes de animais com disenteria de inverno (fotografia original)

Dos casos clínicos acompanhados com sede no sistema digestivo há ainda a salientar o caso de úlcera perfurada de abomaso cujo diagnóstico foi estabelecido através da realização de necrópsia.

O animal em questão encontrava-se bastante deprimido no momento da consulta e acabou por morrer subitamente durante a manipulação no exame físico.

Na necrópsia verificou-se a existência de uma peritonite difusa envolvendo vários órgãos, facilmente perceptíveis através da figura 7. A mucosa abomasal encontrava-se hemorrágica e verificou-se a presença de uma úlcera de espessura completa perfurada (figura 8)



Figura 7 – Folhetos de fibrina aderentes aos órgãos da cavidade abdominal (fotografia original)



Figura 8 – Úlcera perfurada de abomaso – achado de necrópsia (fotografia original)

2.6.1.1 Sistema músculo-esquelético

De entre os casos clínicos registados no sistema músculo-esquelético, foram os abscessos que contabilizaram uma maior Fa, a saber três casos (tabela 6).

Verificou-se ainda a existência de um caso com lesão do nervo ciático e um caso da luxação coxo-femural (figura 9).

Tabela 6 - Distribuição absoluta e relativa das várias afeções registadas no sistema músculo-esquelético

Patologias músculo-esqueléticas		
	Frequência absoluta	Frequência relativa
Luxação coxo-femural	1	20%
Lesão do n. ciático	1	20%
Abcesso	3	40%



Figura 7 - Luxação coxo-femural (fotografia original)

2.6.1.2. Sistema cardiovascular

A reticulo-pericardite traumática foi o diagnóstico presuntivo atribuído a quatro animais.

Estes animais apresentavam à auscultação sons cardíacos bastante alterados, pulso jugular e baixa da produção de leite que, após a administração do íman, mostraram melhorias satisfatórias.

2.6.1.3. Sistema reprodutivo

Como já foi referido, o sistema reprodutivo foi aquele que registou um maior número de casos clínicos. A retenção das membranas fetais (RMF) foi a afeção com uma maior frequência, seguida pelas distócias, metrites, abortos e fetos mumificados (tabela 7).

Tabela 7 - Distribuição absoluta e relativa das várias afeções registadas no sistema reprodutivo

Patologias reprodutivas		
	Frequência absoluta	Frequência relativa
Distócias	19	22,4%
Metrites	24	28,2%
RMF	32	37,6%
Abortos	7	8,2%
Fetos mumificados	3	3,5%

RMF – retenção das membranas fetais

A distócia pode ser classificada como uma alteração da evolução natural do parto, especialmente na fase de expulsão, que pode resultar num atraso na expulsão do feto ou impedi-la definitivamente (Stilwell, 2013).

As causas de distócia podem ser de origem maternal ou fetal. De origem maternal, as causas podem estar relacionadas com a força expulsiva, como é o caso da inércia uterina, ou relacionadas com o canal de parto, quer seja por uma pélvis inadequada (imaturidade, fraturas, dieta) ou por insuficiente dilatação (torsão uterina, prolapso vaginal). De origem fetal, as causas podem dever-se a fetos anormalmente grandes, fetos com alterações de desenvolvimento (monstros) ou incorreta apresentação (Noakes *et al*, 2001).

As principais causas de distócia apuradas nos casos clínicos acompanhados encontram-se referidas na tabela 8, sendo essencialmente por defeitos de postura.

Vitelos com apresentação anormal e torsões uterinas foram as causas mais comumente encontradas aquando das consultas.

Apenas três casos dos referidos na tabela 8 não foram resolvidos medicamente através do auxílio no trabalho de parto, sendo necessário partir para a resolução cirúrgica através de realização de cesariana. Os casos cuja intervenção cirúrgica foi necessária foram aqueles em que se verificou a existência de *Schistosoma reflexus* e um vitelo com apresentação anterior “sentada”.

Tabela 8 – Distribuição absoluta e relativa das principais causas de distócias no decorrer do estágio

Causas de distócias		
	Frequência absoluta	Frequência relativa
Torção uterina	5	26,3%
Desproporção feto-maternal	1	5,3%
Apresentação anterior c/ flexão de MA	4	21,1%
Apresentação anterior c/ desvio lateral da cabeça	2	10,5%
Apresentação anterior c/ desvio ventral da cabeça	2	10,5%
Apresentação anterior “sentada”	1	5,3%
Partos gemelares	2	10,5%
<i>Schistosoma reflexus</i>	2	10,5%

A ocorrência de *Schistosoma reflexus* representou 10,5 % das distócias assistidas durante o estágio.

Schistosoma reflexus é uma condição congênita rara e fatal, primariamente observada em ruminantes. As malformações que definem este síndrome consistem na eventração das vísceras abdominais, inversão espinal e membros adjacentes à cabeça com existência de anquilose (Laughton *et al*, 2005) (figura 11). A apresentação pode ser visceral, com projeção das vísceras fetais através da vulva (figura 10), ou apresentação pelas extremidades (Noakes *et al*, 2001).

Em casos onde a apresentação é visceral pode suspeitar-se de ruptura uterina numa primeira abordagem à distócia, mas, através de palpação, verifica-se que há integridade uterina e uma continuidade das vísceras com o feto.



Figura 8 – Aspecto da distócia ao exame físico (fotografia original)



Figura 9 - *Schistosoma reflexus* após realização da cesariana (fotografia original)

2.6.1.4. Doenças metabólicas

As doenças metabólicas representaram uma componente importante de toda a casuística, onde a hipocalcemia se verificou ser a principal razão das chamadas com um total de 35 animais contabilizados (tabela 9). Também a cetose foi um achado clínico bastante frequente nas consultas realizadas, presente em 38,6% dos animais examinados.

Tabela 9 –Distribuição absoluta e relativa das doenças metabólicas

Doenças metabólicas		
	Frequência absoluta	Frequência relativa
Hipocalcemia	35	61,4%
Cetose	22	38,6%

2.6.1.5. Pele e glândulas anexas

As mastites foram uma afeção bastante comum na clínica de ambulatório. Geralmente revelam-se de carácter urgente e podem resultar em morte se o animal não for intervencionado rapidamente. Sendo as mastites ambientais o tema de desenvolvimento deste relatório serão, mais à frente, descritas pormenorizadamente.

Como é possível constatar na tabela 10, as doenças de pele diagnosticadas, ao longo do estágio foram maioritariamente de origem parasitária, nomeadamente sarnas: sarcóptica e

coriográfica; cujo diagnóstico foi estabelecido presuntivamente. Registraram-se ainda três casos de tricofitíase e um caso de alopecia idiopática dos vitelos.

Tabela 10 - Distribuição absoluta e relativa das afeções da pele e glândulas anexas

Pele e glândulas anexas		
	Frequência absoluta	Frequência relativa
Alopecia idiopática dos vitelos	1	2,9%
Sarna sarcóptica	4	11,4%
Sarna coriográfica	5	14,3%
Tricofitíase	3	8,6%
Mastites	22	62,9%

2.6.1.6. Doenças infecciosas

As doenças infecciosas desempenham um papel de extrema importância nas explorações de bovinos de leite pois são responsáveis pela existência de mortalidade e morbidade no efetivo, originando graves perdas económicas se a prevenção e o controlo não forem criteriosos.

Ao longo do estágio foram acompanhados vários casos clínicos que se revelaram muito interessantes, nomeadamente as clostridioses.

Dois surtos de clostridioses foram acompanhados em duas explorações (tabela 11), onde foram registados três animais afetados em cada uma das clostridioses, botulismo e edema maligno.

Tabela 11 – Distribuição absoluta e relativa das doenças infecciosas diagnosticadas

Doenças infecciosas		
	Frequência absoluta	Frequência relativa
Edema maligno	3	16,7%
Botulismo	3	16,7%
Paratuberculose	6	33,3%
Febre Q	2	22,2%
Neosporose	4	11,1%

As clostridioses são doenças causadas por bactérias do género *Clostridium*. Anaeróbias e ubíquias, estão presentes na flora bacteriana do trato intestinal dos ruminantes e são normalmente encontradas no solo e fezes, onde podem permanecer durante longos períodos de tempo graças à sua capacidade de formar esporos extremamente resistentes.

O botulismo é uma doença caracterizada por uma paralisia progressiva flácida em todas as espécies animais (Galey *et al*, 2000).

Clostridium botulinum é responsável pela produção de toxinas conhecidas como substâncias com um enorme poder letal em todo o mundo. Das oito neurotoxinas produzidas, são o tipo B, C e D as mais letais para os bovinos (Stilwell, 2013).

A bactéria desenvolve-se em condições ideais de anaerobiose, pH e presença de proteína em decomposição, sendo que o tipo de toxina produzido vai depender do tipo de material orgânico. Silagens mal conservadas, cadáveres em contacto com as matérias primas (figura 13) ou em fontes de água, e água estagnada com grande quantidade de matéria orgânica, são fatores de risco que podem proporcionar o crescimento bacteriano (Stilwell, 2013).

A infecção ocorre através da ingestão de alimento contaminado e, após a absorção intestinal, a toxina entra em circulação e, uma vez na junção neuromuscular e outras terminações colinérgicas, impede a libertação da acetilcolina, afetando essencialmente os músculos estriados (Stilwell, 2013).

Os sinais clínicos surgem entre um a sete dias após a ingestão e a sua severidade vai depender da dose de toxina ingerida. Anorexia, fraqueza e ataxia são os primeiros sinais demonstrados. A paralisia simétrica parcial, geralmente ascendente, leva à prostração e, numa fase mais avançada, o animal deixa de conseguir erguer a cabeça e há uma perda de tonicidade do tônus lingual (figura 12). A língua aparece assim flácida e pendente por incapacidade de o animal a retrain, constituindo um sinal típico no exame físico em animais numa fase avançada da doença, apesar de não ocorrer em todos os casos de botulismo (Lahunta & Divers, 2007). Existe ainda disfagia, timpanismo, ptose e ptialismo. A paralisia do diafragma e músculos intercostais vão ser responsáveis pela asfixia e morte (Stilwell, 2013).

O diagnóstico é feito considerando os sinais clínicos e a existência de alimentos ou água suspeitos, no entanto apenas a inoculação em ratos, de extratos do alimento suspeito ou conteúdo ruminal permite chegar a um diagnóstico definitivo (Lahunta & Divers, 2007).

O tratamento é apenas de suporte e pode revelar-se eficaz apenas em animais que ingeriram pequenas doses e manifestem um quadro clínico ligeiro (Lahunta & Divers, 2007).

A prevenção é um fator de extrema importância para evitar a recorrência de surtos de botulismo. Não fornecer alimento em mau estado de conservação, recolher os cadáveres das pastagens, eliminar os alimentos que tenham estado em contacto com cadáveres, limitar acesso de animais (cães, gatos, pombos, ratazanas) ao local de armazenamento das matérias primas, limpar frequentemente os reservatórios de água e não enterrar os cadáveres de animais com botulismo, são algumas medidas eficazes na prevenção do botulismo (Stilwell, 2013).

O surto de botulismo acompanhado resultou na morte de três vitelos (provenientes de dois lotes de idades diferentes), e ainda dois cavalos presentes na exploração. A causa do surto deveu-se a um cadáver de gato presente no rolo de fenosilagem (figura 13), tendo sido

relatado por Galey *et al* (2000) um surto de botulismo com origem na mesma causa que provocou a morte de 427 vacas.



Figura 12 - Vitelo com botulismo em fase avançada; notar a língua pendurada, a ptose e a cabeça apoiada no flanco (fotografia original)



Figura 13 - Cadáver de gato retirado do rolo de feno silagem com o qual foram alimentados os vitelos e equinos da exploração assistida (fotografia original)

2.6.1.7. Neonatologia

Na neonatologia, as pneumonias foram o principal motivo para a consulta, representando uma Fr de 66,7% de todas as chamadas (tabela 12). De seguida surgem as diarreias neonatais que representaram 28,2% da casuística nesta área e, por fim, há a referir uma caso de poliartrite séptica e meteorismo gasoso.

Tabela 12 - Distribuição absoluta e relativa dos casos registados na área da neonatologia

Neonatologia		
	Frequência absoluta	Frequência relativa
Diarreias neonatais	11	28,2%
Pneumonias	26	66,7%
Poliartrite séptica	1	2,6%
Meteorismo gasoso	1	2,6%

2.6.2. Exames complementares de diagnóstico

No decorrer do estágio foram vários os exames complementares realizados com o objetivo de estabelecer um diagnóstico definitivo (tabela 13).

A cultura bacteriológica de leite de animais consultados com suspeita de mastite revelou-se o exame complementar mais frequentemente realizado (Fr de 33,9%). A identificação do agente causador da mastite é de importância extrema para um tratamento bem sucedido, sendo que a colheita deve ser asséptica e realizada antes da administração de qualquer antibiótico. Os vários procedimentos laboratoriais para a cultura e identificação serão descritos mais à frente, enquadrados na casuística da qualidade do leite.

A recolha de sangue para serologia foi o exame escolhido sempre que à consulta se apresentavam animais com suspeita de: Paratuberculose – identificação de Ac de *Mycobacterium. paratuberculosis*; Neosporose – identificação de Ac de *Neospora caninum*; Febre Q – identificação de Ac de *Coxiella burnetti*.

Outro exame que permite a identificação de agentes patogénicos comumente presentes nas explorações de leite é a serologia de leite do tanque.

Através da análise do leite do tanque é possível a deteção de Ac de IBR, Ac de BVD, Ac *Myc. paratuberculosis* e Ac de *Neospora caninum*, revelando-se assim como uma metodologia fácil, eficaz e barata para monitorizar a exposição do efetivo a agentes infecciosos.

Tabela 13 - Distribuição absoluta e relativa dos exames complementares de diagnóstico

Exames complementares de diagnóstico		
	Frequência absoluta	Frequência relativa
Sangue p/ serologia	15	26,8%
Leite p/pesquisa de AC	11	19,6%
Cultura bacteriológica	19	33,9%
Mensuração β -hidroxibutirato	10	17,9%
Necrópsia	1	1,8%

2.6.3. Clínica cirúrgica

No decorrer do estágio foram vários os casos que necessitaram de intervenção cirúrgica (tabela14).

O aparelho digestivo foi o que registou um maior número de intervenções, sendo os DAE aqueles que registaram uma maior Fr, 44,8%. Num número significativamente mais baixo procedeu-se também à resolução de DAD e torção de ceco, com uma Fr de 7,1% e 3,6%, respetivamente. Foi ainda realizada uma laparotomia exploratória num animal com suspeita de deslocamento de abomaso intermitente.

As técnicas cirúrgicas realizadas foram essencialmente a omentopexia, piloro-omentopexia, tiflotomia e ruminotomia.

As cirurgias efetuadas ao nível do aparelho reprodutor foram todas elas realizadas na sequência de partos distócios. As cesarianas (figura 14) representaram uma Fr de 13,8% das intervenções cirúrgicas e optou-se pela sua realização sempre que o parto não se conseguiu resolver medicamente. A sutura de Bhüner (figura 15) foi realizada com o intuito de prevenir um possível prolapso uterino, uma vez que se tratava de um animal com 10 lactações cujo parto se revelou distócico e gemelar.

Foram ainda realizadas intervenções cirúrgicas com o objetivo de desobstruir o canal do teto (com uma Fr de 17,2%) que onde a presença de pólipos provoca uma estase no quarto da glândula mamária afetado e evolui rapidamente para uma situação de mamite.

Tabela 14 - Distribuição absoluta e relativa das intervenções cirúrgicas

Intervenções cirúrgicas		
	Frequência absoluta	Frequência relativa
DAE	13	44,8%
DAD	2	6,9%
Torção do ceco	1	3,4%
Laparotomia exploratória	1	3,4%
Cesariana	4	13,8%
Sutura de Bhüner	1	3,4%
Remoção de pólipos do canal do teto	5	17,2%
Laceração de teto	2	6,9%



Figura 10 – Cesariana para resolução de distócia por *Schistosoma reflexus* (fotografia original)



Figura 11 – Sutura de Bhüner (fotografia original)

2.7 Controlo da qualidade do leite

A área da qualidade do leite representou uma componente importante de toda a casuística, compreendendo 39% de todas as atividades desenvolvidas ao longo do estágio.

No período de realização do estágio foram contabilizados cerca de 2000 animais submetidos à prova de estábulo e realizaram-se 2250 análises microbiológicas de amostras provenientes de 158 explorações diferentes.

As atividades englobadas nesta área dividiram-se em três componentes: o trabalho de campo onde foram recolhidas as amostras, o trabalho laboratorial que permitiu a identificação do agente etiológico e a entrega dos resultados com a respetiva prescrição do tratamento e discussão com o produtor das medidas a tomar.

2.7.1. Provas de estábulo

As provas de estábulo foram realizadas mensalmente nas explorações inscritas no programa de controlo da qualidade do leite da CAVC, e esporadicamente a algumas explorações que solicitavam este serviço. As visitas consistiram na realização do teste californiano de mastites (TCM) a todas as vacas em ordenha, quando se tratava de efetivos de pequena dimensão, e

às vacas enumeradas na lista de animais problema do contraste leiteiro, no caso das explorações de média a grande dimensão. Neste último caso, também as vacas recém-paridas e as vacas prestes a entrar no período de secagem foram submetidas ao teste.

Sempre que uma exploração entrou pela primeira vez no programa de controlo da qualidade do leite, todas as vacas em lactação, independentemente do tamanho do efetivo, foram testadas.

Nas provas de estábulo procedeu-se ainda à observação da rotina de ordenha por parte dos ordenhadores, funcionamento e limpeza da máquina de ordenha e higiene da respetiva sala, de modo a verificar a existência de possíveis comportamentos de risco ou procedimentos incorretos e delinearem-se as medidas a constar no programa de qualidade.

2.7.2. Teste Californiano de Mastites

O TCM é o teste mais fiável e barato que permite o diagnóstico de mastites subclínicas (Radostitis *et al*, 2007).

Este teste faz uma estimativa quantitativa de ácido desoxiribonucleico (ADN) presente no leite, sendo que a concentração de ADN está diretamente relacionada com a concentração de células nucleadas presentes nessa mesma amostra. O reagente do TCM, quando misturado com o leite em partes iguais, tem uma ação detergente provocando a lise dos leucócitos e a gelificação do ADN livre cuja consistência vai ser usada para estimar a quantidade de leucócitos presentes no leite (George *et al*, 2007). O reagente possui ainda um indicador de pH (bromocresol roxo) que muda de cor quando o pH do leite está aumentado para além do seu valor normal (6.6) (Radostitis *et al*, 2007).

O teste é depois lido subjetivamente tendo em conta o grau de gelificação formado, de acordo com a tabela 15.

São consideradas positivas para mastites as amostras classificadas +1, +2 ou +3.

No âmbito das provas de estábulo foram colhidas amostras de quartos sempre que, ao TCM, estes adquiriram uma classificação de +2 ou +3. Leite com alterações visíveis de mastite clínica como coágulos, descoloração ou aspeto aquoso foi também recolhido sob a designação de MC (mastite clínica).

O TCM foi realizado já com os animais na sala de ordenha, imediatamente antes da inserção das tetinas.

Tabela 15 – Relação entre o grau e o nº de células somáticas (adaptado de Radostitis et al, 2007)

Teste Californiano de Mastites		
Grau	Reações observadas	Contagem aproximada de células somáticas (x10³)
Negativo	A mistura continua fluida sem formação de gel	0 – 200
Suspeito	Ligeira formação de gel que é mais notória quando a raquete é rodada	150 – 500
+1	Formação distinta e imediata de gel que tende a desaparecer com o tempo	400 – 1 000
+2	Formação distinta e imediata de gel; quando a raquete é rodada forma-se uma massa na periferia que expõe o fundo; à inclinação verte de forma contínua.	800 - 5000
+3	Formação distinta e imediata de gel; quando a raquete é rodada forma-se uma massa convexa que preenche o fundo; à inclinação verte de forma súbita	>5000

2.7.3. Colheita de amostras

A colheita de amostras deve ser realizada de forma a reduzir ao máximo a contaminação exterior, com o objetivo de que, na cultura bacteriológica, seja isolado apenas o agente causador da mastite.

Sempre que possível, as amostras foram colhidas de quartos individuais, exceto nos casos de vacas prestes a secar em que o leite proveniente de todos os tetos foi colhido para um único frasco estéril.

Devem ser respeitados os seguintes passos antes da recolha de uma amostra:

- Os tetos devem ser imersos numa solução desinfetante que deve atuar 30 segundos antes de serem completamente limpos com um papel de uso único ou um pano limpo;
- A ponta do teto deve ser exaustivamente limpa com algodão ou uma gaze estéril e álcool etílico a 70% , prestando especial atenção ao orifício do teto;

Os primeiros dois ou três jatos de leite devem ser rejeitados pois, segundo Radostitis *et al* (2007), estes jatos conterão bactérias e células que apenas vão refletir a contaminação do canal do teto.

A colheita deve ser realizada o mais rápido possível, com o frasco estéril posicionado quase na horizontal.

A identificação da amostra deve conter o número da vaca, o teto e o resultado do TCM ou a nota MC caso seja mastite clínica. Após a identificação a amostra deve ser imediatamente refrigerada.

2.7.4. Cultura bacteriológica

Uma vez no laboratório, 10 µL da amostra de leite recolhida foram semeadas através do método de esgotamento por estria em agar Columbia com 5% de sangue de ovelha.

Após uma incubação de 24 horas a 37° é realizada a primeira leitura das colónias que cresceram, onde são registadas as características morfológicas como a pigmentação, brilho, superfície, elevação, tamanho e forma; odor, presença de hemólise e número de colónias.

Às colónias com crescimento considerável e que apresentem já uma morfologia caracteristicamente suspeita de alguma espécie, são realizados testes com o objetivo de se proceder à identificação provisória: esfregaço seguido de coloração Gram e teste da catalase (tabela 17).

Tal como esquematizado na figura 16, após a identificação provisória e tendo em conta a classificação como Gram-negativo ou Gram-positivo, as colónias são repicadas para meios diferenciais. Leveduras típicas, *Prothoteca* e *Corynebacterium* são agentes etiológicos cuja identificação definitiva pode ser feita através da observação do esfregaço gram devido às suas características morfológicas bastante evidentes, referidas mais à frente.

Os meios diferenciais mais utilizados na rotina laboratorial foram: agar MacConkey, BEA (agar biliar esculina), RPF (agar plasma e fibrinogénio de coelho) e MSA (agar sal manitol) e as suas principais características encontram-se referidas na tabela 16.

Amostras que, às 24 horas, não apresentavam qualquer crescimento e que haviam sido classificadas como grau +3 ao TCM ou como MC foram colocadas em caldo BHI (*brain heart infusion*) e semeadas novamente em agar Columbia com 5% de sangue de ovelha depois de aproximadamente 12 horas na estufa a 37°.

A identificação final surge às 48 horas com a interpretação dos achados nos meios de cultura diferenciais.

Agentes etiológicos de mastites infecciosas que representam um grande impacto económico nas explorações e cuja identificação leva à adoção de medidas de manejo e rotina de ordenha, são submetidos a testes laboratoriais que confirmam a sua identificação. Assim, colónias identificadas como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* são submetidas ao teste da coagulase e teste de identificação do Grupo B, respetivamente (tabela 17).

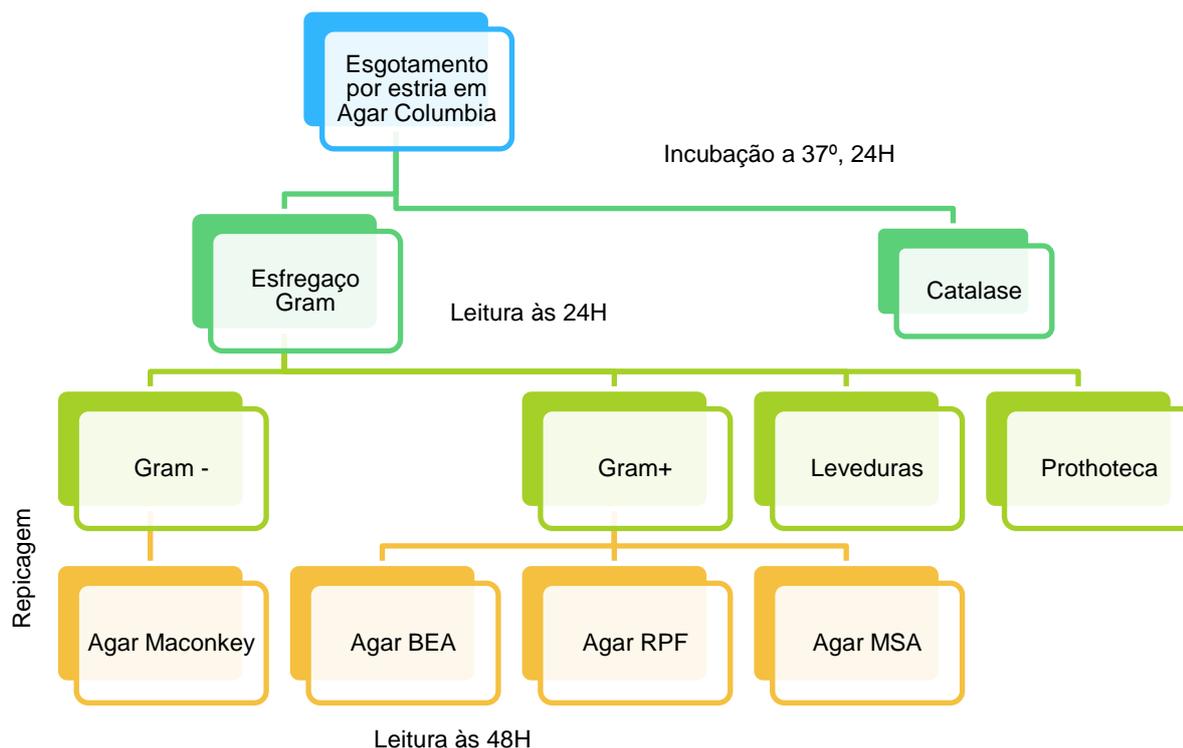


Figura 12 – Diagrama esquemático dos procedimentos efetuados na cultura microbiológica no laboratório da CAVC

Tabela 16 – Enumeração das principais características dos meios de cultura utilizados (adaptado de Quinn *et al*, 1999; Santos, 2008)

Características dos meios de cultura	
Nome	Características
agar Columbia c/ 5% de sangue de ovelha	Meio altamente nutritivo onde crescem a maioria das bactérias incluindo muitas espécies fastidiosas; a combinação de duas peptonas com extrato de levedura proporciona uma fonte de vitaminas de complexo B e o sangue de ovelha permite a detecção de reações hemolíticas e fornece o fator X (heme) necessário para o crescimento de muitas espécies patogênicas.
agar MacConkey	Meio diferencial para o crescimento de <i>Enterobacteriaceae</i> e outras batérias Gram -; o cristal violeta inibe o crescimento das bactérias Gram +; a diferenciação das bactérias coliformes é feita tendo em conta a ocorrência de fermentação da lactose do meio, originando colónias de cor rosa a vermelho.
agar BEA (agar bÍlis esculina)	Meio diferencial para o diagnóstico presuntivo de <i>Enterococcus/ grupo D Streptococcus</i> ; estas bactérias têm a capacidade de hidrolizar a esculina que vai resultar numa pigmentação preta do meio.
agar RPF (agar plasma e fibrinogénio de coelho)	Meio diferencial para o diagnóstico de <i>Staphylococcus aureus</i> ; este meio é constituído por agar Baird-Parker com plasma de coelho e fibrinogénio permitindo a detecção da atividade da coagulase, e um inibidor da tripsina que evita a fibrinólise total ou parcial dos halos opacos formados em torno das colónias de bactérias coagulase-positivo.

agar MSA (agar sal manitol)	Meio diferencial para o crescimento de <i>Staphylococci</i> em altas concentrações de sal; <i>Staphylococcus aureus</i> é identificado devido à fermentação do manitol que origina uma coloração amarela do meio.
Caldo BHI (<i>brain heart infusion</i>)	Meio nutritivo composto por infusão de cérebro e coração, peptonas e glucose. Adequado para a cultura de uma grande variedade de bactérias, leveduras e fungos.

Tabela 17 – Testes secundários para identificação de agentes isolados (adaptado de Quinn *et al*, 1999)

Testes para identificação de agentes		
Teste	Descrição	Interpretação do resultado
Catalase	Deteta a enzima catalase que converte o peróxido de hidrogénio a água e oxigénio; com uma ansa retira-se o topo de uma colónia evitando o agar sangue, o material recolhido é colocado numa lâmina de microscópio e uma gota de peróxido de hidrogénio é adicionada.	POSITIVO: formação de bolhas devido à libertação do oxigénio Permite distinguir <i>Staphylococcus</i> (+) de <i>Streptococcus</i> (-)
Coagulase	Diferenciação de <i>Staphylococcus aureus</i> de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa; 2-4 colónias são colocadas no tubo contendo a solução de plasma de coelho re-hidratada, incubação a 37° durante 4H.	POSITIVO: formação de coágulo Permite confirmar a identificação de <i>Staphylococcus aureus</i> (+)
Identificação do grupo B <i>Streptococcus</i>	Confirmação do grupo de Lancefield; 2 a 3 colónias são adicionadas a 0,4mL da enzima de extração, após incubação de 10 minutos a 37°, junta-se uma gota da suspensão de partículas de latex sensibilizadas com anticorpos anti-estreptococos grupo B com uma gota do extrato bacteriano, após dois minutos de agitação por meio de movimentos rotativos verifica-se se há aglutinação.	POSITIVO: aglutinação dos complexos Ac-Ag Permite confirmar a identificação de <i>Streptococcus agalactiae</i> (+)

2.7.5. Tratamento e medidas a tomar

Os resultados laboratoriais não só fornecem informação importante sobre o tratamento a adotar, mas permitem também delinear as estratégias mais apropriadas para a diminuição da ocorrência de mastites e incremento da qualidade do leite.

Através do conhecimento dos agentes específicos envolvidos nas IIM responsáveis pelo aumento da CCS do efetivo, podem ser tomadas medidas de manejo que, geralmente, reduzem ou previnem novas infeções.

Genericamente, essas medidas passam por manter as vacas num ambiente limpo; realizar uma terapia de secagem adequada e direcionada para o agente identificado; identificar as vacas

infetadas com agentes contagiosos e ordenhá-las em último lugar; ponderar o refugio em animais com CCS altas crónicas ou infetadas com agentes como o *Staphylococcus aureus*.

Na tabela 18 encontram-se resumidas as principais fontes de infeção, propagação e medidas a adotar no controlo de mastites segundo os agentes frequentemente mais isolados na rotina laboratorial.

O tratamento preconizado vai depender, não só do agente isolado na sequência da análise microbiológica, mas também dos resultados registados no teste de sensibilidade aos antibióticos para esse mesmo agente, de uma determinada exploração. Isto é, uma mesma espécie de um determinado agente microbiológico pode significar dois tratamentos distintos consoante a exploração onde foi isolado.

Tabela 18 - Resumo das principais fontes de infecção, propagação e medidas a adotar no controlo de mastites segundo o agente isolado (adaptado de NMC, 1999b; Laboratory for Udder Health, 2011)

Bactéria	Fonte de infecção	Propagação	Controlo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Úberes infetados de outras vacas na exploração; Mãos dos ordenhadores; Camas contaminadas com leite de vacas infetadas	Durante a ordenha: panos de limpeza do úbere; tetinas; mãos dos ordenhadores; funcionamento inadequado da máquina de ordenha	Usar panos de limpeza individuais; Pós-dipping; tratamento na secagem; refugo dos casos crónicos; ordenhar em último lugar
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	Flora da pele; Ocasionalmente ambientais	Infeção do canal através de fontes existentes na pele; má cobertura dos tetos durante o dipping	Pós-dipping; Tratamento na secagem
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Úberes infetados de outras vacas na exploração	Durante a ordenha: panos de limpeza do úbere; tetinas, etc	Usar panos de limpeza individuais; Pós-dipping; tratamento na secagem; refugo dos casos crónicos;
<i>Streptococcus uberis</i>	Ambiente: período inicial da secagem	Novas IIM durante o período inicial da secagem; ordenha de animais molhados; má preparação das vacas antes da ordenha; entradas de ar na máquina de ordenha (liner slips)	Melhorar a saneamento dos parques; ordenhar animais limpos e secos; evitar ocorrência de liner slips; Pré e pós-dipping; tratamento na secagem; uso de selante
Coliformes	<i>Escherichia coli</i> : cama, estrume e solo; <i>Klebsiella spp.</i> : material de cama orgânico <i>Enterobacter spp.</i> : cama, estrume e solo; <i>Serratia spp.</i> : solo e plantas	Contacto ambiental: animais sujos e molhados, camas contaminadas, tempo húmido e quente	Melhorar o saneamento dos parques; ordenhar animais limpos e secos; evitar ocorrência de liner slips; manter as camas limpas e mudar o material com regularidade; manter as vacas de pé após ordenha
<i>Corynebacterium bovis</i>	Úberes infetados de outras vacas na exploração	Durante a ordenha: tetinas, etc	Pós-dipping; tratamento na secagem
Leveduras típicas	Ambiente: solo, plantas, água	Exposição a ambientes húmidos: lavagens frequentes do úbere, camas húmidas, etc;	Ordenhar animais limpos e secos;
<i>Prototheca</i>	Ambiente: solo, plantas, água	Exposição a ambientes húmidos: lavagens frequentes do úbere, camas húmidas, etc; úberes infetados	Ordenhar animais limpos e secos; Refugo de animais infetados

Para além das medidas que visam um agente específico, existem princípios gerais do controlo de mastites que devem ser aplicados em todas as explorações de leite.

Em 2001, o National Mastitis Council estabeleceu 10 pontos fundamentais que um programa de qualidade do leite deve ter. O implemento das práticas a seguir referidas a todos os

procedimentos de rotina vai, não só prevenir novas IIM, como também controlar agentes ambientais e agentes contagiosos. O carácter geral destes pontos é enunciado em seguida, assim como as principais medidas propostas:

1. Estabelecimento de objetivos para a saúde do úbere:
 1. Estabelecer metas realistas para a média da CCS e taxas de mastites clínicas;
 2. Revisão dos objetivos com todos os membros integrantes da equipa de trabalho (produtor, pessoal da ordenha, responsáveis pela limpeza e manejo e médicos-veterinários);
 3. Estabelecer uma prioridade nas mudanças a implementar para alcançar os objetivos propostos.
2. Manutenção de um ambiente limpo, seco e confortável:
 1. Garantir o uso adequado das instalações através de um adequado tamanho e design dos parques;
 2. Manter os parques limpos, secos e confortáveis através de um manejo adequado das camas;
 3. Manter os vários lotes de animais, áreas de alojamento e corredores limpos e secos;
 4. Assegurar o correto funcionamento do sistema de ventilação;
 5. Garantir uma densidade populacional adequada nos vários parques;
 6. Controlo das influências prejudiciais do ambiente (stress térmico, insetos, precipitação, entre outros);
 7. Certificar que as vacas permanecem de pé após a ordenha (fornecer alimento fresco e água).
3. Procedimentos de ordenha adequados:
 1. Examinar os primeiros jatos de leite para facilitar a deteção precoce de mastites clínicas e estimular a descida do leite;
 2. Aplicar o *pré-dipping* (desinfetante dos tetos) de modo a cobrir toda a superfície do teto e atuar durante pelo menos 30 segundos;
 3. Secar os tetos usando um pano devidamente lavado e desinfetado em apenas uma vaca, ou um pano de papel de uso único;
 4. Usar luvas limpas durante o processo de ordenha para limitar a disseminação de agentes contagiosos;
 5. Anexar as tetinas corretamente (formando um quadrado com o úbere) dentro de 90 segundos após início da preparação do úbere;
 6. Ajustar o tubo do leite durante a ordenha para evitar a entradas de ar (*liner slips*);
 7. Em máquinas com ordenha manual evitar a sobreordenha, e desligar o vácuo antes de remover as tetinas;

8. Aplicar o pós-*dipping* imediatamente após a remoção das tetinas e de modo a que toda a superfície do teto seja coberta;
 9. Os desinfetantes pré e pós ordenha devem ser selecionados baseados na sua eficácia;
 10. Ordenha as vacas com IIM confirmadas por agentes contagiosos por último.
4. Revisão da máquina e equipamento de ordenha:
 1. Manutenção regular de todo o equipamento de acordo com as instruções do fabricante;
 2. Substituir tetinas e tubos do leite partidos ou rachados imediatamente após a sua deteção.
 5. Adotar um bom sistema de registos:
 1. Para cada caso de mastite clínica registar a identificação da vaca, número e tipo de tratamentos, dias em leite (DEL), quarto afetado, resultado dos tratamentos e agente identificado na análise microbiológica;
 2. Usar um sistema de registo, computadorizado ou manual, da informação individual de cada vaca relativa à CCS, na prevalência e incidência das mastites subclínicas.
 6. Maneio adequado dos casos de mastites clínicas durante a lactação:
 1. Desenvolvimento e implementação de um protocolo de tratamento das mastites clínicas com o Médico Veterinário;
 2. Colher uma amostra assética antes do tratamento para cultura microbiológica e testes de suscetibilidade antimicrobiana, se necessário;
 3. Antes da aplicação de soluções antimicrobianas intramamárias, desinfetar o teto com uma toalhete germicida e a ponta do teto com uma gaze ou algodão embebido em álcool;
 4. Aplicar a bisnaga de tratamento de acordo com as instruções do fabricante e de dose única;
 5. Não tratar infeções crónicas não responsivas;
 6. Respeitar os intervalos de segurança referidos pelo fabricante;
 7. Identificar eficazmente todas as vacas tratadas e registar todos os tratamentos permanentemente.
 7. Tratamento de secagem adequado e eficaz:
 1. Secar as vacas repentinamente e aplicar o tratamento logo após a última ordenha da lactação;
 2. Tratar todos os quartos com uma formulação antimicrobiana aprovada comercialmente para o efeito, de preferência de longa ação e/ou um selante interno de tetos;
 3. Desinfetar o teto e a ponta do teto com algodão embebido em álcool antes da infusão e, após esta, utilizar um desinfetante pós-ordenha (pós-*dipping*);

4. Manutenção de um ambiente limpo, seco e confortável durante o período seco de modo a minimizar a exposição aos agentes;
 5. Em efetivos com elevada incidência de mastites por coliformes considerar vacinar de acordo com as instruções do fabricante.
8. Adoção de medidas de biossegurança para agentes contagiosos e identificação dos animais infetados cronicamente:
1. Requisição dos dados relativos à CCS individual e do tanque;
 2. Se possível, obter amostras colhidas assepticamente para cultura microbiológica, de animais antes da sua compra;
 3. Segregar vacas com CCS persistentemente altas e observar resposta ao tratamento na secagem ou outras terapias recomendadas;
 4. Identificar ou segregar animais persistentemente infetados com *Staphylococcus aureus* ou outros agentes não responsivos (*Mycoplasma*, *Nocardia*, *Pseudomonas* ou *Trueperella pyogenes*);
 5. Considerar o estado de saúde do úbere de novilhas devido ao impacto que pode advir na biossegurança do efetivo.
9. Monitorização regular da saúde do úbere:
1. Aderir a um programa de monitorização individual da CCS;
 2. Realizar análises microbiológicas de casos clínicos e CCS elevada, regularmente;
 3. Usar os registos referentes à CCS e mastites clínicas para avaliar protocolos de tratamento e decidir sobre os tratamentos e fármacos a adquirir.
10. Revisão do programa de qualidade do leite:
1. Obtenção de avaliações objetivas do Médico Veterinário e entidade que procede à compra do leite;
 2. Abordagem passo-a-passo à revisão e uso de um formulário de avaliação;
 3. Fazer uso de toda a equipa de trabalho (produtor, pessoal da ordenha, responsáveis pela limpeza e manejo e médicos-veterinários).

3. Revisão bibliográfica

3.1. Introdução

Até recentemente, as mastites eram principalmente uma preocupação entre os produtores e a indústria leiteira. Atualmente, devido às crescentes preocupações sobre os resíduos antimicrobianos, resistência antimicrobiana, qualidade do leite e bem-estar animal, as mastites tornaram-se alvo do interesse dos consumidores e sociedade.

É, hoje em dia, imprescindível para a indústria leiteira garantir uma imagem associada ao leite como sendo um produto de alta qualidade, saudável e nutritivo, e produzido por animais saudáveis.

As mastites representam o maior desafio da indústria leiteira em todo o mundo, apesar da contínua pesquisa e implementação de estratégias para o seu controlo (Bradley, 2002).

Apesar das pesadas implicações financeiras das mastites, a importância da ocorrência desta afeição na saúde pública não deve ser desvalorizada. O uso intensivo de antibióticos no tratamento e controlo das mastites tem possíveis implicações na saúde humana através de um aumento do risco de entrada de bactérias com estirpes resistentes aos antibióticos, na cadeia alimentar (White & McDermott, 2001).

Nos últimos 40 anos observou-se uma diminuição dramática da incidência das mastites clínicas, mas tal ocorrência foi acompanhada por uma mudança na importância relativa e absoluta de diferentes agentes etiológicos (Bradley, 2002).

A implementação do plano de controlo dos cinco pontos que se centrava essencialmente em reduzir a exposição, duração e transmissão de infeções intramamárias, reduziu a incidência de mastites bovinas por agentes que mostravam uma via contagiosa de transmissão, mas teve pouco efeito na incidência de mastites por bactérias que infetavam a glândula mamária através de um reservatório ambiental (Leigh, 1999).

Esta mudança na etiologia ao longo das últimas décadas está bem patente nos resultados de um estudo que mostram a diminuição da incidência das mastites contagiosas entre 1968, 1995 e 2007, e o aumento proporcional da importância das infeções por agentes ambientais, nomeadamente *Escherichia coli* e *Streptococcus uberis* (tabela 19).

Os agentes denominados de agentes ambientais, nomeadamente *Escherichia coli* e *Streptococcus uberis*, são agora duas das causas mais comuns de mastites bovinas e um problema crescente em explorações de baixa contagem de células somáticas (Bradley, 2002).

A mudança na etiologia das mastites bovinas durante as últimas décadas pode residir na capacidade adaptativa destes agentes à glândula mamária ou na desvalorização dos seus mecanismos de patogénese (Bradley, 2002).

A seguinte revisão pretende abordar a temática das mastites bovinas com especial atenção para os agentes ambientais.

Tabela 19 – Relação entre as mastites contagiosas e as mastites ambientais (adaptado de Blowey & Edmonson, 2010)

Casos de mastites clínicas (%)			
Tipo	1968	1995	2007
Coliformes	5,4	26	19,8
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	37,5	15,4	3,3
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	20,1	10,8	1,5
<i>Streptococcus uberis</i>	17,7	32	23,5
Outros	16,3	15,8	0
Cultura negativa	0	0	26,5

3.2. Mastites

3.2.1. Definição

Mastite (do gr. *mastós*, «seio» + *ite*) define-se como uma inflamação do parênquima da glândula mamária independentemente da causa (Radostitis *et al*, 2007). A reação inflamatória, geralmente como consequência de uma infeção microbiana (Watts, 1988), vai resultar numa série de mudanças físicas e químicas do leite e alterações patológicas no tecido glandular (Radostitis *et al*, 2004).

3.2.2. Anatomia e fisiologia da glândula mamária

Independentemente do arranjo ou número específico de glândulas mamárias de um determinado mamífero, a síntese e secreção de leite requer uma glândula mamária desenvolvida e funcionalmente madura (Nickerson & Akers, 2002).

O úbere dos bovinos de leite é constituído por quatro glândulas mamárias, sendo cada uma delas constituída por uma cisterna do teto, cisterna da glândula, ductos galactóforos, alvéolos compostos por células secretoras epiteliais e tecidos de suporte (Nickerson & Akers, 2002) (figura 17).

As células epiteliais revestem interiormente os alvéolos e são responsáveis por sintetizar e secretar o leite que é armazenado nos ductos e alvéolos. Por sua vez, as células mioepiteliais revestem exteriormente os alvéolos e ductos e, quando expostas à hormona ocitocina, contraem-se forçando a saída do leite para a cisterna da glândula (Davidson & Starberfeldt, 2007).

Uma das importantes adaptações anatómicas do úbere é o seu sistema de ligamentos suspensores que lhes permite suportar produções que podem chegar aos 25kg por ordenha e, juntamente com o tecido mamário, alcançar os 70kg (Nickerson & Akers, 2002).

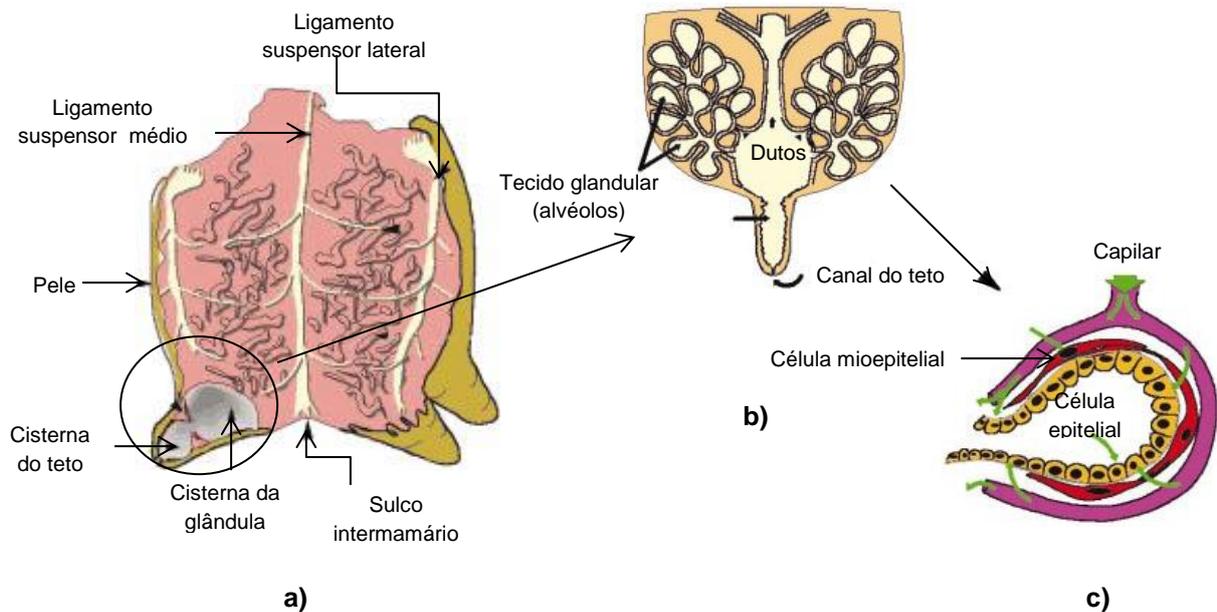


Figura 13 – a) Diagrama de secção longitudinal ilustrativo da estrutura anatómica do úbere e aparelho suspensor; b) Diagrama ilustrativo de quarto mamário; c) Diagrama ilustrativo de um alvéolo (adaptado de Nickerson & Akers, 2002)

3.2.3. Mecanismos de defesa

A glândula mamária detém uma variedade de mecanismos de defesa que podem ser separados em duas categorias distintas: imunidade inata e imunidade específica (Sordillo & Streicher, 2002).

A imunidade inata ou imunidade não específica, constitui a defesa predominante durante os estádios iniciais da infeção e a sua resposta está presente ou é ativada rapidamente no local da infeção por numerosos estímulos, contudo não é aumentada pela exposição repetida ao mesmo insulto. Se os mecanismos de defesa funcionarem adequadamente a maioria dos agentes patogénicos é eliminada rapidamente num curto período de tempo, antes de ocorrer uma ativação da resposta imune específica (Sordillo & Streicher, 2002).

As defesas inatas da glândula mamária podem ser classificadas em: defesas anatómicas mediadas pela barreira física do canal do teto; defesas celular; e determinadas defesas solúveis.

A imunidade adquirida ou imunidade específica tem a capacidade de reconhecer um determinado agente patogénico (Sordillo, 2009) levando a uma eliminação selectiva dos agentes causadores de mastites (Sordillo & Streicher, 2002). O reconhecimento de fatores patogénicos é mediado por várias populações linfóides, macrófagos e anticorpos.

3.2.4. Defesas anatómicas

O canal do teto é a primeira linha de defesa contra as mastites, uma vez que se encontra na rota dos agentes invasores da glândula mamária (Rainard & Riollet, 2006).

O esfíncter, contituído por fibras circulares de músculo liso, mantém a abertura do canal do teto encerrada após a ordenha, e a descamação contínua do epitélio estratificado do canal resultará na formação de queratina promovendo o seu isolamento entre as ordenhas (Nickerson & Akers, 2002) (figura 18). A ordenha constitui uma operação crítica comprometendo a integridade da barreira física, uma vez que o fluxo de leite remove o rolhão de queratina e o canal do teto é distendido devido ao vácuo (Rainard & Riollet, 2006).

O aumento da permeabilidade do esfíncter está diretamente relacionado com o aumento da incidência de mastites (Sordillo & Streicher, 2002) e, segundo Schultze & Bright (1983) após a ordenha são necessárias duas horas para que o esfíncter contraia e encerre o canal do teto.

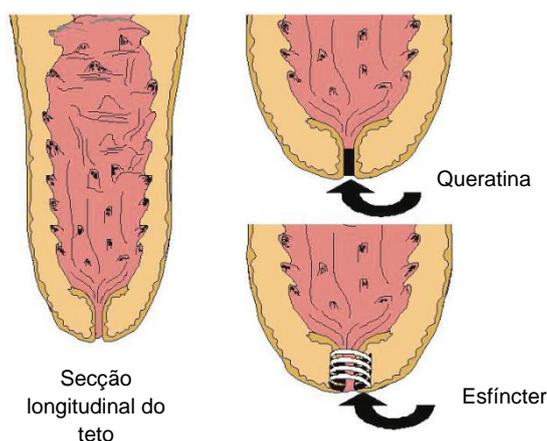


Figura 14 – Diagrama ilustrativo da estrutura do canal do teto: rolhão de queratina e músculo esfíncter (adaptado de Nickerson & Akers, 2002)

3.2.5. Defesas celulares

O número total e a actividade das populações de leucócitos da glândula mamária representam um papel vital na determinação da severidade e duração da IIM (Sordillo & Streicher, 2002).

Os neutrófilos, macrófagos e células *natural killer* representam as principais defesas celulares inatas e sua função biológica encontra-se resumidamente descrita na tabela 20 .

Os neutrófilos, apesar de se encontrarem em número relativamente baixos na glândula mamária saudável ($<10^5$ /mL), numa situação de mastite constituem mais de 90% de toda a população de leucócitos ($>10^6$ /mL) (Sordillo & Streicher, 2002).

Os macrófagos representam o tipo de célula dominante no leite e tecidos da glândula mamária saudável e, apesar do seu número tender a ser baixo durante a inflamação (Sordillo &

Streicher, 2002), estão implicados na deteção dos agentes invasores e consequente activação da resposta inflamatória (Rainard & Riollot, 2006). A capacidade funcional dos macrófagos da glândula mamária sofre um decréscimo acentuado no periparto estando esta alteração diretamente relacionada com o aumento da incidência de mastites nessa fase (Sordillo & Streicher, 2002).

Os linfócitos T CD4+, os linfócitos T CD8+, os linfócitos B, células plasmáticas e macrófagos representam as principais defesas celulares específicas e sua função biológica encontra-se resumidamente descrita na tabela 20.

Tabela 20 – Resumo das funções biológicas das defesas celulares inatas e adquiridas da glândula mamária (adaptada de Sordillo & Streicher, 2002)

Defesas celulares inatas	
Neutrófilos	Fagocitose e destruição intracelular das bactérias; Secreção de fatores antibacterianos
Macrófagos	Fagocitose e destruição intracelular das bactérias; apresentação de antígenos em conjunto com o CMH (complexo maior de histocompatibilidade)
Células NK	Linfócitos não-imunes que secretam proteínas antibacterianas após ativação
Defesas celulares adquiridas	
Linfócitos T CD4+ (helper)	Produção de citocinas imunoreguladoras após reconhecimento de moléculas de CMH classe II; células de memória após reconhecimento do antígeno
Linfócitos T CD8+ (T citotóxicos)	Lise de células hospedeiras quando danificadas ou alteradas com moléculas do CMH classe I; produção de citocinas imunoreguladoras
Linfócitos B Células B	Exposição de Ac ligado à membrana para apresentação do Ag; células de memória após interação com Ag
Linfócitos B Células plasmáticas	Síntese e secreção de Ac específicos para um determinado Ag

3.2.6. Fatores solúveis

Ambos os fatores, inatos e específicos, representam uma importante linha de defesa na glândula mamária capazes de originar respostas efetivas face a agentes patogénicos invasores (Sordillo & Streicher, 2002).

A resposta primária imunitária específica ocorre através dos anticorpos produzidos pelos linfócitos B ativados (Sordillo & Streicher, 2002). As quatro classes de imunoglobulinas (IGs) influentes nos mecanismos de defesa da glândula mamária encontram-se referidas na tabela 21.

Geralmente, as IGs atingem uma concentração máxima nas secreções mamárias durante a gênese do colostro e durante a inflamação (Sordillo & Streicher, 2002).

A glândula mamária, para além dos fatores específicos referidos, possui fatores solúveis inatos que podem atuar em conjunto com as IGs ou independentemente destas (Sordillo & Streicher, 2002). A lactoferrina, a lisozima, o sistema complemento e as citocinas são os principais fatores responsáveis pela defesa inata e as suas funções encontram-se descritas na tabela 20.

A lactoferrina, uma proteína ligante ao ferro, é produzida pelas células epiteliais e leucócitos e atua estabelecendo ligações com os íons de ferro livres no leite. Nos ruminantes, a lactoferrina e a IgG1 actuam sinergicamente para inibir agentes como a *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, mas outras bactérias como *Streptococcus agalactiae* podem utilizar a lactoferrina como fonte de ferro (Sordillo & Streicher, 2002).

O complemento é um conjunto de proteínas sintetizadas essencialmente pelos hepatócitos que pode relacionar-se quer com a imunidade específica, quer com a imunidade adquirida. Mastites por coliformes como *Escherichia coli* são especialmente sensíveis à lise mediada pelo complemento (Sordillo & Streicher, 2002).

A lisozima é uma proteína bactericida presente no leite cuja função consiste na clivagem dos peptidoglicanos da parede de bactérias gram-positivo, assim como de outras membranas presentes nas gram-negativo (Sordillo & Streicher, 2002).

As capacidades imunomodadoras das citocinas representam um papel importante na função dos leucócitos da glândula mamária. As interleucinas, fatores estimuladores de colónia, os interferões e o fator de necrose tumoral alfa (FNT α) são os principais grupos de citocinas a atuar no decorrer do processo infeccioso (Sordillo & Streicher, 2002).

Tabela 21 - Resumo das funções biológicas dos fatores solúveis da glândula mamária (adaptado de Sordillo & Streicher, 2002)

Fatores solúveis	
Lactoferrina	Sequestro do ferro impedindo o seu uso pelas bactérias; alteração da parede celular bacteriana; regula a atividade dos leucócitos da glândula mamária
Lisozima	Clivagem das ligações carbono e alteração da parede celular bacteriana
Complemento	Lise bacteriana e/ou promoção da fagocitose
Citoquinas	Factores pró-inflamatórios e imunoreguladores
Imunoglobulinas	<p>IgG1 – seletivamente transportadas para as secreções mamárias; opsonização da bactéria para reforçar a fagocitose</p> <p>IgG2 – transportadas para a secreção mamária durante a diapedese dos neutrófilos; opsonização da bactéria para reforçar a fagocitose;</p> <p>IgA – associadas com a porção lipídica do leite; não se ligam ao complemento ou opsonizam partículas; podem causar aglutinação, previnem a colonização bacteriana e neutralizam toxinas;</p> <p>IgM – eficientes na fixação do complemento, opsonização, aglutinação e neutralização da toxina; apenas opsonizam para os neutrófilos na presença de complemento</p>

3.3. Patogénese

A infeção da glândula mamária ocorre via canal do teto e o desenvolvimento da mastite decorrerá de um complexo conjunto de processos que podem, genericamente, ser classificados em três fases (Radostitis *et al*, 2007):

- a) a invasão, que é a fase em que o agente patogénico penetra no canal do teto;
- b) a infeção, que consiste na rápida multiplicação e invasão do tecido mamário a partir do canal do teto;
- c) a inflamação, que segue a infeção e representa a fase em que ocorrem as mastites clínicas com as várias alterações clínicas do úbere, efeitos sistémicos variáveis e alterações discretas a grosseiras do leite;

3.3.1. Resposta inflamatória

Os sinais clássicos da inflamação desencadeados, como o aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, edema, aumento do fluxo sanguíneo, marginação e migração dos neutrófilos, actividade de síntese mamária diminuída, dor e febre, vão resultar numa série de alterações da glândula mamária (Harmon, 2001).

As alterações do úbere incluem um edema marcado, calor, rubor, ocorrência de gangrena em casos hiperagudos e formação de abscessos em casos crônicos (Radostitis *et al*, 2007).

Uma diminuição na produção de leite, a presença de produtos de inflamação e mudanças marcadas na sua composição são alterações perceptíveis do leite no decorrer da mastite (Radostitis *et al*, 2007).

O aumento da CCS é a principal alteração subclínica no leite e representa o principal parâmetro de mensuração da qualidade do leite e saúde do úbere (Radostitis *et al*, 2007).

As células somáticas são essencialmente constituídas por neutrófilos, macrófagos e linfócitos e são representativas do processo inflamatório que decorre na glândula mamária (Harmon, 2001).

Durante a infecção e inflamação, os neutrófilos sofrem uma marginalização e passam dos vasos sanguíneos para os alvéolos, ductos e cisterna do teto (figura 19).

A efectividade da chamada de neutrófilos pode ser o fator chave para a resolução da infecção e severidade da afeção (Burvenich *et al*, 2003).

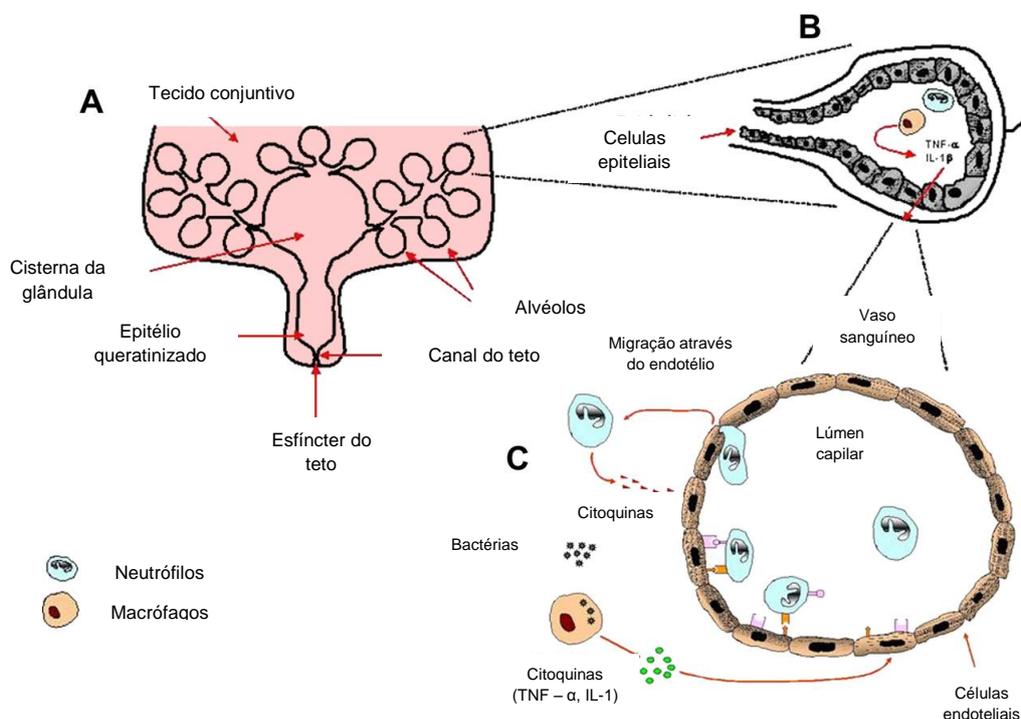


Figura 15 - Diagrama ilustrativo da resposta inflamatória da glândula mamária: A) o esfíncter do teto e o epitélio queratinizado fazem parte da primeira linha de defesa; B) papel dos fatores celulares e solúveis na resposta inata: macrófagos localizados nos alvéolos fagocitam as bactérias que entram na cisterna da glândula mamária, depois de ativados liberam citocinas como TNF α e IL-1; C) células endoteliais dos vasos sanguíneos adjacentes aos alvéolos expressam moléculas de adesão como resposta às citocinas pró-inflamatórias, iniciando o recrutamento dos neutrófilos em circulação para o sítio da infecção (adaptado de Oviedo-Boyso *et al*, 2006)

A CCS de uma glândula mamária lactante e saudável é inferior a 100 000 células/mL de leite. Durante uma IIM, a CCS pode aumentar para mais de 1 000 000 células/mL de leite em apenas algumas horas devido ao efeito combinado do aumento do número de neutrófilos e diminuição do volume de secreção (Radostitis *et al*, 2007). O limiar de 200 000 células/mL é o mais comumente usado quando se refere que o CCS indica uma situação de mastite (Dohoo, 2001).

Apesar de a IIM ser o principal fator responsável pelo aumento da CCS, existem outros fatores que, apesar de terem pouco impacto, devem ser referidos. Assim, as células somáticas podem ser influenciadas pela idade, número de lactação, stress, época do ano, tempo entre ordenhas, raça e conformação do úbere (Harmon, 1994; Jørstad *et al*, 1989).

3.4. Tipo de mastites

As mastites podem ser classificadas em mastites clínicas e mastites subclínicas.

As mastites classificam-se como clínicas quando existem sinais visíveis do decorrer do processo de inflamação como edema do úbere, rubor, dor no úbere e alterações macroscópicas no leite como descoloração e presença de coágulos.

As mastites subclínicas referem-se a uma inflamação da glândula mamária sem manifestação de sinais exteriores ou alterações macroscópicas do leite, mas com um aumento na CCS, detetado com recurso a métodos indiretos como o TCM, medição da concentração de eletrólitos ou medição da condutividade elétrica (Blowey & Edmonson, 2010).

Segundo Radostitis *et al* (2007), as mastites podem ainda ser classificadas segundo a severidade em: mastites hiperagudas quando existe inflamação severa de início repentino, reação sistémica marcada e risco de morte; mastites agudas quando a inflamação é severa e tem um início repentino mas sem reação sistémica; mastites subagudas quando existe uma inflamação moderada com alterações persistentes do leite.

3.5. Fatores predisponentes

Sendo as mastites uma doença multifatorial, vão resultar da interação de vários fatores de risco presentes no próprio animal, do ambiente, da rotina de ordenha e dos agentes patogénicos.

3.5.1. Fatores de risco do animal

- a) Idade e número de lactações:** a prevalência de quartos infetados aumenta com a idade, sendo aos sete anos que existe um maior risco de infeção (Radostitis *et al*, 2007); as novilhas podem apresentar mastite no momento do parto e, em alguns

casos, sinais de infecção já estão presentes durante a gestação. Estes casos são descritos em situações de ambientes muito contaminados, sucção por parte de outros animais e presença de moscas (De Vlieghe *et al*, 2012);

- b) Altura da lactação:** muitas das novas infecções ocorrem no período logo após a secagem e nos primeiros 60 dias de lactação, especialmente infecções por agentes ambientais (Radostitis *et al*, 2007);
- c) CCS:** a taxa média de incidência de mastites clínicas devido a agentes ambientais é maior em efetivos com CCS do tanque baixas (<150 000 células/mL) e com baixa prevalência de infecções subclínicas (Radostitis *et al*, 2007; Barkema *et al*, 1999)
- d) Ordenha e características morfológicas do úbere e teto:** maior número de ordenhas e um diâmetro elevado do canal do teto têm sido associados a um aumento da CCS e risco de IIM; a perda de leite entre ordenhas e úberes com uma sustentação deficitária cujos tetos se encontrem perto do chão podem aumentar o risco de infecção;
- e) Condições físicas do teto:** como já foi referido anteriormente, o canal do teto constitui a primeira barreira contra os agentes invasores e assim, lesões que afectem os seus tecidos ou alterações da sua morfologia como acontece durante a ordenha, constituem factores de risco; hiperqueratose do orifício do teto pode também favorecer o aparecimento de IIM;
- f) Higiene do úbere:** úberes conspurcados são associados a um aumento da CCS e aumento da prevalência de IIM;
- g) Estado nutricional:** deficiências nutricionais podem conferir uma menor capacidade de resposta a IIM, aumentando a incidência de mastites clínicas. Provou-se que a suplementação dietética de vitamina E, vitamina A e selénio confere uma maior protecção (Radostitis *et al*, 2007);
- h) Resistência genética:** são vários os factores morfológicos, fisiológicos e imunológicos que afetam a resistência ou suscetibilidade de um determinado animal (Radostitis *et al*, 2007); a seleção para uma vida produtiva longa e uma boa conformação do úbere podem reduzir a incidência de mastites clínicas e o número de episódios clínicos por lactação (Nash *et al*, 2000).

3.5.2. Factores de risco ambiental

- a) Maneio e condições de estabulação:** uma vez que os bovinos de leite passam 40-65% do seu tempo deitados, a qualidade das instalações e maneio vão desempenhar um papel fundamental na influência de determinados agentes patogénicos responsáveis pelas mastites, assim como na intensidade da pressão de infecção (Radostitis *et al*, 2007); a limpeza frequente das camas e escolha de um material de base que limite o crescimento bacteriano são fundamentais para a diminuição da prevalência de IIM por

agentes ambientais. Especial atenção deve ser dada aos parques utilizados como maternidade (figura 20); outro factor muito importante é a adequada dimensão e planificação de determinadas estruturas do parque como cubículos, corredores e acessos à zona de alimentação ou bebedouros. Dimensões incorretas dos cubículos vão resultar no aparecimento de animais deitados em sítios de elevada conspurcação como é o caso dos corredores (figura 21), constituindo um fator de risco para o aparecimento de novas IIM; Krawczel & Grant (2009) referem ainda que a sobrepopulação dos parques pode também contribuir para o aumento da incidência de mastites clínicas;



Figura 16 - Parque de maternidade com elevada conspurcação fecal (fotografia gentilmente cedida pela Dra Ema Roque)



Figura 17 – Animal deitado no corredor onde é possível visualizar o nível de conspurcação fecal. Esta situação é especialmente problemática se ocorrer logo após a ordenha (fotografia original).

- b) Época do ano: influencia essencialmente a ocorrência de mastites por coliformes (Radostitis *et al*, 2007); as chamadas “mastites de verão” ocorrem sobretudo em animais estabulados em zonas geográficas muito quentes, no entanto, também no inverno se verifica um aumento da incidência deste tipo de mastites em alturas de maior precipitação;

3.5.3. Fatores de risco associados à rotina de ordenha

A não implementação de procedimentos adequados no controlo de mastites na rotina de ordenha constitui um importante fator de risco.

A manipulação dos animais sem luvas pode representar um aumento na incidência das IIM. Neave *et al* (1966) citado por Blowey & Edmonson (2010), mostrou que metade das mãos de todos os ordenhadores desse estudo se encontravam contaminadas com organismos causadores de mastites antes sequer de a ordenha começar. As fissuras da pele das mãos dos

ordenhadores podem albergar bactérias e constituir uma fonte de infecção por *Staph. aureus* e *Strep. agalactiae* (Blowey & Edmonson, 2010).

O desenvolvimento de mastites pode também estar relacionado com o funcionamento do equipamento da ordenha.

Jones (2009) refere que as máquinas de ordenha podem afetar a saúde do úbere através de danos ou alterações na primeira linha de defesa: pele do teto, canal do teto e mucosa. O rolhão de queratina do canal do teto pode ser removido em situações de sobreordenha, níveis de vácuo elevados e existência de liner slips originando um aumento da taxa de IIM, sobretudo em animais de alta produção.

De acordo com o National Mastitis Council (1996), a ordenha mecanizada pode estar envolvida no desenvolvimento de mastites de quatro maneiras:

- a) Facilitar a transmissão de bactérias patogénicas entre vacas ou quartos durante a ordenha: infeções cruzadas podem significar 40% das novas infeções; uma preparação inadequada do úbere como o uso de panos comuns, ordenhar tetos molhados ou flutuações no vácuo que vão originar movimentações de leite entre tetinas, aumentam a contaminação e transmissão de bactérias;
- b) Ajudar a multiplicação de bactérias no canal do teto: o maior fator que influencia novas IIM é a exposição do orifício e canal do teto a organismos patogénicos; a eversão do orifício do teto ou hiperqueratose onde o canal do teto parece encontrar-se exteriorizado são muitas vezes associados à manipulação imprópria do equipamento de ordenha;
- c) Aumentar a penetração bacteriana no canal do teto: a redução abrupta no vácuo pode causar um movimento retrógado de ar através da ponta do teto com conseqüente projeção de gotas de leite do exterior até à cisterna do teto. *Liner slips* é um evento importante das flutuações de vácuo capaz de aumentar a taxa de infeção (figura 22);
- d) Modificar o teto ou o ambiente intramamário de forma a aumentar a infeção bacteriana ou diminuir as defesas mamárias: o equipamento de ordenha pode causar trauma no teto tornando-o mais susceptível à colonização e infeção.

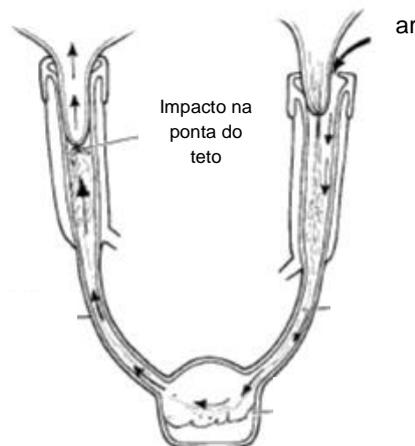


Figura 18 – Fenômeno de *liner slips*: o impacto na ponta do teto é causado pela entrada do ar entre o teto e a tetina, resultando num desequilíbrio da pressão no coletor de leite (adaptado de Blowey, 1999)

3.5.4. Fatores de risco dos agentes patogênicos

- a) **Viabilidade:** a capacidade de um determinado agente sobreviver no ambiente que se relaciona diretamente com os bovinos, resistindo a procedimentos de limpeza e desinfecção, é uma característica de cada agente. Agentes causadores de mastites infecciosas são mais suscetíveis à desinfecção que agentes envolvidos em mastites ambientais (Radostitis *et al*, 2007);
- b) **Fatores de virulência:** existe uma grande variedade de fatores de virulência entre os agentes patogênicos, cuja influência vai ser determinada pela altura da lactação e severidade da IIM e os efeitos nos tecidos da glândula mamária (Radostitis *et al*, 2007);

3.6. Etiologia

Uma grande variedade de microorganismos têm sido implicados na etiologia das mastites bovinas, tendo sido identificadas 137 espécies, subespécies e estirpes na glândula mamária (Watts, 1988).

Os agentes associados às mastites bovinas são, geralmente, divididos em agentes contagiosos e agentes ambientais, encontrando-se referidos na tabela 22 os principais agentes etiológicos.

Tabela 22 – Principais agentes etiológicos das mastites bovinas [adaptado de Blowey & Edmonson (2010) & Radostitis et al (2007)]

Agentes contagiosos	Agentes ambientais
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>E. coli</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Staphylococcus coagulase negativo*</i>	<i>Klebsiella spp.</i>
<i>Streptococcus dysgalactiae*</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Corynebacterium bovis*</i>	<i>Serratia spp.</i>
<i>Mycoplasma spp.</i>	<i>Streptococcus uberis</i>
	<i>Trueperella pyogenes</i>
	Leveduras, fungos e algas

*a classificação destes agentes como contagiosos não é consensual entre autores

3.6.1. Agentes contagiosos

Os agentes contagiosos têm como principais fontes de infecção a glândula mamária e/ou a pele do teto e a sua transmissão ocorre durante a ordenha, quer através do equipamento de ordenha, quer através das mãos do ordenhador. Efetivos com elevada prevalência de agentes contagiosos têm, tipicamente, uma CCS alta e uma baixa incidência de mastites clínicas (Blowey & Edmonson, 2010).

De seguida será apresentada uma breve descrição dos agentes contagiosos mais frequentes na etiologia das mastites bovinas.

3.6.1.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus são organismos cocos gram-positivos, hemolíticos, catalase positivos e coagulase positivos.

Esta bactéria é altamente contagiosa, e estima-se que infecções por *Staphylococcus aureus* ainda ocorram em mais de 80% de todas as explorações, apesar dos grandes progressos que têm sido feitos no controlo de mastites ao longo dos anos (Roberson *et al*, 1998).

É um agente ubiqüitário e pode colonizar a pele do teto e úbere, vagina, amígdalas, entre outras áreas do corpo, mas é a secreção da glândula mamária infetada que é a principal fonte de infecção no efetivo (George *et al*, 2007). A transmissão entre vacas ocorre no momento da ordenha através das mãos dos ordenhadores, tetinas ou copos de *pré* e *pós-dipping*. As

moscas (*Hameotobia irritans*) são um importante vetor na transmissão de *Staphylococcus aureus* nas mastites em novilhas, particularmente em animais com lesões na ponta dos tetos (Radostitis *et al*, 2007). As novilhas infetadas ao parto podem representar aproximadamente um terço dos novos casos por *Staphylococcus aureus*, sendo que a inexistência de medidas para controlar a doença nas novilhas pré-parto pode constituir uma razão para a falha em erradicar o agente (Roberson *et al*, 1998).

A maioria das infecções por *Staphylococcus aureus* são subclínicas, com excreção intermitente de elevadas CCS, no entanto, em infecções durante o período inicial da lactação podem ocorrer formas hiperagudas, com ocorrência de gangrena (Radostitis *et al*, 2007).

Estes agentes têm a capacidade de colonizar o epitélio do teto com conseqüente fixação nas células epiteliais e invasão das mesmas. Verifica-se uma destruição permanente do parênquima celular, fibrose e formação de abscessos, tornando assim difícil a atuação dos antimicrobianos (George *et al*, 2007).

As infecções são crônicas e a taxa de cura é bastante baixa em animais lactantes devido à inadequada penetração do agente antimicrobiano no local da IIM e à resistência de determinadas estirpes aos antibióticos (Radostitis *et al*, 2007).

Barkema *et al* (2006) sugerem o tratamento de animais jovens com infecções por *Staphylococcus aureus* sensíveis à penicilina por serem justificados com uma taxa de cura satisfatória e um retorno econômico, enquanto o tratamento de animais velhos, infecções crônicas ou por agentes isolados resistentes à penicilina deve ser desencorajado e os animais refugados.

3.6.1.2. *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae são bactérias cocos Gram-positivos, catalase negativos e beta-hemolíticos.

Este agente, altamente contagioso, sobrevive pouco tempo no meio ambiente (Maroney, 2005). O principal reservatório da infecção é a glândula mamária, sendo frequente a afeção de mais do que um quarto por animal (Maroney, 2005). Ocasionalmente, pode haver colonização do canal e pele do teto, especialmente se a sua superfície se encontrar danificada (Blowey & Edmonson, 2010). A transmissão ocorre durante a ordenha via máquina de ordenha, mãos dos ordenhadores e materiais de limpeza dos tetos, como é o caso dos pano quando usados em mais do que uma vaca (Maroney, 2005).

O desenvolvimento de mastites associadas a este agente resulta essencialmente do processo de invasão e inflamação dos lóbulos do tecido mamário, resultando numa série de episódios mais frequentes durante o primeiro mês após a infecção (Radostitis *et al*, 2007). Apesar de não haver formação de abscessos, as infecções crônicas vão diminuir permanentemente a capacidade produtiva da glândula mamária infetada (George *et al*, 2007), cujas perdas podem

atingir os 25% durante a lactação e, 10-15% da produção total esperada numa vacaria onde o agente está presente (Radostitis *et al*, 2007).

A grande maioria das infeções por *Streptococcus agalactiae* revelam-se subclínicas podendo, ocasionalmente, ocorrer episódios clínicos com edema do úbere e alterações macroscópicas do leite (Maroney, 2005).

Diversos autores referem taxas de cura superiores a 90% após tratamento intramamário com medicamentos da família da penicilina (Owens *et al*, 1997; Maroney, 2005; George *et al*, 2007; Radostitis *et al*, 2007). O tratamento de animais com infeções subclínicas resulta numa aumento da produção e decréscimo acentuado na CCS do tanque, tornando deste modo o tratamento economicamente viável (Maroney, 2005).

3.6.1.3. *Staphylococcus coagulase negativo*

Os agentes denominados por *Staphylococcus coagulase negativo* (SCN) são bactérias cocos Gram-positivos, catalase positivos, coagulase negativos e algumas espécies são hemolíticas (Blowey & Edmonson, 2010). Exemplos de espécies incluídas neste grupo são: *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus simulans*.

Infeções por SCN ocorrem, geralmente, durante a fase final da lactação em vacas múltiparas enquanto vacas primíparas desenvolvem a infeção antes ou logo após o parto (Pyörälä & Taponen, 2009). Estudos sugerem que espécies de SCN se comportam como agentes contagiosos, enquanto outras se comportam como agentes ambientais (Pyörälä & Taponen, 2009; Piessens *et al*, 2011); e que a distribuição das espécies de SCN no leite e ambiente difere entre as explorações (Piessens *et al*, 2011).

Infeções Intra-mamárias (IIM) devido a SCN induzem uma reação inflamatória leve resultando em infeções subclínicas com elevação moderada da CCS, no entanto infeções persistentes podem provocar danos no tecido mamário com conseqüente diminuição da produção de leite e diminuição da qualidade (Pyörälä & Taponen, 2009). A prevalência de mastites por SCN é maior em vacas primíparas do que em vacas múltiparas (Schukken *et al*, 2009).

A taxa de cura após o tratamento antimicrobiano é usualmente alta e a adoção de medidas de controlo de agentes contagiosos como o uso de um desinfetante de tetos após a ordenha reduz as infeções por SCN no efetivo (Pyörälä & Taponen, 2009).

3.6.1.4. *Streptococcus dysgalactiae*

Streptococcus dysgalactiae é um agente coco gram-positivo, catalase negativo e alfa-hemolítico.

Este organismo possui características de agente contagioso e agente ambiental (Calvinho *et al*, 1998; Blowey & Edmonson, 2010; Petersson-Wolfe, 2012). *Streptococcus dysgalactiae* pode ser isolado da glândula mamária infetada e lesões nos tetos e transmitido primariamente

através da ordenha, como também pode sobreviver no ambiente e provocar IIM durante o período não lactante (Calvinho *et al*, 1998).

Os sinais de infecção por *Streptococcus dysgalactiae* são inespecíficos podendo resultar em mastites subclínicas ou clínicas com leite alterado e edema do quarto afetado (George *et al*, 2007).

Tratamentos antimicrobianos com penicilina, cloxacilina e cefalosporinas têm tido resultados satisfatórios (George *et al*, 2007).

3.6.1.5. *Corynebacterium bovis*

Corynebacterium bovis é um agente gram-positivo e catalase positivo.

Este agente coloniza o canal do teto e ocasionalmente causa infecções leves a moderadas do úbere com um ligeiro aumento na CCS e um ligeiro decréscimo na produção de leite (NMC, 1999a).

A infecção ocorre durante a ordenha e o tratamento antimicrobiano durante a lactação não é indicado (NMC, 1999a).

3.6.1.6. *Mycoplasma spp.*

Mycoplasma bovis é o agente mais comum em mastites por *Mycoplasma spp.* Responsável por mastites agudas com forte manifestação clínica que subsequentemente evoluem para mastites crônicas, podem ocorrer em apenas um quarto mas frequentemente atingem dois ou mais quartos (George *et al*, 2007).

Altamente contagioso, é um agente ubiqüitário que pode ser isolado no trato respiratório e vagina, e é associado a infecções respiratórias e artrites nos animais mais novos da exploração. A transmissão pode ocorrer assim, quer durante a ordenha, quer através do meio envolvente e fómites (Maunsell *et al*, 2011).

A resposta ao tratamento com antimicrobianos é pobre e, uma vez identificados, estes animais infetados devem ser segregados e ordenhados no final, no entanto o refúgio é aconselhado (Blowey & Edmonson, 2010).

Para o controlo de mastites de natureza contagiosa foi elaborado, nos anos 60, um plano de controlo composto por cinco pontos. Estes pontos fazem referência à utilização e manutenção apropriada do equipamento de ordenha, desinfecção dos tetos após a ordenha (*pós-dipping*), tratamento adequado das mastites clínicas durante a lactação, antibioterapia de secagem e refúgio dos animais cronicamente infetados (Veerkamp & Haas, 2005).

Atualmente são muitas as explorações por todo o mundo que implementam este plano e cujos pontos fazem parte dos procedimentos de rotina.

Smith & Hogan (2001) referem que explorações que adotaram este plano de controlo conseguiram a erradicação de agentes como *Streptococcus agalactiae* e reduziram para menos de 1% os quartos infetados por *Staphylococcus aureus*.

3.6.2. Agentes ambientais

As mastites ambientais podem ser definidas como as IIM causadas por agentes cujo reservatório primário é o próprio ambiente onde o animal vive. Ao contrário das mastites contagiosas cuja fonte de infeção é o quarto mamário infetado e a exposição aos agentes ocorre durante a ordenha, nas mastites de origem ambiental a exposição da ponta do teto aos agentes ambientais ocorre durante toda a vida do animal, incluindo durante a ordenha, entre ordenhas, período seco e antes do primeiro parto em novilhas (Smith *et al*, 1985; Costa *et al*, 1996).

Descritos como invasores oportunistas da glândula mamária, os agentes ambientais tipicamente invadem, multiplicam-se, desencadeiam uma resposta imune e são rapidamente eliminados, não se encontrando adaptados a sobreviver no hospedeiro (Bradley, 2002). No entanto, a ocorrência de infeções persistentes de agentes ambientais como *Escherichia coli* e *Streptococcus uberis* podem sugerir o desenvolvimento de algum grau de adaptação à glândula mamária (Bradley & Green, 2001).

Os agentes ambientais constituem um grupo heterogéneo de bactérias com uma grande variedade de géneros, espécies e estirpes. Aqueles que são mais frequentemente encontrados são as espécies de Streptococci não *Streptococcus agalactiae* (estreptococos ambientais) e agentes coliformes (Smith *et al*, 1985).

Estas infeções são normalmente associadas a condições onde a presença de sujidade e humidade são uma constante, expondo a ponta do teto a uma elevada concentração bacteriana. Assim, animais estabulados em condições de higiene precária, parques de maternidade conspurcados, preparação imprópria ou inadequada para a ordenha e descida do leite, e ocorrência de *liner-slips* durante a ordenha são fatores de risco que podem levar à ocorrência de IIM por agentes ambientais.

A cama dos animais pode desempenhar um papel importante na transmissão de agentes ambientais responsáveis por IIM. O contato próximo e prolongado do úbere e tetos com o material que constitui a cama e que pode albergar elevadas populações de bactérias, tem sido associado com o aumento da contaminação dos tetos por agentes ambientais e aumento da incidência de infeções (Zehner *et al*, 1986).

Coliformes e *Streptococcus uberis* em quantidade superior a 10⁶ UFC/g de material de cama podem resultar no aumento da incidência das mastites (Zehner *et al*, 1986).

3.6.2.1. Coliformes

As bactérias Gram-negativo são os agentes etiológicos mais frequentemente isolados em casos de mastites clínicas agudas. O termo mastites por coliformes é muitas vezes utilizado incorretamente para designar infecções da glândula mamária por bactérias Gram-negativo. Dos agentes coliformes fazem parte *E. coli*, *Klebsiella spp.* e *Enterobacter spp.* (Hogan & Smith, 2003).

3.6.2.1.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli é um bacilo Gram-negativo, oxidase negativo, fermentador da lactose e algumas estirpes são hemolíticas (Blowey & Edmonson, 2010).

Este agente causa infecção e inflamação da glândula mamária em bovinos de leite no periparto e no início da lactação com sinais clínicos locais bastante evidentes e, por vezes, reações sistêmicas severas. São vários os casos de morte que ocorrem por ano devido a infecções por *E.coli* (Burvenich *et al*, 2003).

Desde 1960 que se tem registado um aumento substancial da incidência de mastites por *Escherichia coli* e é aceite que é a causa mais comum de mastites fatais (Menzies *et al*, 1995). *Escherichia coli* invade o úbere através do canal do teto onde se multiplica e desencadeia uma reação inflamatória imediata com um aumento do número de neutrófilos.

3.6.2.1.1.1. Fatores de virulência

Ao contrário do que se verifica nas colibaciloses dos vitelos e suínos, a patogenicidade das mastites por coliformes não é devida à presença de determinadas estirpes de *Escherichia coli*. A patogénese deste agente resulta de um fator não específico mas potente, a endotoxina ou lipopolissarídeo (LPS) (Burvenich *et al*, 2003).

O LPS é o maior componente da membrana exterior da parede celular de bactérias Gram-negativos e compreende o lípido A, o “core” lipopolissacarídeo e as unidades polissacarídeas (antigénio O) (figura 23). A actividade biológica do LPS reside predominantemente no lípido A, sendo-lhe atribuída a responsabilidade dos efeitos deletérios do LPS nos hospedeiros mamíferos: febre, inflamação, choque e falha multiorgânica (Schukken *et al*, 2012).

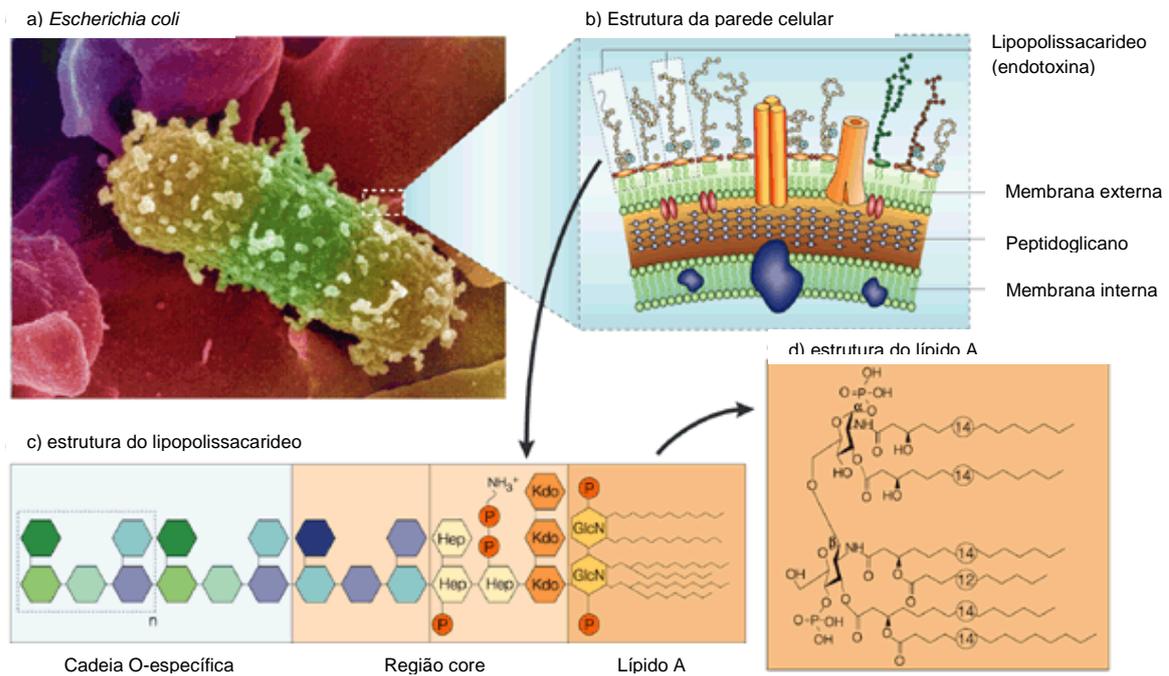


Figura 19 – a) eletromicrografia de *Escherichia coli*; b) representação esquemática da localização do lipopolissacarídeo (LPS; endotoxina) na parede celular bacteriana; c) estrutura do lipopolissacarídeo e d) estrutura primária do centro tóxico do LPS, o lípido A (adaptado de www.nature.com)

O LPS é libertado como resultado do crescimento bacteriano, destruição e lise após resposta inflamatória, nos dutos galactóforos. A sua libertação vai ser responsável por muitos dos sinais patofisiológicos observados em mastites por agentes Gram-negativo: febre, alteração do número de leucócitos circulantes (leucopénia e leucocitose), ativação do complemento, ativação de macrófagos, aumento da permeabilidade vascular, entre outros (Burvenich *et al*, 2003).

A possível absorção do LPS do úbere inflamado durante a mastite para a circulação sistémica, e o seu significado a nível sistémico pode não ser tão claro como tem sido discutido na literatura nas últimas décadas. É frequente dizer-se que animais com mastites por coliformes mostram sinais de endotoxémia, no entanto esta frase deve ser evitada pois na verdade verifica-se uma toxínemia causada por FNT - α (Burvenich *et al*, 2003).

3.6.2.1.1.2. Resposta inflamatória

A primeira linha de defesa do mecanismo da glândula mamária contra *Escherichia coli* é baseada nos fagócitos residentes, maioritariamente células mononucleadas. A maioria dos fatores quimiotáticos são produzidos pelo hospedeiro mas também alguns fatores bacterianos atuam como quimiotáticos, como é o caso do LPS. Após uma complexa cascata de libertação de substâncias biológicas e ativação do endotélio, os neutrófilos migram para a glândula mamária e aparecem no fluído dos dutos galactófaros. Apesar dos vários sistemas antimicrobianos existentes na glândula mamária, é o influxo massivo de neutrófilos que irá ser responsável pela resolução da infeção através do sequestro e morte das bactérias invasoras (Burvenich *et al*, 2003).

3.5.2.1.1.3 Severidade

Mastites clínicas com sintomas sistémicos graves ocorrem no periparto ou durante o início da lactação, enquanto que, à medida que a lactação avança os sinais são ligeiros a moderados (Burvenich *et al*, 2003; Pyörälä, 2008).

Mastites clínicas severas são caracterizadas por um início súbito com sinais sistémicos graves: diarreia, hipomotilidade ou atonia ruminal, recumbência, hipotermia, frequência cardíaca elevada e hipersialia (Burvenich *et al*, 2003). Localmente ocorre uma inflamação exuberante do úbere e alterações características no leite, que adquire um aspeto aguado ou cor de cerveja e pode conter pequenos coágulos.

Geralmente, existe uma correlação entre os sinais clínicos locais e a severidade dos sintomas sistémicos. Contudo, discrepâncias têm sido referidas especialmente em IIM no pós-parto, onde o aparecimento dos sinais clínicos locais têm um progresso lento e acabam por passar despercebidos, sendo a reação local ligeira sucedida de sintomas sistémicos severos de choque. Por vezes, quando finalmente se consegue estabelecer um diagnóstico definitivo, o tratamento acaba por não surtir efeito resultando na morte do animal (Burvenich *et al*, 2003).

3.5.2.1.1.4 Fatores que afetam a severidade

Atualmente, sabe-se que a severidade das mastites bovinas por *Escherichia coli* é principalmente determinada por fatores associados ao animal, em vez da patogenicidade do agente invasor. Os principais fatores são:

1. altura da lactação – infeções experimentais da glândula mamária de vacas recém-paridas com *Escherichia coli* resultaram em mastites mais severas quando comparadas com infeções em animais a meio da lactação (Radostitis *et al*, 2007); Burvenich *et al* (2003) refere que uma elevada percentagem de IIM durante os primeiros 60 a 70 dias de lactação podem desenvolver uma mastite clínica severa;

2. número e função dos polimorfonucleados (PMN) em circulação – como já foi referido, a população de PMN representa a maior linha de ação contra a infeção da glândula mamária e é a sua velocidade de influxo no tecido mamário que vai condicionar a severidade da mastite. No entanto, no período do periparto, o número e as diferentes funções dos PMN circulantes como a diapedese, fagocitose e a capacidade de destruir bactérias estão diminuídos. As maiores variações de número e funções ocorrem num período relativamente pequeno de uma semana após o parto (Burvenich *et al*, 2000);
3. CCS e idade do animal – efetivos com CCS baixa têm maior incidência de mastites ambientais comparativamente com efetivos CCS elevada (Burvenich *et al*, 2000); vacas múltiparas mostraram desenvolver mastites por *Escherichia coli* mais severas comparativamente com vacas primíparas uma vez que nestas, a função do PMN parece ser mais eficiente (Pyörälä, 2008);
4. estado metabólico - os principais distúrbios metabólicos que ocorrem no periparto também desempenham um papel na capacidade de resposta do sistema imune: alterações no metabolismo dos ácidos gordos e um balanço energético negativo podem originar situações de fígado gordo e cetose. A acumulação de gordura no fígado gera distúrbios na produção dos fatores da imunidade humoral e está também associada à diminuição da capacidade funcional dos PMN (Zerbe *et al*, 2000); Leslie *et al* (2001) refere a existência de uma evidente diminuição da capacidade de fagocitose e morte de bactérias em vacas com cetose e fígado gordo; elevadas concentrações de corpos cetónicos em circulação ao parto inibem a proliferação de células hematopoiéticas (Hoeben *et al*, 2000) e estão associados ao aumento da incidência de mastites clínicas durante a fase inicial da lactação (Smith *et al*, 1985; Huszenicza *et al*, 2004). Pyörälä (2008) citando Curtis (1983) referem ainda que vacas com hipocalcémia no periparto têm maior probabilidade de desenvolver mastites por coliformes;

3.5.2.1.1.5 Danos teciduais e perda de produção

Necrose do epitélio mamário ocorre em casos de infeções severas enquanto em infeções moderadas os danos no tecido alveolar são mínimos (Zhao & Lacasse, 2007).

O influxo em massa dos neutrófilos para a glândula mamária vai afetar a barreira sangue-leite e originar danos no epitélio mamário (Zhao & Lacasse, 2007). Por outro lado, as substâncias químicas resultantes da atividade dos neutrófilos face às bactérias, como as espécies reativas ao oxigénio, podem causar danos no tecido glandular mamário e diminuir a sua capacidade secretora (Burvenich *et al*, 2003).

3.5.2.1.1.6 Persistência das IIM

IIM causadas por *Escherichia coli* têm, frequentemente, uma duração limitada e as bactérias invasoras são eliminadas do quarto espontaneamente.

Mastites clínicas recorrentes num animal que demonstrou uma infecção persistente têm sido descritas mas são consideradas excepcionais (Döpfer *et al*, 1999). Lipman *et al* (1994) reportou que quartos com mastites clínicas recorrentes causadas por *Escherichia coli* estavam infetadas pela mesma estirpe de *Escherichia coli*. Devido à grande diversidade de estirpes de *Escherichia coli* no ambiente, a reinfeção do úbere com uma mesma estirpe é improvável, o que implica que, durante os episódios recorrentes, o agente sobreviveu na glândula mamária, resultando numa IIM persistente (Döpfer *et al*, 1999). Bradley (2002) sugere a existência de um grau de adaptação de determinadas estirpes ao ambiente da glândula mamária bovina. Tais adaptações ao ambiente podem, por exemplo, ser uma maior capacidade de sequestrar ferro, sobreviver no interior dos neutrófilos ou aderir e invadir o tecido mamário (Bradley, 2002). Um aumento da frequência de mastites crónicas por *Escherichia coli* em várias explorações foi referido por Bradley & Green (2001).

3.6.2.2. *Klebsiella spp* e *Enterobacter spp*

Klebsiella spp e *Enterobacter spp* são bacilos gram-negativo, oxidase negativos, fermentadores da lactose e não hemolíticos.

Estes dois agentes coliformes são normalmente encontrados nos solos, grãos, água e trato intestinal dos animais (Hogan & Smith, 2003).

Sendo agentes ambientais e coliformes, é a contaminação fecal do úbere que está associada a este tipo de mastites. No entanto, *Klebsiella pneumoniae* é muitas vezes associada à ocorrência de mastites severas e tóxicas em cubículos com camas de serradura molhada ou verde (Blowey & Edmonson, 2010).

Ribeiro *et al* (2008) relataram um caso de mastite clínica hiperaguda por *Klebsiella pneumoniae* com apresentação de sinais sistémicos como piréxia, anorexia, estase ruminal, polipneia, tremores, taquicardia e depressão. À palpação os quartos afetados apresentavam-se quentes, dolorosos e edemaciados, o leite encontrava-se descolorado.

Mastites causadas por *Klebsiella pneumoniae* podem ser particularmente severas quando comparadas com mastites por *Escherichia coli* devido à sua fraca resposta a agentes antimicrobianos, rápida evolução para choque tóxico e morte (Ribeiro *et al*, 2008). No gráfico 5 é possível observar que, dos três agentes Gram-negativo representados, *Klebsiella pneumoniae* é a que apresenta uma resposta inata mais severa, demonstrada pela elevada concentração de FNT – α .

A resposta imune inata pode ser bastante preditiva da resposta clínica observada e do risco de morte ou refugo após a IIM por qualquer um dos três agentes mencionados no gráfico 5 (Schukken *et al*, 2012).

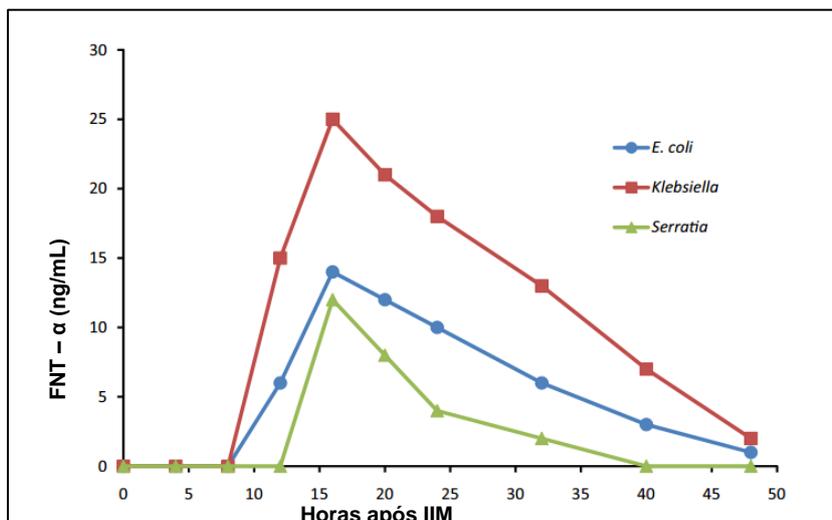


Gráfico 5 - Concentração de FNT - α no leite após IIM com *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. marcescens* (adaptado de Schukken *et al*, 2012)

Para além da sua fraca resposta ao tratamento, a maioria dos animais acabam por ser refugados prematuramente pois a CCS é persistentemente alta com casos clínicos recorrentes (Blowey & Edmonson, 2010).

3.6.2.3. Terapêutica para agentes coliformes

A abordagem inicial ao tratamento de mastites clínicas agudas por coliformes consiste na terapia de suporte com o objetivo de controlar os sinais de toxémia inerentes à infeção. Fluidoterapia intensa, venosa ou oral, administração de anti-inflamatórios e ordenha frequente dos quartos afetados são procedimentos que devem ser realizados o mais rapidamente possível.

A administração de antimicrobianos tem sido um assunto controverso entre autores. Hogan & Smith (2003) referem que o uso de antibióticos, quer via parenteral, quer via intramamária é virtualmente dispensável devido à curta duração das infeções e elevada taxa de cura espontânea. Outros autores como George *et al* (2007) e Radostitis *et al* (2007) defendem que os antibióticos devem ser considerados como terapia não só em casos severos, como também para garantir a eliminação completa da infeção e impedir que esta se torne crónica.

Antimicrobianos como gentamicina, sulfamidas associadas a trimetropim, fluorquinolonas e cefalosporinas de terceira geração têm-se mostrado eficazes para agentes coliformes (George *et al*, 2007).

3.6.2.4. Controlo

O controlo de mastites por coliformes é caracteristicamente difícil, falível e frustrante. Podem ser vários os casos fatais de mastites hiperagudas por ano em explorações cujo manejo é aparentemente excelente.

O principal princípio para o controlo de mastites por coliformes é a prevenção de novas IIM. A tomada de medidas preventivas abrange variadíssimas áreas relacionadas com o manejo dos animais:

- a) Estabulação e ambiente – é normal a presença de bactérias coliformes em todo o ambiente que rodeia o animal, no entanto deve ser feito um esforço para evitar situações que permitam o seu crescimento para números elevados.
 - i) Camas – especial atenção deve ser dada a animais que se encontrem no início do período seco e periparto; o material de cama utilizado nestes parques deve ser limpo e seco, de modo a prevenir a contaminação fecal;
 - ii) Cubículos – para ser minimizada a possibilidade de contaminação dos tetos deve existir uma limpeza regular; com o objetivo de impedir a defecação nos cubículos, estes devem possuir as medidas adequadas de modo a que as vacas não se deitem demasiado para a frente e para assegurar que estas defecam no corredor;
- b) Rotina de ordenha – o uso de pré-dipping em associação com uma boa preparação do úbere pode reduzir até 51% a taxa de IIM por agentes ambientais, comparativamente com apenas uma boa preparação do úbere (Radostitis *et al*, 2007);
- c) Máquina de ordenha – os níveis de vácuo devem ser revistos regularmente;
- d) Vacas recumbentes – animais em recumbência devem ser mantidos com um material de cama limpo e seco, o úbere deve ser alvo de limpeza e secagem frequente e os tetos devem ser embebidos em soluções desinfetantes;
- e) Vacinação – a vacinação de animais durante o período seco e início da lactação com a vacina de antigénio LPS fornece uma ferramenta para reduzir a incidência e severidade das mastites clínicas por coliformes (Radostitis *et al*, 2007).

3.6.2.5. Outras bactérias Gram-negativo

Outras bactérias Gram-negativo que são frequentemente isoladas em IIM incluem *Serratia spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus spp.*

3.6.2.5.1. *Serratia spp.*

Serratia spp. é um bacilo gram-negativo, fraco fermentador da lactose (Schukken *et al*, 2012). De todas as espécies de *Serratia* responsáveis por mastites é a *Serratia marcescens* a mais prevalente (Bannerman *et al*, 2004).

Este agente tem sido isolado da água, solos, alimento e em materiais de cama, tendo sido reportado um surto de mastites atribuído à contaminação do desinfetante de tetos utilizado na ordenha (Todhunter *et al*, 1991; Bannerman *et al*, 2004).

Novas IIM podem ocorrer quer durante o período seco, quer durante a lactação (Todhunter *et al*, 1991).

Animais infetados com este agente, geralmente, desenvolvem um quadro com sinais clínicos ligeiros sendo a forma subclínica a mais característica, ao contrário das IIM por outros agentes Gram-negativos (Bannerman *et al*, 2004).

IIM por *Serratia marcescens* tendem a tornar-se infeções crónicas sendo, nestes casos, a sua identificação difícil devido ao seu caráter subclínico e à eliminação do agente em número reduzido (Bannerman *et al*, 2004).

A principal preocupação relativamente a este agente infeccioso é o fato de estarem descritas resistências à maioria dos antimicrobianos currentemente utilizados para o tratamento de mastites (Bannerman *et al*, 2004).

3.6.2.5.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo, não fermentador da lactose, usualmente hemolítico e produtor de um odor característico a uvas (Hogan & Smith, 2003).

Mastites clínicas resultantes de surtos por *Pseudomonas aeruginosa* têm sido associados a uma série de fatores, incluindo contaminação de preparações de secagem, de panos de ordenha, e da água utilizada para lavar o úbere antes da ordenha (Bannerman *et al*, 2005). *Pseudomonas aeruginosa* também pode ser encontrada na água de poços (Blowey & Edmonson, 2010).

Animais com IIM por este agente desenvolvem primeiramente uma mastite clínica aguda que frequentemente evolui para uma infeção crónica. Mastites agudas gangrenosas têm sido reportadas em aproximadamente 10% de todos os casos, e mastites com desenvolvimento de complicações sistémicas resultando na morte do animal não são raras (Bannerman *et al*, 2005). O tratamento terapêutico revela-se ineficaz, uma vez que *Pseudomonas aeruginosa* é resistente à maioria dos antibióticos convencionais (Bannerman *et al*, 2005).

3.6.2.6. Estreptococcus ambientais

Estreptococos ambientais têm sido referidos, de forma consistente, como uma das principais causas de mastites clínicas e subclínicas por todo o mundo (Hogan & Smith, 2003). Estes incluem espécies de outros streptococci que não *Streptococcus agalactiae* e espécies de enterococci (Todhunter *et al*, 1995).

Entre os estreptococos ambientais causadores de mastites bovinas, é *Streptococcus uberis* o mais prevalente (Bannerman *et al*, 2004).

A percentagem de estreptococos ambientais que causam IIM associadas a sinais clínicos pode variar de 42% a 68% numa mesma exploração sendo que, destes 43% de mastites apresentam apenas alterações no leite, 49% envolvem leite alterado com edema do úbere e, apenas 8% significam sinais sistémicos como febre e anorexia (Hogan & Smith, 2003).

Durante a lactação, a incidência de mastites clínicas é maior na primeira semana após o parto e decresce durante os primeiros 305 DEL. Curiosamente, a taxa de casos clínicos por estreptococos ambientais é mais elevada em vacas com lactações extensas (>305 dias) comparativamente a vacas no pico da lactação. Assim, efetivos com uma elevada percentagem de animais com uma lactação superior a 305 dias parecem ter uma maior prevalência de IIM por estes agentes (Hogan & Smith, 2003).

A utilização de desinfetante nos tetos após a ordenha (*pós-dipping*) não é efetiva no controlo de estreptococcus ambientais e resulta num inaceitável número de elevados casos clínicos de mastites e IIM por estes agentes (Todhunter *et al*, 1995).

Antibioterapia no período de secagem reduz a taxa de novas IIM por estreptococcus ambientais durante os períodos iniciais do período de secagem mas não tem efeito durante o período do periparto (Todhunter *et al*, 1995).

3.6.2.6.1. *Streptococcus uberis*

Streptococcus uberis é um microrganismo coco gram-positivo, catalase negativo, não hemolítico e esculina positivo (Blowey & Edmonson, 2010).

Este agente é ubiqüitário e pode colonizar tanto o animal como o seu ambiente. Nos animais tem sido isolado dos lábios, amígdalas, pele, cavidade oral, rúmen, trato respiratório, reto, orifício do teto e fezes (Kromker *et al*, 2014). Blowey & Edmonson (2010) referem ainda a sua elevada capacidade de crescimento em camas de palha com elevada incidência de mastites. Tal facto resultou no abandono da palha por grande parte das explorações, com preferência pelo estabulamento dos animais em cubículos cujo material de cama é a areia.

Mastites por *Streptococcus uberis* são, geralmente, consideradas como resultado de uma exposição ambiental a este agente (Lopez-Benavides *et al*, 2007), contudo casos de transmissão vaca-a-vaca têm sido reportados (Douglas *et al*, 2000; Rato *et al*, 2008 citando Zadoks *et al*, 2003).

3.6.2.6.2. Fatores de virulência

Os fatores de virulência de *Streptococcus uberis* não são completamente conhecidos e é sugerido que a sua expressão varie consoante as estirpes (Kromker *et al*, 2014).

Segundo Oliver *et al* (1998) os fatores de virulência podem ser classificados em fatores associados à atividade celular e fatores extracelulares. Alguns fatores associados à atividade e estrutura celular são a toxina neutrofílica, molécula de adesão, cápsula e fator ativador do plasminogénio. Os fatores extracelulares são a cápsula, a hialuronidase e o fator “uberis”.

Este agente tem a capacidade de aderir e invadir as células epiteliais mamárias, sendo essa capacidade atribuída à molécula de adesão designada por “*Streptococcus uberis* adhesion molecule” (SUAM) (Almeida *et al*, 2011). Kromker *et al* (2014) citando Frost *et al* (1977) referem que a elevada prevalência deste agente em alguns efetivos pode ser explicada pela sua capacidade de adesão e invasão das células do hospedeiro.

Possivelmente relacionado com a capacidade de adesão às células, *Streptococcus uberis* é capaz de formar biofilmes. Os biofilmes conferem área e proteção às bactérias para se multiplicarem e permite-lhes resistirem aos antibióticos, desinfetantes e defesas do hospedeiro (Moore, 2009).

As enzimas produzidas por *Streptococcus uberis* têm um papel importante na disseminação da infecção: todas as estirpes produzem hialuronidase que parece aumentar a distribuição do agente pelo tecido mamário (Kromker *et al*, 2014).

O fator ativador do plasminogénio tem sido referido como um importante mecanismo de obtenção de nutrientes necessários à multiplicação de *Streptococcus uberis* (Oliver *et al*, 1998), permitindo-lhe a obtenção de aminoácidos a partir da caseína (Leigh, 1999).

Outro fator de virulência deste agente está na sua capacidade para produzir cápsulas de ácido hialurónico, presente em cerca de 44% das estirpes de *Streptococcus uberis* (Kromker *et al*, 2014). Estirpes encapsuladas apresentam uma maior capacidade para estabelecer uma infecção na glândula lactante do que estirpes sem cápsula, as quais são rapidamente eliminadas (Field *et al*, 2003). Os mecanismos através dos quais os polissacarídeos capsulares conferem resistência à fagocitose não são consensuais entre autores. Horowitz & Silverstein (1980) referiram que a cápsula pode prevenir a ligação dos fatores de opsonização como anticorpos ou o complemento à bactéria; alternativamente King & Wilkinson (1981) sugeriram que a cápsula pode ser permeável aos fatores de opsonização que se ligam através da superfície capsular de tal forma que ficam impedidos de se ligarem aos receptores das células fagocíticas. Dados mais recentes indicam que a resistência de *Streptococcus uberis* à fagocitose pelos neutrófilos ocorre apesar da presença de Igs ligadas à bactéria; e que a presença de cápsula em determinadas estirpes de *Streptococcus uberis* determina especificamente a resistência à fagocitose pelos neutrófilos mas não pelos macrófagos (Leigh, 1999).

3.6.2.6.3. Resposta inflamatória

A resposta inflamatória consiste num significativo recrutamento de leucócitos, que, no entanto, parece ser ineficaz no controlo do desenvolvimento da infecção. *Streptococcus uberis* estimula a produção local de citocinas sendo que o pico das concentrações de FNT- α , IL-1 e IL-8 é alcançado com o aparecimento dos sinais clínicos. Estes achados sugerem que outros fatores podem estar envolvidos no recrutamento inicial dos leucócitos (Rambeaud *et al*, 2003).

Uma das diferenças mais importante entre IIM por *Escherichia coli* e *Streptococcus uberis* relaciona-se com a manifestação dos sinais clínicos, sendo que em infeções experimentais por *Escherichia coli* estes aparecem cerca de 8-16 horas após a inoculação da suspensão bacteriana, enquanto em infeções por *Streptococcus uberis* os primeiros sinais não surgem antes das 84 horas após inoculação. Este aparecimento tardio dos sinais clínicos sugere a existência de uma fase em que o agente se tenta adaptar e crescer na glândula mamária. Este período de adaptação pode ser necessário para *Streptococcus uberis* adquirir os aminoácidos para o seu crescimento. No entanto, Pedersen *et al* (2003) relataram a exibição de sinais clínicos às 4 horas após a inoculação, tais diferenças entre estudos devem-se, possivelmente, a um maior número de bactérias inoculadas ou devido ao facto de ser uma estirpe diferente (Rambeaud *et al*, 2003).

Casos típicos de mastites por *Streptococcus uberis* têm um início súbito, com edema marcado do quarto afetado, com alterações macroscópicas do leite marcadas pela presença de grande coágulos brancos e, por vezes, com aumento marcado da temperatura corporal (Blowey & Edmonson, 2010).

3.6.2.6.4. Fatores de risco do animal

O risco de novas IIM por *Streptococcus uberis* é influenciado pela altura da lactação e paridade do animal.

As primeiras duas semanas após a secagem e as duas últimas antes do parto são consideradas como a fase onde o risco de infeção é maior por este agente. Kromker (2014) citando Wilkinson (2003) refere que foi durante período de secagem que os animais a adquiriram em 56% dos casos clínicos. A elevada taxa de infeção neste período pode estar associado à falta da ação de drenagem conferida pela ordenha, alterações na composição da secreção mamária e alterações morfológicas do canal do teto (Radostitis *et al*, 2007). Nas duas últimas semanas antes do parto, a susceptibilidade pode ser justificada pela perda de leite devido ao edema do úbere, perda dos rolhões de queratina do canal do teto ou devido à imunossupressão característica do periparto (Radostitis *et al*, 2007).

3.6.2.6.5. Persistência da infeção

Devido às suas características bioquímicas, capacidade para invadir as células da glândula mamária e capacidade de produção de biofilmes e formação de cápsulas, é sugerido que *Streptococcus uberis* pode persistir na glândula mamária bovina. Tais factos promovem o desenvolvimento de infeções crónicas e permitem que o agente deixe de ser um agente ambiental para se tornar um agente com características de agente contagioso (Kromker, 2014).

3.6.2.7. Terapêutica para estreptococcus ambientais

A maioria das mastites associadas a *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae* respondem bem à administração local intramamária de penicilina, cefalosporinas, cloxacilina, eritromicina e tetraciclina (Radostitis *et al*, 2007).

Casos clínicos de mastites em vacas lactantes devem ser tratados pelo menos com duas administrações de antibiótico com 12 horas de intervalo, via intramamária; infeções subclínicas em final de lactação podem ser tratadas no período de secagem (Radostitis *et al*, 2007).

Alguns casos associados a determinadas estirpes de *Streptococcus uberis* parecem não responder ao tratamento, pelo que este deve ser prolongado nestes animais (Radostitis *et al*, 2007).

3.6.2.8. Controlo

O controlo de mastites por estreptococos ambientais é alcançado pela diminuição da exposição aos microrganismos da ponta do teto aos agentes e pelo aumento da resistência às IIM.

Uma medida de controlo específica é a não estabulação dos animais em camas de palha pelas razões acima referidas.

A manutenção de um ambiente limpo e seco é essencial para a redução da exposição do teto e apesar de este ser um critério que deve ser válido para todos os animais da exploração, especial importância deve ser dada às condições dos animais no período secagem e periparto.

À semelhança das medidas de controlo de mastites por agentes coliformes, o uso de um pré-dipping, uma boa preparação do úbere e um adequado funcionamento da máquina de ordenha verificam-se medidas eficazes.

Uma terapia de secagem adequada é mais efetiva contra estreptococos ambientais do que coliformes. A infusão de um antimicrobiano de longa ação após a última ordenha da lactação reduziu a incidência de novas infeções por *Streptococcus uberis* de 12,3% para 1,2%. A aplicação de um selante de tetos no período de secagem também se mostrou eficaz na prevenção de infeções associadas a *Streptococcus uberis* durante esse mesmo período de secagem (Radostitis *et al*, 2007).

3.6.3. *Trueperella pyogenes*

Trueperella pyogenes (anteriormente *Arcanobacterium pyogenes*) é um agente cocobacilo, Gram-positivo e hemolítico.

Este agente é responsável por mastites clínicas severas caracterizadas por secreções espessas e purulentas que podem surgir como casos esporádicos em bovinos de leite estabulados, ou associados a surtos de mastites que ocorrem durante os meses de verão na Europa designadas por “mastites de verão” (Radostitis *et al*, 2007).

As fontes de infeção incluem soluções de continuidade infetadas, tetos lesionados, úberes infetados, abscessos e trato genital. A exposição ao agente ocorre através do contacto de tetos

lesionados com um ambiente contaminado, como a maternidade ou parque das vacas secas; ou através de vetores como as moscas (NMC, 1999b).

As IIM por este agente são mais frequentes em vacas secas e novilhas antes ou na altura do parto, e ocasionalmente em animais lactantes (NMC, 1999b).

Os sinais clínicos caracterizam-se por um edema marcado e aumento de consistência do úbere, febre, inaptência, taquicardia e depressão. O leite, inicialmente, aparece descolorado e com coágulos e evolui para uma secreção purulenta (Radostitis *et al*, 2007).

A resposta ao tratamento é fraca e o prognóstico é mau uma vez que, na maioria das vezes, o quarto não consegue recuperar a produção de leite devido aos danos irreversíveis (Radostitis *et al*, 2007).

3.6.4. Leveduras

As leveduras são agentes oportunistas caracterizando-se por crescer lentamente em agar-sangue e no esfregaço aparecerem como estruturas Gram-positivo de forma oval (Blowey & Edmonson, 2010).

Leveduras como *Candida spp.* e *Cryptococcus neoformans* são ubiqüitárias no ambiente e são sobretudo associadas a infeções de animais com camas de palha húmida ou animais estabulados que não se deitam em cubículos optando pelos corredores e outras zonas com elevados índices de humidade. A IIM por estes agentes também são comuns em ordenhas em que ocorra a lavagem dos tetos sem uma secagem posterior adequada (Blowey & Edmonson, 2010).

Clinicamente, as mastites manifestam-se por úberes duros, quentes e edemaciados e leite com a presença de pequenos coágulos brancos. Mastites por *Candida spp.* podem originar a presença de piréxia (Blowey & Edmonson, 2010).

O tratamento com anitibióticos é totalmente ineficaz. Soluções com iodo diluído, duas a três vezes por dia, são referidas por Radostitis *et al* (2007) como tendo bons resultados.

Geralmente, a infeção é auto-limitante e a cura espontânea pode ocorrer entre duas a seis semanas (Blowey & Edmonson, 2010).

3.6.5. *Prototheca spp.*

Prototheca é uma alga ubiqüitária, normalmente saprófita, cujo crescimento é de cerca de 48 horas em agar-sangue, aparecendo no esfregaço como estruturas Gram-positivo de forma arredondada.

Este agente oportunista vive no solo, água e outras áreas contaminadas com fezes e é responsável por mastites crónicas (Radostitis *et al*, 2007).

Prototheca trispora ou *Prototheca zopfi* são responsáveis por mastites clínicas com presença de grandes coágulos em leite com descoloração evidente e diminuição da produção (Radostitis *et al*, 2007).

O tratamento é ineficaz e animais afetados devem ser refugados (Radostitis *et al*, 2007).

3.7. Impacto económico das mastites

O impacto económico resultante da ocorrência de mastites resulta de duas origens: dos custos resultantes das perdas e dos custos resultantes do controlo.

Segundo Seegers *et al* (2003), os custos provenientes das perdas correspondem: à diminuição da produção de leite; às penalizações no preço do leite devido á alteração da sua composição e qualidade, tais como as alterações nos valores de proteína e gordura e o aumento da CCS, respetivamente; ao aumento da taxa de mortalidade e diminuição da longevidade, entre outras. Já os custos resultantes do controlo vão estar relacionados com uma maior necessidade de serviços médico-veterinários na exploração e aumento do consumo de medicamentos.

Aires (2010) citando Aires *et al* (2007) refere um modelo económico desenvolvido para calcular as perdas e custos resultantes da ocorrência de mastites em explorações leiteiras da região Entre-Douro e Minho, para o ano de 2005, utilizando um modelo desenvolvido na Segalab S.A. No modelo económico de estimativa de perdas e custos Segalab foram avaliados os seguintes parâmetros:

1. Custos e perdas com casos de mastites clínicas e subclínicas, considerando os custos com fármacos, mão-de-obra acrescida, perdas com o leite descartado durante o tratamento e intervalo de segurança;
2. Perdas com desvalorização do leite, avaliadas segundo a diferença do preço de pagamento, por litro, em função CCS;
3. Perdas com leite não produzido, incluindo o leite não produzido devido á ocorrência de mastites subclínicas e clínicas;
4. Perdas com refugos e mortes devidas a mastites, contabilizando os custos por cada animal que morre ou é refugado prematuramente devido a mastite;
5. Perdas com leite descartado, considera o leite descartado durante a ordenha com o intuito de controlar as CCS do tanque;
6. Perdas da lactação devido a casos clínicos, considerando os animais que desenvolveram mastite antes das cinco semanas de lactação e que, conseqüentemente, não alcançaram o pico da curva de lactação;
7. Custos com análises laboratoriais e/ou Programa da Qualidade do Leite.

Após a aplicação deste modelo de estudo a várias explorações, Aires (2010) citando Aires *et al* (2007) refere que o valor médio de perdas por vaca e por ano foi de 249€, e que relativamente a estudos de outros autores onde referem um valor de 208€/vaca/ano (Yalçin, 2000) e entre 100 a 216 €/vaca/ano (Gil *et al*, 1990), o valor calculado é significativamente mais elevado, mostrando que ainda há muito trabalho a fazer na problemática das mastites. O estudo conclui ainda que são as perdas com o refugo e morte de animais (27%), casos clínicos (23%) e

perdas de lactação (23%) que mais contribuíram para o total de custos e perdas resultantes de mastites, nas explorações analisadas.

4. Trabalho experimental

4.1. Introdução

As mastites continuam a ser a doença mais importante do ponto de vista económico nas explorações de leite, contabilizando 38% dos custos totais diretos das doenças produtivas (Kossaibati & Esslemont, 1997).

Este trabalho experimental tem como objetivo estudar os agentes ambientais isolados em mastites clínicas bovinas com visível descoloração do leite que ocorreram durante o período do estágio curricular, no Laboratório de Qualidade do Leite da Cooperativa Agrícola de Vila do Conde.

Pretende-se assim determinar se o aspeto das amostras pode estar relacionado com o agente isolado, a altura da lactação em que o agente provocou a IIM e verificar ainda se existe uma relação entre a ocorrência das mastites clínicas com o agravamento das condições climatéricas, nomeadamente a precipitação.

A escolha deste tema deve-se ao reconhecimento do papel que os agentes ambientais têm vindo a desempenhar na problemática das mastites, e tem o objetivo de demonstrar laboratorialmente que as comumente designadas mastites de aguadilha (mastites cujo leite apresenta uma descoloração) não resultam sempre no isolamento de agentes Gram-negativo, como se verificou ser uma crença junto dos produtores.

4.2. Materiais e Métodos

4.2.1. Amostragem

Os dados deste estudo são respeitantes a amostras de leite (n=83) de mastites clínicas com visível descoloração, provenientes de explorações de bovinos de leite da região Entre Douro e Minho, entre os meses de outubro de 2013 e fevereiro de 2014.

As amostras, colhidas asseticamente, deram entrada no Laboratório de Qualidade do Leite da Cooperativa Agrícola de Vila do Conde segundo duas formas: colhidas no seguimento da realização da prova de estábulo ou chamada para consulta com diagnóstico de mastite; ou entregues diretamente pelos produtores após deteção da mastite.

No momento da entrada no laboratório, todas as amostras foram classificadas em função do seu aspeto em “descoloração ligeira”, “descoloração moderada” e “descoloração severa” com presença ou ausência de farrapos; identificação do quarto afetado, da exploração e do animal; sempre que possível, registou-se ainda o número de DEL correspondente a cada amostra.

4.2.2. Identificação do agente infeccioso

Os procedimentos laboratoriais realizados para identificação dos agentes infecciosos em estudo decorreram de acordo com os procedimentos de rotina do laboratório.

De cada amostra foram retirados 10µL de leite com uma ansa calibrada e semeou-se, através do método de esgotamento por estria, em agar Columbia + 5% de sangue de ovelha (BioGerm®). Após a incubação a 37°C durante 24 horas, fez-se a primeira leitura e, caso houvesse crescimento era feita uma identificação presuntiva com recurso a esfregaço e coloração Gram, seguido de observação ao microscópio ótico e teste da catalase. Após a identificação presuntiva, as colónias eram semeadas em meios diferenciais segundo as suas características Gram, como se pode verificar no diagrama da figura 16. Após 24 horas de incubação, através da interpretação das alterações dos meios e presença ou ausência de crescimento, chegou-se à identificação final do agente. Em agentes cujas características geraram algumas dúvidas não permitindo uma identificação final, recorreu-se à utilização do API® (BioMérieux SA ®) *RAPID ID 32 STREP* e *RAPID 20 E*.

Cada agente identificado foi novamente repicado para agar Columbia + 5% de sangue de ovelha e transferido para uma solução de BHI + glicerol com posterior congelação.

4.2.3. Análise de dados

De modo a analisar-se toda a informação relativa a cada amostra, foi constituída uma base de dados onde foram inseridos os seguintes dados: número de amostra, número da exploração, identificação da vaca e quarto, agente identificado, testes complementares realizados, aspeto, DEL e data de entrada.

A constituição desta base permitiu a apresentação dos dados obtidos e relação do agente causal da mastite com o aspeto registado e DEL. O programa utilizado para este fim foi o Excel ® (Microsoft Office Professional Plus 2010).

4.3. Resultados

4.3.1. Agentes identificados

Na tabela 23 e gráfico 6 encontram-se referidos os agentes identificados resultantes das análises microbiológicas realizadas às amostras de leite mastítico em estudo.

Como é possível constatar, *E. coli* e *Streptococcus uberis* foram os agentes mais frequentemente isolados apresentando uma frequência relativa de 20,5% e 38,6%, respetivamente. Agentes como *Trueperella spp.* e *Klesiella spp.* representaram 6% das amostras, seguidos por *Staphylococcus aureus* com uma frequência relativa de 3,6% . Outros agentes foram isolados em apenas uma amostra, representando portanto, cada um, 1,2% de todas as amostras em estudo.

Amostras sem qualquer crescimento, identificadas na tabela como cultura negativa (CN) apresentaram uma frequência relativa de 10,8%.

Amostras identificadas como “Contaminadas” contabilizaram o crescimento de dois ou mais agentes diferentes, encontrando-se estas discriminadas na tabela 24.

Agentes identificados como “*Strep. spp*” e “Gram – “ , foram agentes cuja espécie não foi possível apurar através da realização de API®; por questões relacionadas com contenção de custos por parte do laboratório não foi possível voltar a repetir o teste.

Tabela 23 – Resultados das análises microbiológicas: agentes identificados por número de amostras e frequência relativa do seu isolamento

Agente identificado	Número de amostras (n)	Frequência relativa (%)
<i>E. coli</i>	17	20,5
<i>Strep. uberis</i>	32	38,6
<i>Trueperella pyogenes</i>	5	6,0
<i>Klebsiella spp</i>	5	6,0
<i>Enterococcus spp</i>	1	1,2
<i>Enterobacter spp</i>	1	1,2
LT	1	1,2
<i>Serratia spp</i>	1	1,2
<i>Pseudomonas spp</i>	1	1,2
<i>Staph. aureus</i>	3	3,6
<i>Strep dysgalactae</i>	1	1,2
<i>Strep. spp</i>	1	1,2
Gram -	1	1,2
CN	9	10,8
Contaminadas	4	4,8
TOTAL	83	100,0

LT – leveduras típicas; CN – cultura negativa

Tabela 24 – Agentes etiológicos identificados nas amostras consideradas “contaminadas”

Agentes identificados	Número de amostras (n)
SCN + <i>E. coli</i>	1
<i>Strep. spp</i> + SCN	1
<i>Strep. uberis</i> + SCN	1
<i>Strep. uberis</i> + SCN + <i>Staph. aureus</i>	1
TOTAL	4

SCN – *Staphylococcus* Coagulase Negativo

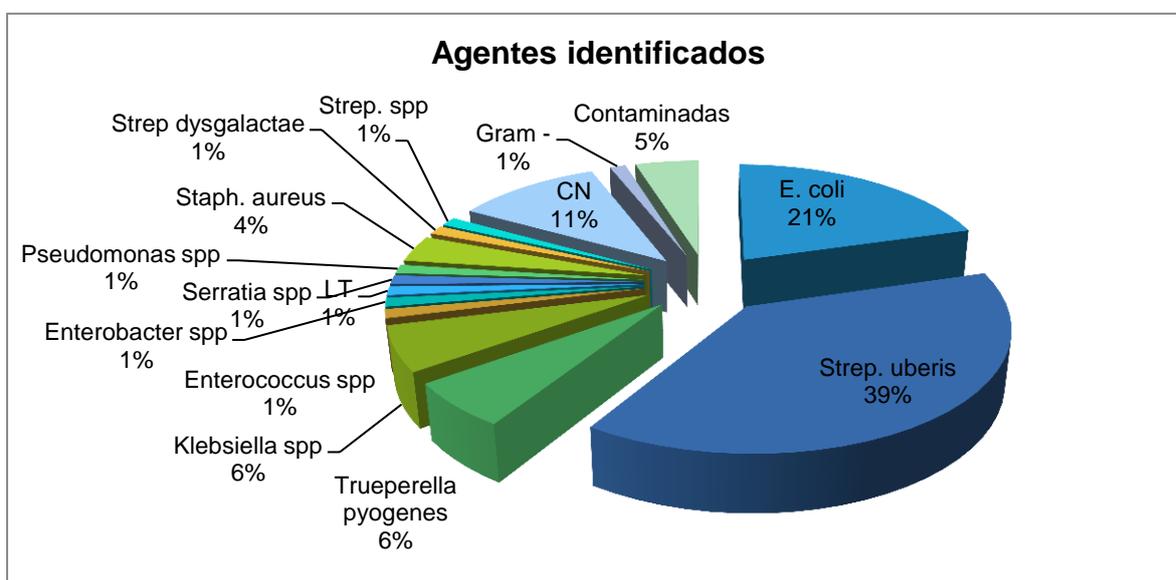


Gráfico 6 – Distribuição dos agentes etiológicos identificados nas 83 amostras em estudo

4.3.2. Relação do agente identificado com o aspeto da amostra

Todas as amostras de leite incluídas no estudo foram classificadas segundo o seu grau de descoloração e presença ou ausência de farrapos, de acordo com a figura 25.

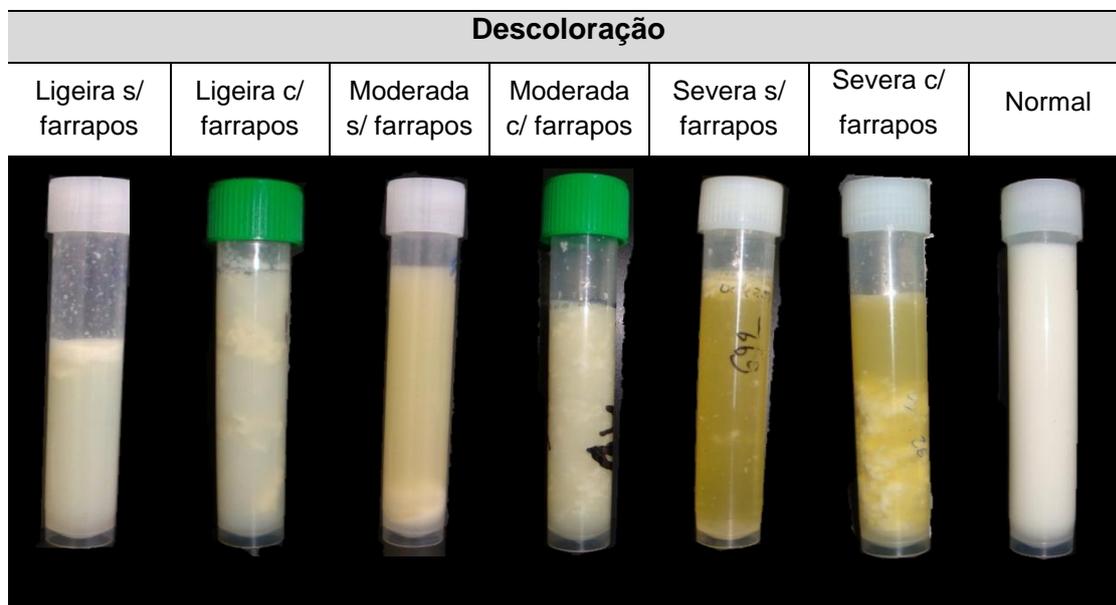


Figura 20 – Grupos constituídos para avaliação do aspeto de cada amostra segundo o grau de descoloração apresentada e a presença ou ausência de farrapos (escala idealizada para o estudo em questão, autoria da autora).

Na tabela 25 é possível estabelecer a ligação entre o aspeto da amostra e o agente etiológico isolado, assim como o número de amostras dentro de cada classificação, respetivas a um determinado agente etiológico. Ao analisar-se o gráfico 7 é possível constatar que *Streptococcus uberis* foi o agente que apresentou um maior número de amostras classificadas como “descoloração moderada com farrapos”.

Em relação aos agentes ambientais, verifica-se que as amostras nas quais foram identificados agentes gram-negativo apresentaram uma variação na classificação do seu aspeto, registando um número semelhante de amostras nos seis grupos constituídos. Por sua vez, amostras correspondentes os estreptococos ambientais apresentaram-se predominantemente como amostras com “descoloração moderada com farrapos”(gráfico 8).

Tabela 25 – Número de amostras segundo o agente etiológico isolado e classificação do seu aspeto

Agente isolado	Descoloração					
	Ligeira s/ farrapos	Ligeira c/ farrapos	Moderada s/ farrapos	Moderada c/ farrapos	Severa s/ farrapos	Severa c/ farrapos
<i>E. coli</i>	2	3	4	3	2	3
<i>Strep. uberis</i>	1	6	3	14	2	5
<i>Trueperella pyogenes</i>	1	1				2
<i>Klebsiella spp</i>	0	1	1		1	2
<i>Enterococcus spp</i>				1		
<i>Enterobacter spp</i>				1		
LT	1					
<i>Serratia spp</i>						1
<i>Pseudomonas spp</i>	1					
<i>Staph. aureus</i>	1			1		
<i>Strep dysgalactae</i>	1					
<i>Strep. spp</i>				1		
CN	4		2		3	
Gram -					1	

LT – leveduras típicas; CN – cultura negativa

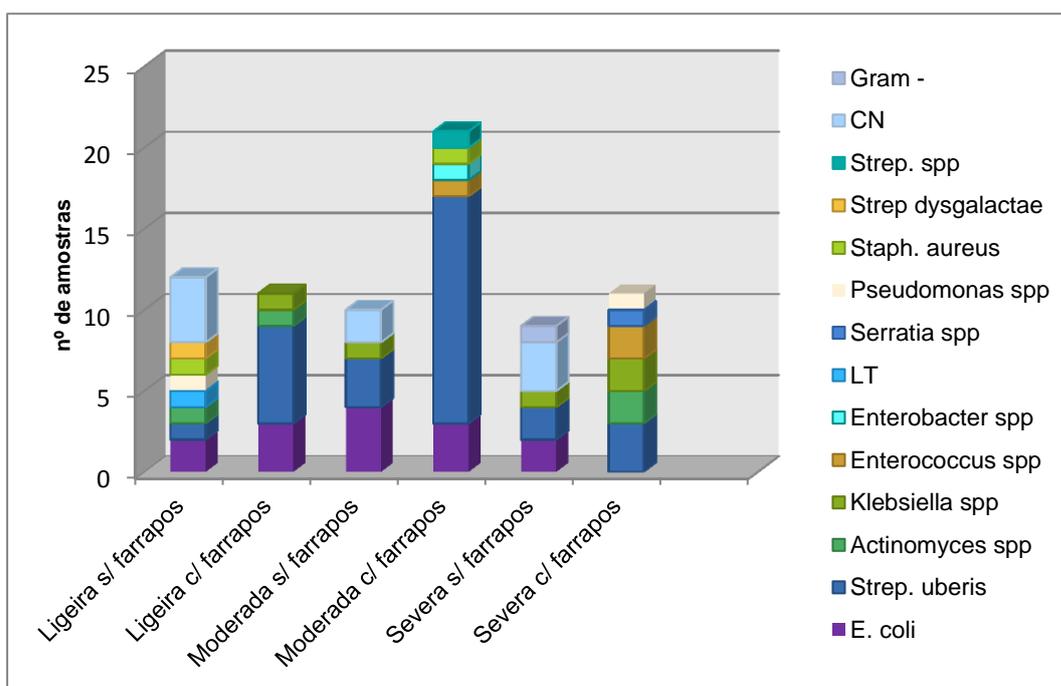


Gráfico 7 – Distribuição do número de agentes etiológicos isolados segundo o grau de descoloração da amostra

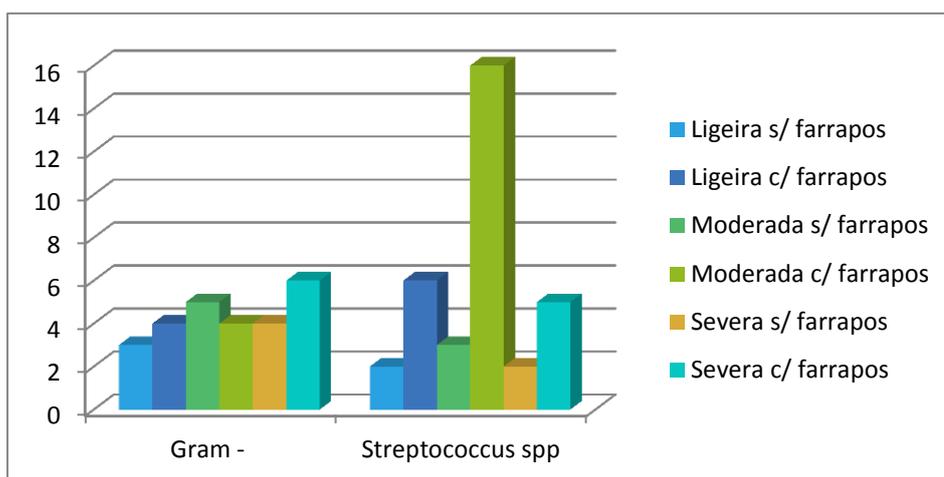


Gráfico 8 – Distribuição do número de amostras segundo a sua descoloração entre agentes gram – e estreptococos

4.3.3. Relação entre o agente identificado e os DEL

Na tabela 26 é apresentado o número de amostras analisadas e os respetivos DEL, relativo a cada um do grupo dos agentes ambientais em estudo: Gram – e estreptococos.

Aos 0 dias de lactação, foram registadas a ocorrência de duas mastites clínicas, cujas amostras revelaram como agentes etiológicos um agente Gram-negativo e um agente estreptococos. IIM com repercussão clínica durante os primeiros 45 dias da lactação registaram duas amostras onde se procedeu ao isolamento de agentes Gram-negativo, tendo sido ainda registadas três amostras cujos agentes se revelaram estreptococos. Entre os 45 e 100 dias de lactação entraram no laboratório quatro amostras relativas a agentes Gram-negativo e cinco amostras relativas a estreptococos ambientais. Por fim, das amostras de leite respeitantes a animais com mais de 100 DEL, sete revelaram-se IIM causadas por Gram-negativo, e treze por estreptococos ambientais.

Assim, 50 % das mastites clínicas por agentes Gram-negativo ocorreram até aos 100 dias de lactação, enquanto 55 % das mastites clínicas por agentes estreptococos ocorreram após os 100 dias.

Tabela 26 – Número de amostras segundo o grupo de agentes ambientais isolados (gram – e estreptococos) e a sua ocorrência durante a lactação

	Dias de lactação									
	0		<45		45-100		>100		TOTAL	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Gram -	1	7	2	14	4	29	7	50	14	100
Estreptococos	1	5	3	15	5	25	13	55	22	100

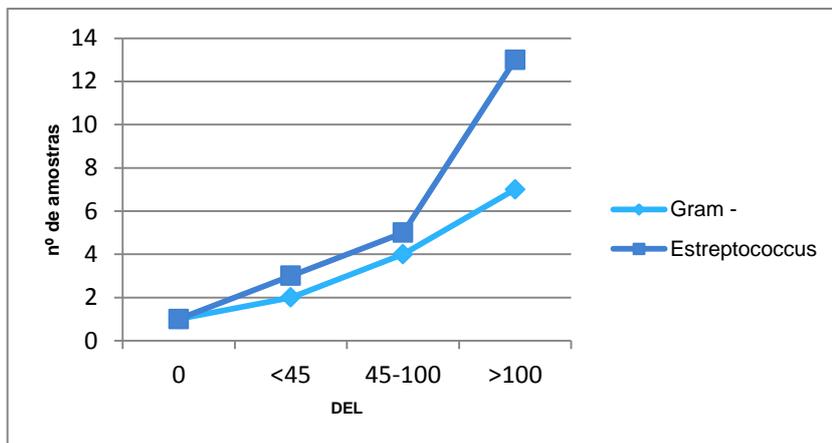


Gráfico 9 – Ocorrência de mastites clínicas ao longo da lactação por agentes gram – e estreptococos ambientais.

4.3.4. Relação entre o aparecimento de mastites clínicas e as condições climatéricas

De modo a verificar-se se as condições climatéricas, nomeadamente a precipitação, têm influência no aparecimento de mastites clínicas provocadas por agentes ambientais, contabilizou-se o total da precipitação (mm) verificada na estação meteorológica mais próxima do concelho de Vila do Conde (Porto/S. Pilar – de outubro de 2013 a dezembro de 2013; Viana do Castelo – de janeiro de 2014 a fevereiro de 2014) por mês e o número de casos decorridos nesse período de tempo.

No gráfico 9 é possível constatar um aumento de casos de mastites clínicas quando se verifica a ocorrência de meses mais chuvosos.

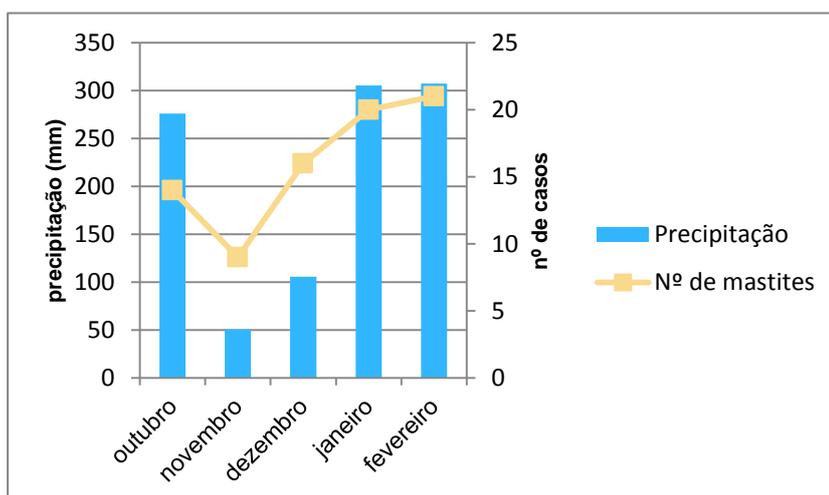


Gráfico 10 – Relação entre a precipitação mensal (dados obtidos em www.ipma.pt) e o número de mastites clínicas verificadas nesse período de tempo.

4.4. Discussão dos resultados

4.4.1. Agentes identificados

Todas as 83 amostras provenientes de mastites clínicas foram submetidas a análises microbiológicas com o objetivo de determinar a etiologia da IIM.

Ao longo das últimas décadas vários estudos têm sido publicados sobre a etiologia das mastites clínicas bovinas.

No presente estudo *Streptococcus uberis* foi isolado em maior número comparativamente a *Escherichia coli*.

Num estudo realizado em explorações de leite no Reino Unido foram colhidas 480 amostras de mastites clínicas e os agentes causais foram isolados. Este estudo, efetuado por Bradley *et al* (2007) refere o isolamento de culturas puras de *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* em 23-5% e 19-8% das amostras, respetivamente, e 26-5% não apresentaram crescimento.

Bradley *et al* (2007) fazem um pequeno resumo retrospectivo desses estudos: citando Wilesmith *et al* (1986) referem que 47% das mastites clínicas foram causadas por *Escherichia coli* ou *Streptococcus uberis*; já Bradley & Green (2001) reportaram que 61% das mastites clínicas analisadas foram causadas por agentes ambientais e desses, *Escherichia coli* foi o agente mais comum; referindo ainda Milne *et al* (2002) reportam que os agentes ambientais contabilizaram 60% das mastites clínicas.

Na tabela 27 é possível fazer uma análise comparativa dos resultados obtidos por Bradley *et al* (2007) e os obtidos no presente estudo.

Analisando os resultados obtidos, verifica-se que estes traduzem uma situação semelhante ao que é referido na bibliografia, em relação aos principais agentes ambientais isolados (*Streptococcus uberis* e *Escherichia coli*). *Streptococcus uberis* é o agente que contabilizou maior número de amostras nos dois estudos, no entanto aparece com uma maior percentagem no presente trabalho experimental. *Escherichia coli* verifica-se com uma frequência relativa muito semelhante em ambos os trabalhos.

Outros agentes ambientais, como *Klebsiella spp* e *Trueperella pyogenes* foram isolados num maior número de amostras comparativamente ao estudo de Bradley *et al* (2007).

Tabela 27 – Comparação entre os resultados obtidos no presente trabalho experimental e os resultados referidos pela bibliografia

Agente identificado	Trabalho experimental		Bradley <i>et al</i> (2007)	
	Número de amostras (n)	Frequência relativa (%)	Número de amostras (n)	Frequência relativa (%)
<i>Strep. uberis</i>	32	38,6	113	23,5
<i>E. coli</i>	17	20,5	95	19,8
<i>Trueperella pyogenes</i>	5	6,0	1	0,2
<i>Klebsiella spp</i>	5	6,0	1	0,2
<i>Staph. aureus</i>	3	3,6	16	3,3
<i>Enterococcus spp</i>	1	1,2	-	-
<i>Enterobacter spp</i>	1	1,2	1	0,2
LT	1	1,2	5	1,0
<i>Serratia spp</i>	1	1,2	1	0,2
<i>Pseudomonas spp</i>	1	1,2	-	-
<i>Strep dysgalactae</i>	1	1,2	7	1,5
<i>Strep. spp</i>	1	1,2	2	0,4
Gram -	1	1,2	-	-
<i>Staphylococci coagulase positivos</i>	-	-	22	4,6
<i>Bacillus spp</i>	-	-	7	1,5
<i>Proteus spp</i>	-	-	4	0,8
<i>Lactococcus spp</i>	-	-	1	0,2
<i>Pasteurella spp</i>	-	-	1	0,2
SCN	-	-	39	8,2
<i>Corynebacterium spp</i>	-	-	17	3,5
CN	9	10,8	127	26,5
Contaminadas	4	4,8	20	4,2
TOTAL	83	100,0	480	100

LT – leveduras típicas; CN – cultura negativa; SCN – *Staphylococcus coagulase* negativo

4.4.2. Relação do agente identificado com o aspeto da amostra

A classificação do aspeto das amostras no momento da sua entrada no laboratório, permitiu inferir se o agente isolado afeta de algum modo o aspeto da secreção mamária.

A ideia de que mastites cuja secreção apresente uma descoloração evidente, geralmente designadas por mastites de aguadilha, são provocadas por agentes Gram-negativo, está bastante disseminada e enraizada entre os produtores. Assim, é muito comum, sobretudo se este tipo de mastites ocorrer algumas semanas após o parto, os produtores aplicarem um tratamento dirigido a agentes Gram-negativos por iniciativa própria.

O que é possível observar nos resultados obtidos na classificação do aspeto das amostras segundo o agente isolado é que, agentes Gram-negativo apresentam uma classificação muito

variada, sendo isolados de um número de amostras muito semelhantes das várias amostras de leite relativas a classes de descoloração e presença ou ausência de farrapos.

Em relação aos estreptococos ambientais foi possível verificar que 47% destas amostras apresentaram uma descoloração moderada com presença de farrapos. Este tipo de apresentação surge de acordo com o que também é referido por Blowey & Edmonson (2010), em leite de onde foram isolados estreptococos ambientais.

O já referido hábito dos produtores procederem a um tratamento direcionado para gram-negativo neste tipo de situações. Visto que há uma resposta da IIM ao tratamento, decidem então solicitar uma análise microbiológica com o objetivo de identificar o agente em causa.

Quanto ao aspeto do leite pode representar uma possível explicação para o elevado número de amostras de *Streptococcus uberis* verificado no presente trabalho experimental.

4.4.2. Relação entre o agente identificado e os DEL

De modo a estudar-se a incidência de IIM devido a agentes ambientais ao longo da lactação, sempre que possível procedeu-se ao registo dos DEL do animal respeitante a cada amostra.

Foi neste trabalho possível constatar que a tendência da ocorrência de mastites por agentes ambientais aumenta com o número de dias em leite, isto é, à medida que a lactação avança verifica-se um maior número de IIM com manifestação clínica e isolamento de agentes ambientais.

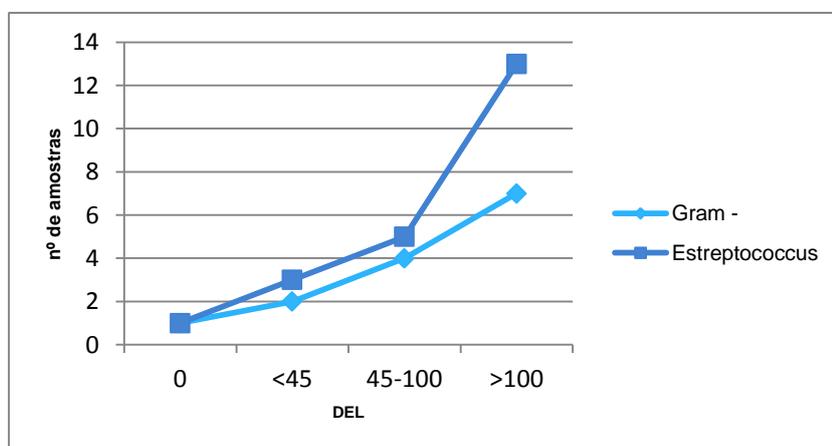


Gráfico 11 – Ocorrência de mastites clínicas ao longo da lactação por agentes gram – e estreptococos ambientais.

Pelo contrário, Hogan & Smith (2003) referem uma elevada incidência de IIM por agentes coliformes nas duas semanas após a secagem com repercussão no início da lactação, e ainda que a taxa de infeções durante a lactação é maior ao parto e depois diminui à medida que o DEL avançam.

O aumento da taxa de IIM por agentes Gram-negativo aumentou à medida que lactação avançou.

Como já foi referido anteriormente, pode dever-se à possibilidade de *Escherichia coli* apresentar uma capacidade adaptativa o que vai resultar num aumento da frequência de mastites crónicas como foi referido por Bradley & Green (2001) em várias explorações.

Em relação aos estreptococos ambientais verifica-se um aumento significativo das IIM por estes agentes a partir dos 45-100 DEL.

A bibliografia refere que a incidência de mastites clínicas é maior na primeira semana após o parto e decresce durante os primeiros 305 dias em leite (Hogan & Smith, 2003).

Uma justificação possível é que, segundo Hogan & Smith (2003), a taxa de casos clínicos por estreptococos ambientais é mais elevada em vacas com lactações alongadas (>305 dias) comparativamente a vacas no pico da lactação. Assim, efetivos com uma elevada percentagem de animais com uma lactação superior a 305 dias parecem ter uma maior prevalência de IIM por estes agentes. Esta situação leva a crer que o desenvolvimento de infeções crónicas permita que o agente deixe de ser um agente ambiental para se tornar um agente com características de agente contagioso (Kromker, 2014).

No entanto, devido à falta de registos por parte dos produtores, várias amostras que entraram no estudo não puderam contribuir para o estudo da relação entre o agente identificado e os DEL, o que pode ter influenciado os resultados apresentados.

4.4.3. Relação entre o aparecimento de mastites clínicas e as condições climatéricas

Através da contabilização do total de precipitação (mm) verificada na estação meteorológica mais próxima do concelho de Vila do Conde e do número de mastites clínicas ocorridas mensalmente, verificou-se que, de facto, nos meses de maior precipitação ocorreram mais casos de IIM com manifestação clínica.

Num concelho onde na maioria das explorações os animais têm acesso a parques exteriores independentemente do clima (figura 26), onde a conspurcação fecal é uma constante e sobrepopulação obriga ao decúbito dos animais nestes locais; é de esperar que a incidência de IIM aumentem com a presença de más condições climatéricas.

Barnouin & Chassagne (1988) refere que a ocorrência de mastites clínicas está associada à presença simultânea de condições desfavoráveis de higiene e más condições climatéricas.

Morse *et al* (1988) referem ainda que a humidade associada à temperatura é o principal fator climático que influencia o aumento da incidência de mastites.



Figura 21 – Parque exterior onde é possível visualizar a elevada conspurcação fecal e humidade presente. Esta foto foi captada logo após o final da ordenha (foto original)

4.5. Conclusão

Ao contrário do que é assumido pelos produtores, verificou-se que as mastites de aguadilha não significam sempre o isolamento de agentes Gram-negativo, verificando-se até um maior número de amostras cujos agentes causais foram os estreptococos ambientais.

Assim, há uma constante utilização de antimicrobianos de forma inadequada o que agrava a pressão de seleção sob as estirpes resistentes a estes fármacos.

4.6. Conclusão geral

As mastites bovinas permanecem uma doença complexa sendo um verdadeiro desafio quer para produtores, quer para os médicos-veterinários.

É necessário procurar novos métodos e estratégias de controlo para fazer face ao facto, cada vez mais evidente, de os agentes ambientais possuírem uma capacidade adaptativa à glândula mamária.

Há ainda muito trabalho a desenvolver junto dos produtores, nomeadamente na sensibilização para a importância das análises microbiológicas como um meio para o sucesso terapêutico, papel do uso indiscriminado de antibióticos nas resistências bacterianas e importância dos registos relacionados com as mastites, quer ao nível da identificação das vacas afetadas, quer ao nível do tratamento administrado.

É ainda fundamental elucidar tanto os produtores como os ordenhadores sobre os comportamentos de risco e importância do maneio baseado na higiene.

5. Bibliografia

Aires, A (2010). Mastites em Bovinos : caracterização etiológica , padrões de sensibilidade e implementação de programas de qualidade do leite em explorações do Entre-Douro e Minho. Dissertação de Mestrado, *Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa*, Portugal;

Almeida R, Luther D, Patel D & Oliver, S. P. (2011) Predicted antigenic regions of *Streptococcus uberis* adhesion molecule (SUAM) are involved in adherence to and internalization into mammary epithelial cells. *Veterinary Microbiology*, 148(2-4): 323–8.

Barkema H, Schukken Y, Lam T, Beiboer M, Benedictus G, & Brand (1999) Management practices associated with the incidence rate of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 82(8): 1643–54;

Barkema H, Schukken Y & Zadoks R (2006) The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science*, 89(6): 1877-1895;

Bannerman D, Chockalingam A, Paape M & Hope J (2005) The bovine innate immune response during experimentally-induced *Pseudomonas aeruginosa* mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 107(3-4): 201–15;

Bannerman D, Paape M, Goff J, Kimura K, Lippolis J & Hope J (2004) Innate immune response to intramammary infection with *Serratia marcescens* and *Streptococcus uberis*, *Vet Res* 35: 681–700;

Barnouin & Chassagne (1997) Factors associated with clinical mastitis incidence in French dairy herds during late gestation and early lactation. *Vet Res*. 29: 159-171;

Blowey R (1999) *A Veterinary Book for Dairy Farmers (3ª edição)*. Farming Press Books, Reino Unido. ISBN-13: 978-0852364994;

Blowey R & Edmondson P (2010) *Mastitis control in dairy herds (2ª edição)*. Farming Press Books, Reino Unido. ISBN–13: 978-1-84593-550-4;

Bradley J (2002) Bovine Mastitis: An Evolving Disease. *The Veterinary Journal*, 164(2): 116–128;

Bradley J & Green M (2001). Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 1845-9;

Bradley J, Leach K, Breen J, Green L & Green M (2007) Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales, (January 2005) *Veterinary Record* 160: 253-258;

Broaddus B, Vries A (2005) A Comparison of Methods for Early Pregnancy Diagnosis. *Proceedings 2nd Florida Dairy Road Show*;

Burvenich J, Detilleux M, Paape & Massart-Leen A (2000) Physiological and genetic factors that influence the cows resistance to mastitis, especially during early lactation. *Proc. IDF Symp. on Immunology of Ruminant Mammary Gland*, Stresa, Itália, pp. 9-20;

Burvenich C, Van Merris V, Merhrzad J, Diez-Fraile A & Duchateau L (2003) Severity of E . coli mastitis is mainly determined by cow factors, *Vet. Res.* 34, 521–564;

Cavalieri J, Hepworth G, Fitzpatrick A, Shephard W.& Macmillan L (2006) Manipulation and control of the estrous cycle in pasture-based dairy cows. *Theriogenology*, 65: 45-64;

Calvinho L, Almeida R & Oliver S (1998) Potential virulence factors of Streptococcus dysgalactiae associated with bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 61(1-2): 93–110;

Costa O, Melville P & Ribeiro A (1996) Prevalence of intramammary infections in primigravid Brazilian dairy heifers. *Prev. Vet. Med.* 29:151–155;

Costerton J, Stewart P & Greenberg E (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 284: 1318-1322;

Davidson A & Stabenfeldt G (2007) Reproduction and Lactation *In: J. G. Cunningham & B. G. Klein Textbook of Veterinary Physiology* (4ª edição. p 501-517) St. Louis: Elsevier Saunders, ISBN: 978-1-4160-3610-4;

De Vliegher S, Fox L, Piepers,S, McDougall S & Barkema H (2012) Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *Journal of Dairy Science*, 95(3): 1025–40

Dohoo I (2001) Setting SCC cutpoints for cow and herd interpretation. *National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings*, pp. 10-18;

Dohoo I & Meek H (1982). Somatic cell counts in bovine milk. *The Canadian Veterinary Journal. La Revue Vétérinaire Canadienne*, 23(4): 119–25;

Dopfer D, Barkema H, Lam T, Schukken Y & Gaastra W (1999). Recurrent clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 82, 80-85;

Douglas V, Fenwick S, Pfeiffer D, Williamson N & Holmes C (2000) Genomic typing of *Streptococcus uberis* isolates from cases of mastitis, in New Zealand dairy cows, using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 75:27–41;

Field T, Ward P, Pedersen L & Leigh J (2003). The hyaluronic acid capsule of *Streptococcus uberis* is not required for the development of infection and clinical mastitis, *Vet. Res.* 71(1), 132–139;

Galey D, Terra R, Walker R, Adaska J, Etchebarne A, Puschner B, Fisher E, Whitlock H, Rocke, Willoughby D, Tor E (2000). Type C botulism in dairy cattle from feed contaminated with a dead cat. *Journal of Veterinary Diagnostic*, 12:204-209;

Garverick H (1997). Ovarian follicular cysts in dairy cows. *Journal of dairy science*, 80;

George L, Divers T, Ducharme N & Welcome F (2007) Diseases of the Teats and Udder in *Rebhun's diseases of dairy cattle*, 2ª edição, Elsevier Health Sciences, Estados Unidos da América, ISBN-13: 978-1-4160-3137-6;

Harmon R (2001) *National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings* 2001 3, 3–9.

Harmon R (1994) Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, 77(7), 2103–12;

Hillman R & Gilbert R (2007) Reproductive diseases in *Rebhun's diseases of dairy cattle*, 2ª edição, Elsevier Health Sciences, Estados Unidos da América, ISBN-13: 978-1-4160-3137-6;

Hoeben D, Monfardini E, Opsomer G, Burvenich C, Dosogne H, De KA & Beckers JF (2000) Chemiluminescence of bovine polymorphonuclear leucocytes during the periparturient period and relation with metabolic markers and bovine pregnancy-associated glycoprotein. *J Dairy Res* 67, 249–259;

Hogan J & Smith K (2003) Coliform mastitis, *Vet. Res.* 34: 507–519;

Horowitz M & Silverstein S (1980). Influence of the *Escherichia coli* capsule on complement fixation and on phagocytosis and killing by human phagocytes. *Journal of Clinical Investigation* 65, 82–94;

Huszenicza G, Janosi S, Gaspard A, Kulcsar M (2004) Endocrine aspects in pathogenesis of mastitis in postpartum dairy cows. *Anim Reprod Sci* 82–83, 389–400;

- King B & Wilkinson B (1981). Binding of human immunoglobulin to protein A in encapsulated *Staphylococcus aureus*. *Infection & Immunity* 33, 666–72;
- Kossaibati M & Esselmont R (1997). The costs of production diseases in dairy herds in England. *The Veterinary Journal* 154, 41–51;
- Krawczel P & Grant R (2009) Effects of Cow Comfort on Milk Quality, Productivity and Behavior. *National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings 2009* 15–24;
- Kromker V (2014). Bovine *Streptococcus uberis* Intramammary Infections and Mastitis. *Clinical Microbiology: Open Access*, 03:04;
- Jones G (2009) The Role of Milking Equipment in Mastitis. *Virginia Tech*, Estados Unidos da América, www.ext.vt.edu acessado a 27/07/2014;
- Jørstad, A., Farver, T.B. and Riemann, H. 1989. Teat canal diameter and other cow factors with possible influence on somatic cell counts in cow milk. *Acta vet. Scand.* 30:pp 239-245;
- Laboratory for Udder Health, Minnesota Veterinary Diagnostic Laboratory, University of Minnesota (2011) Interpretation and Use of Laboratory Culture Results and the Characteristics of Various Mastitis Pathogens. Universidade do Minnesota http://qualitycounts.umn.edu/prod/groups/cfans/%40pub/%40cfans/%40qualitycounts/documents/asset/cfans_asset_421223.pdf, acessado a 12/01/2014;
- Lahunta A & Divers T (2007) Neurologic Diseases in *Rebhun's diseases of dairy cattle*, 2ª edição, Elsevier Health Sciences, Estados Unidos da América, ISBN-13: 978-1-4160-3137-6;
- Lane A, Austin J & Crowe A (2008). Oestrous synchronization in cattle – Current options following the EU regulations restricting use of oestrogenic compounds in food-producing animals: A review. *Animal Reproductive Science*, 109: 1-16;
- Laughton K, Fisher K, Halina W & Partlow G (2005) Schistosomus Reflexus Syndrome: a Heritable Defect in Ruminants, *Ana. Histol: Embryol.* 34: 312-318;
- Leigh J (1999) *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis? *Veterinary Journal* 157(3): 225–38;
- Leslie K, Duffield T, Sandals D & Robinson E (2001) The influence of negative energy balance on udder health. *Proceedings of the 2nd International Symposium on Mastitis and Milk Quality*, Vancouver, Canada, pp. 195–199;

- Lipman L, De Nijs A, Lam T & Gaastra W (1995) Identification of *Escherichia coli* strains from cows with clinical mastitis by serotyping and DNA polymorphism patterns with rep and eric primers. *Veterinary Microbiology* 43: 13-9;
- Lopez-Benavides M, Williamson J, Pullinger G, Lacy-Hulbert S, Cursons R & Leigh J (2007) Field observations on the variation of *Streptococcus uberis* populations in pasture-based dairy farm. *Journal of Dairy Science*, 90(12): 5558–66;
- Lucy C, McDougall S & Nation P (2004).The use of hormonal treatments to improve the reproduction performance of lactating dairy cows in feedlot or pastures based management systems. *Animal Reproductive Science*, 82-83: 495-512;
- Maroney M (2005) Milk Money Fact Sheet 02: *Streptococcus agalactiae*. University of Wisconsin-Madison, <http://milkquality.wisc.edu/programs/milk-money/> , acedido a 25/03/2014;
- Maunsell F, Woolums A, Francoz D, Rosenbusch R, Step D, Wilson D, & Janzen D (2011) *Mycoplasma bovis* Infections in Cattle. *J Vet Intern Med* 25: 772–783;
- Meeusen E, Walker J, Peters A, Pastoret P & Jungersen G (2007) Current Status of Veterinary Vaccines. *Clinical Microbiology Reviews*, vol 20: 489-510;
- Menzies F, Bryson D, McCallion T & Matthews D (1995) A study of mortality among suckler and dairy cows in Northern Ireland in 1992, *Vet. Rec.* 137: 531–536;
- Metre D, Tennant D & Whitlock R (2007) Infectious Diseases of the Gastrointestinal Tract in *Rebhun's diseases of dairy cattle*, 2ªedição, Elsevier Health Sciences, Estados Unidos da América, ISBN-13: 978-1-4160-3137-6;
- Moore G (2009) Biofilm Production by *Streptococcus uberis* Associated with Intramammary Infections. *University of Tennessee Honors Thesis Projects*;
- Morse D, DeLorenzo M, Wilcox C (1988) Climatic effects on occurrence of clinical mastitis. *J Dairy Sci* 71:848-53;
- Nash D, Rogers G, Cooper J, Hargrove G, Keown J & Hansen L (2000) Heritability of clinical mastitis incidence and relationships with sire transmitting abilities for somatic cell score, udder type traits, productive life, and protein yield. *Journal of Dairy Science*, 83(10): 2350–60;
- National Mastitis Council (1996) Current Concepts of Bovine Mastitis, 4th ed., Madison, WI, Estados Unidos da América, www.nmc.com acedido a 04/05/2014;

National Mastitis Council (1999a) Mastitis Pathogen Notes: *Corynebacterium bovis* <http://www.nmconline.org/articles/cbovisnotes.htm>, aceso a 02/04/2014;

National Mastitis Council (1999b) Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis pg. 139., www.nmconline.org/articles/arcanobnotes.htm;

National Mastitis Council (2001) Recommend Mastitis Control Program, www.nmconline.org/docs/NMCchecklistInt.pdf, aceso a 20/07/2014;

Nickerson S & Akers R (2002) Anatomy, growth, development, involution. *Mammary gland / anatomy*, Elsevier Science Ltd, pp. 1680-1689;

Noakes D, Parkinson T & England G, (2001) Pregnancy and Parturition in Arthur's veterinary reproduction and obstetrics, 8ª edição, Saunders, Londres, Inglaterra, ISBN: 978-0-7020-2556-3

Oliver S, Gillespie B & Jayarao B (1998) Detection of new and persistent *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* intramammary infections by polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *FEMS Microbiology Letters*, 160(1): 69–73;

Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcón J, Cajero-Juárez M, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza J, Bravo-Patiño A & Baizabal-Aguirre V (2007) Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *The Journal of Infection*, 54(4):399–409;

Owens W, Ray C, Watts J & Yancey R(1997) Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 80(2): 313–7;

Paape M, Mehrzad J, Zhao X, Detilleux J & Burvenich C (2003) Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7(2): 109–21;

Pedersen L, Aalbæk B, Røntved C, Ingvarsen K, Sorensen N, Heegaard P & Jensen H (2003) Early Pathogenesis and Inflammatory Response in Experimental Bovine Mastitis Due to *Streptococcus uberis*. *Journal of Comparative Pathology*, 128(2-3): 156–164;

Petersson-wolfe C (2012). *Streptococcus dysgalactiae*: A Practical Summary for Controlling Mastitis. *Virginia Cooperative Extension* em www.ext.vt.edu, aceso a 25/03/2014;

Piessens V, Van Coillie E, Verbist B, Supré K, Braem G, Van Nuffel & De Vliegher S (2011) Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. *Journal of Dairy Science*, 94(6): 2933–44;

Prenafeta A, March R, Foix A, Casals I & Costa L (2010) Study of the humoral immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilm-embedded bacterin in dairy cows: possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced mastitis. *Vet. Immun. Immunopathol.* 134:208-217;

Pyörälä S (2008) Mastitis in post-partum dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals* 43: 252–9;

Pyörälä S & Taponen S (2009) Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*, 134(1-2): 3–8;

Quinn P, Carter M, Markey, B & Carter, G (1999) *Clinical Veterinary Microbiology*, Mosby, Elsevier, Londres, Inglaterra;

Rabiee A, Lean J & Stevenson A (2005). Efficacy of Ovsynch program on reproductive performance in dairy cattle: a meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 88: 2754-2770;

Radostits O, Gay C, Hinchcliff K, Constable P, (2007) *Veterinary Medicine, A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*, 8ªedição, Saunders, Elsevier Company, Estados Unidos da América, ISBN – 13: 978-0702027772;

Rainard P & Riollot C (2006). Review article Innate immunity of the bovine mammary gland, *Vet Res* 37: 369–400;

Rambeaud M, Almeida R, Pighetti G & Oliver S (2003) Dynamics of leukocytes and cytokines during experimentally induced *Streptococcus uberis* mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 96(3-4): 193–205;

Rato M, Bexiga R, Nunes S, Cavaco L, Vilela C & Santos-Sanches I (2008) Molecular epidemiology and population structure of bovine *Streptococcus uberis*. *Journal of Dairy Science*, 91(12): 4542–51;

Ribeiro M, Motta R, Paes A, Allendorf S, Salerno T, Siqueiro A, Fernandes M & Lara G (2008). Peracute bovine mastitis caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootécnica*, 60: 485-488;

Roberson J, Fox L, Hancock D, Gay J & Besser T (1998) Sources of intramammary infections from *Staphylococcus aureus* in dairy heifers at first parturition. *Journal of Dairy Science* 81(3): 687–93;

Santos A (2008) Comparação entre os meios de cultura baird-parker, bairdparker – rpf e petrifilmtm staph express na detecção de *Staphylococcus coagulase* positivo em leite cru

naturalmente Contaminado e em leite esterilizado inoculado com culturas específicas. Dissertação de Mestrado, *Escola de Veterinária da UFMG*, Minas Gerais, Brasil;

Schukken Y, Chuff M, Moroni P, Gurjar A, Santisteban C, Welcome F & Zadoks R (2012). The “other” gram-negative bacteria in mastitis: *Klebsiella*, *serratia*, and more. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 28(2): 239–56;

Schukken Y, González R, Tikofsky L, Schulte H, Santisteban C, Welcome F & Zadoks R (2009) CNS mastitis: nothing to worry about? *Veterinary Microbiology* 134(1-2): 9–14;

Schultze W & Bright S (1983) Changes in penetrability of bovine papillary duct to endotoxin after milking. *Am J Vet Res*;44(12):2373-5;

Seegers H, Fourichon C & Beaudeau F (2003) Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Rs.* 34: 475–491;

Sheldon I, Williams E, Miller A, Nash D & Herath S, (2008) Uterine diseases in cattle after parturition. *The Veterinary Journal*, 176: 115-121;

Silke V, Diskin M, Kenny D, Boland M, Dillon P, Mee J, & Sreenan M (2002) Extent, pattern and factors associated with late embryonic loss in dairy cows. *Animal Reproduction Science* 71-1: 1-12;

Smith K & Hogan J (2001) The world of mastitis. *Proceedings of the 2nd International Symposium on Mastitis and Milk Quality*, pp. 1 in www.nmconline.org/articles/wrldmast.htm, acedido a 22/04/2014

Smith K, Todhunter D & Schoenberger P (1985) Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. *Journal of Dairy Science* 68(6): 1531–53;

Soares, J. M., Mendes, A., Diniz, E., Magalhães, F. (2007). *Estratégia Nacional para os Efluentes Agro-Pecuários e Agro-Industriais. Ministério do Ambiente e Ordenamento do Território e Desenvolvimento Regional*, Lisboa, pp. 45-150;

Sordillo L (2009). Current Concepts on Immunity and Mastitis, *Vet. Res.* 21 : 111–119.

Sordillo L & Streicher K (2002) Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 7(2): 135–46;

Stilwell G (2013) *Clínica de bovinos*, Edição especial para a Bayer, Publicações Ciência e Vida, Lisboa, Portugal, ISBN: 978-972-590-092-5;

- Tizard I (2009) *Introducción a la Inmunología*, 8ªedición, Elsevier Saunders, Barcelona, Espanha, ISBN: 978-84-8086-431-2
- Todhunter D, Smith K & Hogan J (1991) *Serratia* species isolated from bovine intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, 74(6): 1860–5;
- Todhunter D, Smith K & Hogan J (1995) Environmental streptococcal intramammary infections of the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 78(11): 2366–74;
- Veerkamp R & Haas Y (2005) Genetic improvement in mastitis control programmes. Hogeveen H (2005) in *Mastitis in dairy production: current knowledge and future solutions*, Wageningen Academic Pub, Holanda, pp 115, ISBN: 978-90-76998-70-1;
- Waldner D, Kirkpatrick J & Lehenbauer T (2014) Recommended Vaccination Schedules for a Comprehensive Dairy Herd Health Program. Universidade do Estado de Oklahoma www.pods.dasnr.okstate.edu, acedido a 07/07/2014;
- Watt C (1997) The duration of *streptococcus uberis* intramammary infections. In: *The Proceedings of the the British mastitis Conference*, Stoneleigh. Institute of Animal Health, Compton. pp. 24±9;
- Watts J, (1988) Etiological agents of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 16(1), 41–66;
- White D & McDermott P (2001) Emergence and transfer of antibiotic resistance. *Journal of Dairy Science* 84 (E. Suppl.), E151–E155;
- Wilson D, Mallard B, Burton J, Schukken Y & Grohn Y (2009) Association of Escherichia coli J5-Specific Serum Antibody Responses with Clinical Mastitis Outcome for J5 Vaccinate and Control Dairy Cattle. *Clinical And Vaccine Immunology*. 16: 209-217
- Zehner M, Farnsworth R, Appleman R, Larntz K & Springer J (1986) Growth of environmental mastitis pathogens in various bedding materials. *Journal of Dairy Science*, 69(7): 1932–41;
- Zerbe H, Schneider N, Leibold W, Wensing T, Kruij T & Schuberth H (2000) Altered functional and immunophenotypic properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated with fatty liver. *Theriogenology* 54: 771–786;
- Zhao X & Lacasse P (2008) Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *Journal of Animal Science*, 86(13 Suppl): 57–65;