



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Clínica e Cirurgia em bovinos de aptidão leiteira

Fatores de risco associados à prevalência de *Staphylococcus* spp. e coliformes
no leite do tanque de explorações da Ilha de São Miguel, Açores

DIANA ISABEL FERREIRA PACHECO

Orientação:

Dr. Ricardo Jorge da Costa Trindade Palmeiro Romão

Dr.^a Luísa Margarida Azevedo Soares

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Relatório de Estágio

Évora, 2015



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Clínica e Cirurgia em bovinos de aptidão leiteira

Fatores de risco associados à prevalência de *Staphylococcus* spp. e coliformes
no leite do tanque de explorações da Ilha de São Miguel, Açores

DIANA ISABEL FERREIRA PACHECO

Orientação:

Dr. Ricardo Jorge da Costa Trindade Palmeiro Romão

Dr.^a Luísa Margarida Azevedo Soares

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Relatório de Estágio

Évora, 2015

AGRADECIMENTOS

Este relatório final marca o fim de uma etapa muito importante da minha vida que contou com contributos de natureza diversa que não podem deixar de ser realçados e pelos quais estarei eternamente grata.

Ao **Professor Ricardo Romão**, por ter aceitado ser meu orientador de estágio, pela dedicação, disponibilidade e simpatia sempre que foi necessário e ainda, por todos os conhecimentos transmitidos ao longo do percurso académico.

À **Dr.ª Luísa Soares**, minha co-orientadora, por tudo o que me ensinou, pela forma como me deixou praticar, pela paciência de tantas horas de trabalho, pelo companheirismo, por me ter mostrado as maravilhas paisagísticas e gastronómicas da ilha e pela amizade, que ficou!

À **Dr.ª Carla Azevedo**, pela incansável ajuda, orientação, permanente disponibilidade e incentivo na realização de todo o trabalho experimental.

Ao **Professor João Simões**, pela valiosa ajuda e pela incrível disponibilidade durante a elaboração de todo o tratamento de resultados.

A **toda a equipa da Associação de Jovens Agricultores Micaelenses**, por tudo o que me ensinaram, pela infindável disponibilidade para me ajudarem em tudo o que foi preciso, pela simpatia e boa disposição de todos os dias, por me terem proporcionado momentos absolutamente inesquecíveis e, acima de tudo, por serem possuidores de uma atitude que, desde o primeiro dia, me fez sentir como um membro da equipa. Muito obrigada pela forma como contribuíram para a minha formação enquanto médica veterinária e enquanto pessoa!

À **Mãe e à mana Sara**, por serem as pessoas que mais adoro e admiro, por toda a dedicação, pelos melhores momentos da minha vida e pelo apoio incondicional em mais esta importante etapa.

Ao **Avô João**, pela dedicação, apoio, incentivo, por todos os valores transmitidos e por ser um exemplo!

À **D. Sónia, à Beatriz e à Avó Conceição**, a minha família açoriana, pela forma como me receberam desde o primeiro dia, por tudo o que me proporcionaram e pelo carinho constante.

À **Marlene**, a melhor amiga de todos os momentos que marcaram estes últimos anos, devo um agradecimento muito especial pelas infinitas horas de estudo e de trabalho, pelas melhores gargalhadas, pela cumplicidade, pelo companheirismo, pela amizade que permanece e, acima de tudo, por ter estado sempre presente, principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao **Miguel**, pelo coração enorme que tem, por ter estado presente em todos os melhores momentos destes seis anos, por me fazer rir como ninguém e pela amizade tão especial que se mantém!

A todos aqueles que não referi, mas que não esqueço e que de alguma forma contribuíram para que os anos na Universidade de Évora tenham sido extraordinários e tenham marcado de forma tão positiva a minha memória deixando saudades de todos os ótimos momentos vividos!

A todos o meu sincero e sentido, **Muito Obrigada!**

RESUMO

O presente relatório teve como base o estágio curricular em Clínica e Cirurgia de bovinos de aptidão leiteira realizado na Associação de Jovens Agricultores Micaelenses. A primeira parte deste relatório inclui a compilação da casuística acompanhada, seguida da segunda parte que corresponde à revisão bibliográfica sobre a mastite bovina. A terceira e última parte refere-se ao estudo desenvolvido em 100 explorações leiteiras da ilha de São Miguel, Açores. Do total das amostras de leite do tanque recolhidas nas explorações, 59% foram positivas a *Staphylococcus aureus*, 100% a *Staphylococcus* coagulase-negativos, 75% foram positivas a *Escherichia coli* e 35% a outros coliformes. Alguns dos fatores de risco em estudo, tais como a utilização de luvas e o pré-*dipping*, foram significativamente associados à prevalência dos agentes acima citados no leite do tanque. Verificou-se ainda uma influência significativa do *Staphylococcus aureus* na contagem de células somáticas no leite do tanque ($P < 0,001$).

Palavras-chave: fatores de risco, prevalência, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase-negativos, coliformes.

DAIRY CATTLE MEDICINE AND SURGERY

Risk factors associated with the bulk-milk prevalence of *Staphylococcus* spp. and coliforms in dairy farms of São Miguel Island, Azores

ABSTRACT

This report concerns to the academic internship in dairy cattle Medicine and Surgery performed at Associação de Jovens Agricultores Micaelenses. The first part of the report includes the compilation of accompanied casuistry, followed by the literature revision on bovine mastitis. The third and last part refers to a study in 100 dairy farms of São Miguel Island, Azores - Portugal. From the total bulk tank milk samples collected in the study dairy farms, 59% were positive to *Staphylococcus aureus*, 100% to coagulase-negative *Staphylococci*, 75% were positive to *Escherichia coli* and 35% to other coliforms. Several risk factors in study, such as gloves use and *pré-dipping*, were significantly associated with the prevalence of the agents mentioned above in bulk tank milk. Moreover, the study revealed a significant influence of *Staphylococcus aureus* in somatic cells count in bulk tank milk ($P < 0,001$).

Keywords: risk factors, prevalence, *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative *Staphylococci*, coliforms.

Índice geral

Agradecimentos.....	ii
Resumo	iv
Abstract	v
Índice geral	vi
Índice de figuras	ix
Índice de gráficos	x
Índice de tabelas	xi
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	xii
Introdução	1

1. Local de estágio e casuística

1.1. Apresentação do local de estágio	2
1.2. Breve caracterização da região e das explorações	2
1.3. Descrição da casuística acompanhada	4
1.3.1. Clínica Médica	5
1.3.1.1. Sistema digestivo	5
1.3.1.2. Sistema reprodutor	8
1.3.1.3. Sistema respiratório	12
1.3.1.4. Afeções da glândula mamária	14
1.3.1.5. Desequilíbrios metabólicos	15
1.3.1.6. Sistema músculoesquelético	18
1.3.1.7. Outros casos	19
1.3.1.8. Outras intervenções	22
1.3.2. Clínica Cirúrgica	23
1.3.3. Profilaxia	27
1.3.4. Acompanhamento reprodutivo	27

2. Revisão bibliográfica

2.1. Anatomia e fisiologia da glândula mamária	30
2.2. A mastite bovina	31
2.2.1. Etiologia	32
2.2.2. Classificação clínica da mastite	33
2.3. Fatores de risco para a ocorrência de mastite	34
2.3.1. Fatores de risco associados ao animal	34
2.3.1.1. Raça	34
2.3.1.2. Idade e número de lactações	35
2.3.1.3. Fase da lactação	35
2.3.1.4. Características morfológicas do úbere e tetos	35
2.3.1.5. Alterações e lesões do úbere e tetos	35
2.3.1.6. Higiene do úbere e tetos	35
2.3.1.7. Estado de nutrição	36

2.3.1.8. Genética	37
2.3.1.9. Ocorrência de outras doenças	37
2.3.2. Fatores de risco ambientais e de manejo	37
2.3.2.1. Higiene e manejo das instalações	37
2.3.2.2. Maneio e higiene da ordenha	38
2.3.2.3. Estação do ano	39
2.3.3. Fatores de risco relacionados com o agente patogénico	39
2.4. Diagnóstico	40
2.4.1. Contagem de células somáticas	40
2.4.1.1. Teste californiano de mastites	41
2.4.2. Medição da condutividade elétrica	42
2.4.3. Indicadores de pH	42
2.4.4. N-acetil-b-D-glucosaminidase (NAGase)	42
2.4.5. Detecção de anticorpos no leite	43
2.4.6. Teor microbiano total	43
2.4.7. Culturas bacteriológicas	43
2.4.8. <i>Polymerase chain reaction</i> (PCR)	44
2.5. Caracterização das mastites por <i>Staphylococcus</i> spp. e coliformes	44
2.5.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	44
2.5.1.1. Etiologia e epidemiologia	44
2.5.1.2. Fatores de virulência e patogénese	45
2.5.1.3. Transmissão	46
2.5.1.4. Sinais clínicos	46
2.5.1.5. Diagnóstico	47
2.5.1.6. Tratamento	48
2.5.1.7. Prevenção	49
2.5.2. <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos	49
2.5.2.1. Etiologia	49
2.5.2.2. Epidemiologia	50
2.5.2.3. Fatores de virulência e patogénese	50
2.5.2.4. Sinais clínicos	51
2.5.2.5. Diagnóstico	51
2.5.2.6. Tratamento	52
2.5.2.7. Prevenção	52
2.5.3. Coliformes	53
2.5.3.1. Etiologia	53
2.5.3.2. Epidemiologia	53
2.5.3.3. Fatores de virulência e patogénese	54
2.5.3.4. Transmissão	54
2.5.3.5. Sinais clínicos	54
2.5.3.6. Diagnóstico	55
2.5.3.7. Tratamento	55
2.5.3.8. Prevenção	56

2.6. Controlo e prevenção da mastite	56
2.6.1. Papel da vacinação na prevenção das mastites por <i>Staphylococcus</i> spp. e coliformes	60
2.7. Impacto económico	61
3. Trabalho experimental: fatores de risco associados à prevalência de <i>Staphylococcus</i> spp. e coliformes no leite do tanque de explorações da ilha de São Miguel, Açores	
3.1. Introdução	62
3.2. Materiais e métodos	63
3.2.1. Amostragem	63
3.2.2. Recolha de amostras.....	64
3.2.3. Inquéritos	64
3.2.4. Processamento das amostras	66
3.2.5. Análise estatística.....	66
3.3. Resultados	67
3.3.1. Resultados descritivos dos inquéritos	67
3.3.1.1. Contagem de células somáticas	67
3.3.1.2. Higiene dos procedimentos da ordenha	68
3.3.1.3. Máquina de ordenha e tanque do leite.....	68
3.3.1.4. Período de vaca seca.....	69
3.3.1.5. Diagnóstico e tratamento das mastites	69
3.3.1.6. Maneio dos vitelos.....	70
3.3.2. Análise descritiva dos resultados da PCR	71
3.3.3. Influência dos agentes estudados na contagem de células somáticas no tanque	72
3.3.4. Efeito dos fatores estudados para cada agente.....	72
3.3.4.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	72
3.3.4.2. <i>Escherichia coli</i>	73
3.3.4.3. Outros coliformes	74
3.4. Discussão	76
3.5. Conclusão	82
Bibliografia	84
ANEXO I: Inquérito de recolha de informação na exploração	96

Índice de figuras

Figura 1. Exemplo de sala de ordenha móvel.....	3
Figura 2. Incidência das causas de diarreia de acordo com a idade dos bezerros (adaptado de Milleman, 2009).....	7
Figura 3. Retenção das membranas fetais	10
Figura 4. Aborto bovino. a: feto abortado no final do segundo terço da gestação. b: feto abortado na fase inicial da gestação.....	12
Figura 5. Administração de cálcio IV a uma vaca com hipocalcemia clínica pós-parto	17
Figura 6. Lesões de papilomatose na cabeça, pescoço e membros de uma novilha	20
Figura 7. Novilho com múltiplas lesões de fotossensibilidade	22
Figura 8. Resolução de prolapso uterino. a: prolapso uterino. b: lavagem do útero com água e iodopovidona diluída. c: reintrodução do útero na cavidade abdominal. d: realização da sutura de <i>Buhner</i>	24
Figura 9. Carcinoma das células escamosas na membrana nictitante numa vaca Holstein-Frísia .	25
Figura 10. Excisão de carcinoma das células escamosas da terceira pálpebra. a: excisão da neoplasia. b: remoção da segunda pinça hemostática. c: hemorragia praticamente inexistente após remoção da segunda pinça hemostática.....	26
Figura 11. Representação esquemática do protocolo para sincronização de estro baseado na administração de PGF _{2α} apenas às vacas com um corpo lúteo e deteção do cio nos 2-7 dias seguintes.	28
Figura 12. Representação esquemática do protocolo <i>Ovsynch</i>	29
Figura 13. Representação esquemática do protocolo de sincronização à base de progesterona....	29
Figura 14. Anatomia da glândula mamária (adaptado de Biggs, 2009).....	31
Figura 15. Classificação do grau de higiene do úbere. Grau 1: limpo; Grau 2: ligeiramente sujo (2-10%); Grau 3: moderadamente sujo (10-30%); Grau 4: Sujo (> 30%) (adaptado de Ruegg, 2004).	36

Índice de gráficos

Gráfico 1. Distribuição das intervenções efetuadas pelas quatro áreas de intervenção médico-veterinária, em FR (%; n=1395).	4
Gráfico 2. Distribuição da casuística da componente de Clínica Médica, pelos sistemas implicados, em frequência relativa (%; n= 627).	5
Gráfico 3. Distribuição das explorações segundo a sua contagem de células somáticas (CCS) do tanque.....	67
Gráfico 4. Fatores em estudo relacionados com a higiene dos procedimentos da ordenha e respetiva percentagem de explorações onde foram verificados.....	68
Gráfico 5. Percentagem de explorações onde se verificou a utilização de ordenhas móveis, de água quente na higienização da máquina e de tanques de leite móveis e refrigerados	69
Gráfico 6. Fatores em estudo relacionados com o período de secagem das vacas e respetiva percentagem de explorações onde foram verificados.	69
Gráfico 7. Fatores em estudo relacionados com o diagnóstico e tratamento das mastites e respetiva percentagem de explorações onde foram verificados.....	70
Gráfico 8. Fatores em estudo relacionados com o maneio dos vitelos e respetiva percentagem de explorações onde foram verificados.	70
Gráfico 9. Prevalência de <i>S. aureus</i> , SCN, <i>E. coli</i> e COL no tanque de explorações da ilha de São Miguel (n=100)	71

Índice de tabelas

Tabela 1. Afeções do sistema digestivo, em número absoluto (n) e FR (%; n=160).....	6
Tabela 2. Aspectos úteis na orientação do diagnóstico das diarreias neonatais (adaptado de Milleman, 2009).....	7
Tabela 3. Causas de intervenção ao nível do sistema reprodutor, em número absoluto (n) e FR (%; n=139).....	9
Tabela 4. Afeções do sistema respiratório, em número absoluto (n) e FR (%; n=118).	12
Tabela 5. Afeções da glândula mamária, em número absoluto (n) e FR (%; n=73).	15
Tabela 6. Desequilíbrios metabólicos, em número absoluto (n) e FR (%; n=68).....	15
Tabela 7. Casos clínicos com envolvimento do sistema músculoesquelético, em número absoluto (n) e FR (%; n=34).....	18
Tabela 8. Afeções de origem diversa, em número absoluto (n) e FR (%; n=35).	19
Tabela 9. Distribuição das intervenções na área de Clínica Cirúrgica por região anatômica, em número absoluto (n) e FR (%; n=73).....	23
Tabela 10. Intervenções profiláticas, em número absoluto (n) e FR (%; n=73).....	27
Tabela 11. Intervenções efetuadas durante os programas de acompanhamento reprodutivo, em número absoluto (n) e FR (%; n=372).....	28
Tabela 12. Interpretação e leitura do TCM (adaptado de Biggs, 2009)	42
Tabela 13. Variação da CCS e do grau de excreção bacteriana de uma glândula mamária infetada com <i>S. aureus</i> (adaptado de Blowey & Edmondson, 2010)	46
Tabela 14. Prevalência estimada de infeções no efetivo e perdas de produção associadas a elevadas CCS no leite do tanque (NMC, 1996 citado por Schroeder, 2012)	62
Tabela 15. Número de explorações por região nas quais foram recolhidas amostras de leite.	64
Tabela 16. Percentagem de explorações negativas e positivas à PCR para cada agente, nas amostras de leite do tanque, e seus intervalos de confiança (IC) de 95% (n=100).	71
Tabela 17. Percentagem de explorações positivas a <i>S. aureus</i> no leite do tanque, OR e respetivos IC 95% de acordo com a CCS no tanque.....	72
Tabela 18. Percentagem de explorações positivas a <i>S. aureus</i> no leite do tanque de acordo com os vários fatores de risco incluídos no questionário, e respetivos OR, IC 95% e valor P. .	73
Tabela 19. Percentagem de explorações positivas a <i>E. coli</i> no leite do tanque de acordo com os vários fatores de risco incluídos no questionário, e respetivos OR e valor P	74
Tabela 20. Percentagem de explorações positivas a coliformes no leite do tanque de acordo com os vários fatores de risco incluídos no questionário, e respetivos OR, IC 95% e valor P. .	75

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

AINE - Anti-inflamatório não esteróide

AJAM - Associação de Jovens Agricultores Micaelenses

ATB - Antibiograma

BPV - Vírus da papilomatose bovina

bpm - Batimentos por minuto

BVD – Diarreia viral bovina

BVDV - Vírus da diarreia viral bovina

CCS - Contagem de células somáticas

Céls/mL - Células por mililitro

CIDR - *Controlled internal drug release*

COL – Bactérias coliformes (exceto *Escherichia coli*)

Ct – Ciclo limiar de amplificação (*cycle threshold*)

ELISA - *Enzyme linked immuno sorbent assay*

ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigénica

FR - Frequência relativa

FTS - Fotossensibilidade

FTIP - Falha da transferência de imunidade passiva

GnRH - Hormona libertadora de gonadotrofinas

IA - Inseminação artificial

IBR - Rinotraqueíte infecciosa bovina

IIM – Infecção intramamária

IV – Intravenosa

LH – Hormona luteinizante

LPS - Lipopolissacáridos

MAD - Membro anterior direito

MAE - Membro anterior esquerdo

MPE - Membro posterior esquerdo

NAgase - N-acetil-b-D-glucosaminidase

NMC - *National Mastitis Council*

PCR - *Polimerase chain reaction*

PGF_{2α} – Prostaglandina F₂ alfa

RMF - Retenção das membranas fetais

SCN - *Staphylococcus* coagulase-negativos

TCM - Teste californiano de mastites

TMT - Teor microbiano total

Introdução

O presente relatório refere-se ao estágio curricular em Clínica e Cirurgia de bovinos de aptidão leiteira realizado no âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. O estágio realizou-se na Associação de Jovens Agricultores Micaelenses (AJAM), na ilha de São Miguel - Açores - entre 1 de Fevereiro e 30 de Junho de 2014, sob a orientação do Dr. Ricardo Romão e co-orientação da Dr.^a Luísa Soares.

O principal objetivo do estágio foi a aquisição progressiva de competências de trabalho para conferir a necessária autonomia prática no final do Mestrado Integrado. Para isto, durante o decorrer de todo o período de estágio fez-se o acompanhamento, em contexto profissional, de toda a rotina de trabalho da prática clínica de campo de bovinos de aptidão leiteira.

O estágio estimulou a utilização dos conhecimentos adquiridos na formação académica através do acompanhamento e participação ativa num vasto e diversificado número de casos clínicos quer na área da Clínica Médica e Cirúrgica quer no acompanhamento reprodutivo das explorações. Não menos importante foi o facto de este ter proporcionado um contacto diário e intensivo com os produtores e com a realidade das explorações leiteiras das diferentes regiões desta ilha.

Apesar da casuística ser vasta e diversificada observou-se, no decorrer de todo o estágio, que as mastites são um dos problemas de maior expressão que é marcadamente influenciado pelas características particulares do manejo praticado nas explorações de São Miguel. Assim, desenvolveu-se um estudo que abrangeu 100 explorações das diferentes regiões da ilha e cujos objetivos foram: determinar a prevalência de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase-negativos e coliformes em 100 explorações da ilha de São Miguel, detetados recorrendo à técnica *polimerase chain reaction* (PCR) em tempo real a partir de amostras colhidas no tanque do leite. Pretendeu-se também avaliar a correlação entre as práticas de manejo aplicadas nestas explorações e as prevalências encontradas, para estes microrganismos, e avaliar a influência destes na contagem de células somáticas (CCS) no leite do tanque das explorações onde foram detetados. Com isto tentou-se identificar quais os fatores que mais significativamente contribuem para a ocorrência destas bactérias no tanque do leite a fim de futuramente se melhorarem e implementarem planos de controlo de mastites adequados.

Desta forma, a primeira parte deste relatório é composta pela compilação da casuística acompanhada, seguida de uma segunda parte que corresponde à revisão bibliográfica sobre a mastite bovina e, por fim, a terceira parte da qual consta o estudo sobre os fatores de risco associados à prevalência de *Staphylococcus* spp. e coliformes no leite do tanque de explorações da ilha de São Miguel, Açores.

1. Local de estágio e casuística

1.1. Apresentação do local de estágio

A Associação dos Jovens Agricultores Micaelenses (AJAM) foi fundada em 1986 tendo como principais objetivos informar e contribuir para a valorização técnica, empresarial e cultural dos jovens agricultores da ilha de São Miguel. A sede está situada no Centro de Bovinicultura, nas Arribanas, freguesia dos Arrifes, concelho de Ponta Delgada. Neste local, para além das instalações de apoio e logística, está sediada uma exploração de leite com cerca de 70 vacas em lactação, numa área de 13,68 hectares. Os restantes 56,85 hectares pertencentes à AJAM localizam-se nos campos de Santana, no concelho da Ribeira Grande, e daqui provêm as forragens e são desenvolvidos vários estudos experimentais com novas variedades forrageiras e técnicas de produção.

A AJAM disponibiliza assistência médico-veterinária através de uma equipa de médicos veterinários constituída por cinco membros divididos por quatro zonas geográficas da ilha. Existe ainda um outro membro da equipa que executa exclusivamente as provas de rastreio de tuberculose no âmbito do controlo sanitário oficial de tuberculose nas explorações de bovinos, por toda a ilha. Grande parte dos pedidos de assistência é recebida por telefone na sede da AJAM e posteriormente reencaminhados ao médico veterinário responsável pela zona, sendo que uma pequena parte dos pedidos de assistência são recebidos diretamente pelo médico veterinário.

A AJAM presta também serviços de inseminação artificial (IA), possuindo uma equipa de quatro inseminadores divididos por quatro zonas geográficas da ilha, serviço de acompanhamento reprodutivo das explorações e serviço de podologia. A associação possui ainda um laboratório de apoio à melhoria da qualidade do leite e disponibiliza apoio jurídico e assistência em outros serviços através do gabinete de contabilidade e do gabinete de projetos e apoio ao rendimento.

1.2. Breve caracterização da região e das explorações

São Miguel é a maior ilha do arquipélago, com uma área total de 744.6 Km² dividida em seis Concelhos: Ponta Delgada, Ribeira Grande, Lagoa, Vila Franca do Campo, Nordeste e Povoação (SRAA, 2015). É na freguesia dos Arrifes, no concelho de Ponta Delgada que se localiza a maior bacia leiteira da região, onde está sediada uma das três fábricas de transformação de leite da ilha de São Miguel. As outras duas indústrias de laticínios têm a sua sede no concelho da Ribeira Grande.

A utilização das terras agrícolas na ilha de São Miguel é dominada pelas pastagens permanentes destinadas à atividade agropecuária (SRAA, 2015) sendo estas, à semelhança de outras regiões vulcânicas, carenciadas em fósforo, cálcio, zinco, cobre (Pereira & Oliveira, 2004), iodo e selénio (Grace, 1994 citado por Pinto, 2010) e muito ricas em potássio (Pereira e Oliveira, 2004). As carências nestes micronutrientes são particularmente importantes no

arquipélago dos Açores, onde predomina o sistema de pastoreio permanente, uma vez que estas acabam por se refletir nos animais que pastoreiam nestas áreas.

A ilha de São Miguel possui um grande efetivo bovino de aptidão leiteira – 51 684 vacas de aptidão leiteira, de acordo com informações muito recentes dos Serviços de Desenvolvimento Agrário de São Miguel - sendo a produção leiteira uma das principais atividades económicas desta ilha. Segundo os últimos dados do Serviço Regional de Estatística dos Açores (SREA, 2015), no ano de 2014, só na ilha de São Miguel, foram recolhidos 377 241 220 litros de leite diretamente da produção.

O regime de exploração é maioritariamente um regime extensivo no qual os animais são mantidos em pastoreio permanente, existindo ainda muito poucas explorações onde os animais permanecem em estabulação de forma permanente.

Relativamente ao manejo dos vitelos, são separados da mãe logo após o parto ou permanecem com esta cerca de dois dias para que ingiram o colostro por amamentação direta. Na grande maioria das explorações os vitelos permanecem na pastagem, presos por uma corrente, desde que são separados da mãe. As vitelas geralmente permanecem na exploração para substituição do efetivo e a sua alimentação até ao desmame é sobretudo à base de leite rejeitado da ordenha (de vacas com mastite e/ou em tratamento), em alguns casos leite em pó e pastoreio direto.

Já na fase de novilhas podem permanecer na pastagem presas por corrente ou em parcelas delimitadas por cerca elétrica. As novilhas, normalmente, permanecem nas pastagens de média e alta altitude e de acessos difíceis, sendo a sua alimentação exclusivamente à base de erva da pastagem. Permanecem nestes locais até ao período periparto, altura em que se mudam para junto das vacas em lactação.

As vacas adultas também permanecem na pastagem durante todo o ano e os produtores possuem uma sala de ordenha móvel (figura 1) que acompanha os animais sempre que estes mudam de pastagem. Outros casos existem em que a sala de ordenha permanece no mesmo local, geralmente locais mais abrigados, e os animais deslocam-se da pastagem até esta na altura da ordenha.



Figura 1. Exemplo de sala de ordenha móvel.

1.3. Descrição da casuística acompanhada

Durante os cinco meses de estágio foi feito o acompanhamento de todos os médicos veterinários que integravam a equipa da AJAM, tendo sido possível participar ativamente na prática diária da clínica, cirurgia, profilaxia e acompanhamento reprodutivo de bovinos de aptidão leiteira, o que permitiu a interiorização gradual de comportamentos e atitudes indispensáveis à prática clínica.

No decorrer de todo o estágio foram sendo registados apontamentos que foram a base dos dados apresentados neste capítulo e que refletem a casuística acompanhada ao longo dos cinco meses. No total, realizaram-se intervenções em 1395 bovinos. Em situações pontuais realizaram-se ainda intervenções na espécie caprina, suína e canina, sendo que, todos os animais intervencionados pertenciam a proprietários das explorações leiteiras associados da AJAM e, por esse motivo, a grande maioria das intervenções foram solicitadas aquando das visitas à exploração para assistência ao efetivo de bovinos leiteiros.

Devido ao elevado número de intervenções e sua variedade, a casuística será subdividida a fim de tornar mais fácil a sua organização e compreensão. Assim, foram definidas quatro áreas de intervenção: Clínica Médica, Clínica Cirúrgica, profilaxia e acompanhamento reprodutivo.

Como se pode observar no gráfico 1, a prática diária de clínica de campo em São Miguel está sobretudo direcionada para a assistência médica às explorações, representando esta componente uma frequência relativa (FR) de 46,9% (n=654). A profilaxia, a Clínica Cirúrgica e o acompanhamento reprodutivo das explorações representam frequências relativas de 21,2% (n=296), 5,2% (n=73) e 26,7% (n=372), respetivamente.

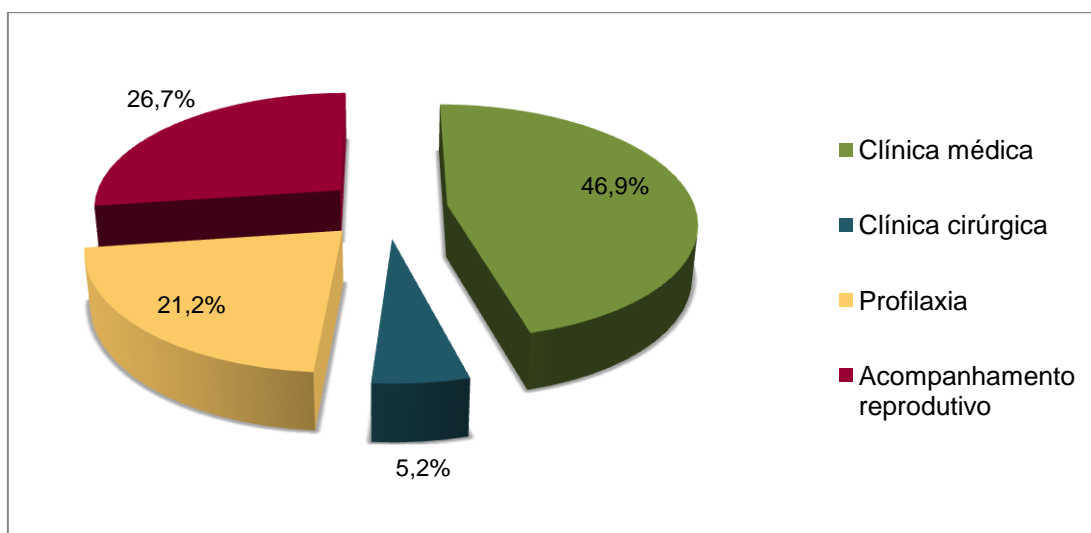


Gráfico 1. Distribuição das intervenções efetuadas pelas quatro áreas de intervenção médico-veterinária, em FR (%; n=1395).

1.3.1. Clínica Médica

A Clínica Médica foi a componente principal sendo, por isso, aquela que abrangeu uma grande variedade de sistemas. Os 627 casos clínicos acompanhados nesta área de intervenção foram agrupados consoante os sistemas implicados, dividindo-se em sistema digestivo, sistema reprodutor, sistema respiratório, afeções da glândula mamária, desequilíbrios metabólicos e sistema músculoesquelético. Alguns dos casos clínicos assistidos, não enquadráveis em nenhuma das categorias mencionadas, foram incluídos na categoria designada por outros casos. Para além destas, inclui-se ainda uma última categoria designada por outras intervenções onde foram incluídas intervenções que não correspondem a casos clínicos propriamente ditos, nomeadamente as necrópsias, as eutanásias e as colheitas de tronco encefálico. Desta forma, os casos clínicos assistidos juntamente com as intervenções incluídas nesta última categoria perfazem um total de 654 animais intervencionados nesta componente.

Como é possível verificar no gráfico 2, o sistema digestivo, o sistema reprodutor e o sistema respiratório são aqueles que apresentam maior número de casos assistidos, representando frequências relativas de 25,5% (n=160), 22,2% (n=139) e 18,8% (n=118), respetivamente, e perfazendo no seu conjunto 66,5% dos casos acompanhados na Clínica Médica.

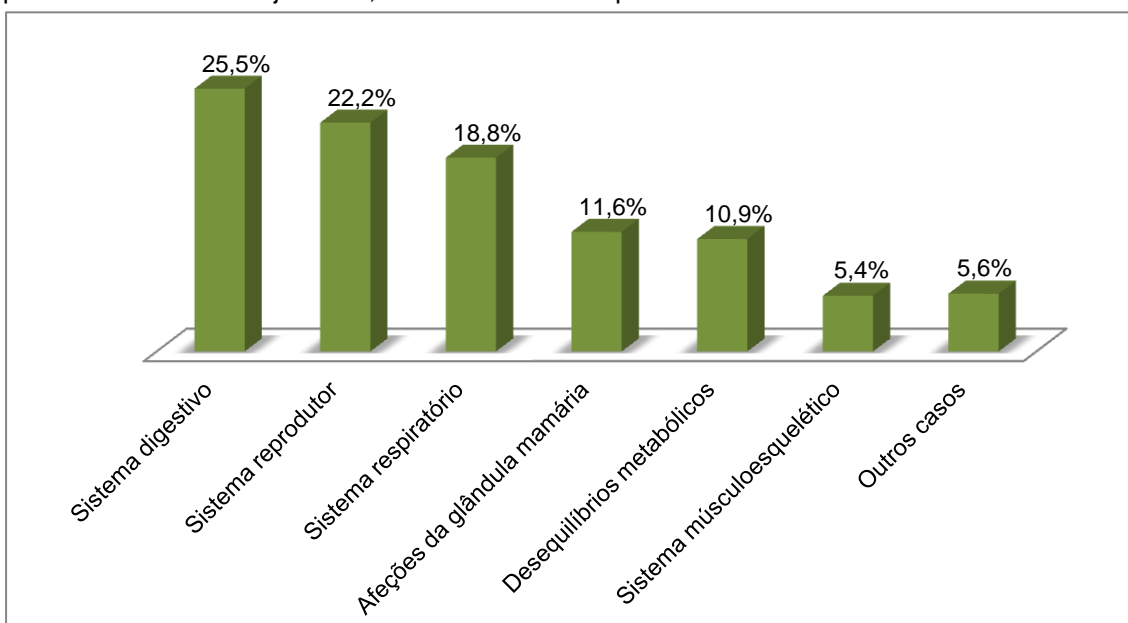


Gráfico 2. Distribuição da casuística da componente de Clínica Médica, pelos sistemas implicados, em frequência relativa (%; n= 627).

Seguidamente serão analisadas com maior pormenor as doenças mais representativas dentro de cada categoria e/ou as de maior relevância no panorama local.

1.3.1.1. Sistema digestivo

Como se pode constatar na tabela 1, o sistema digestivo foi um dos sistemas com maior diversidade casuística e com o maior número de intervenções na componente da Clínica Médica. Destacam-se, neste sistema, com grande diferença no número de casos assistidos

relativamente aos restantes, as diarreias em jovens com uma frequência relativa de 38,1% (n=61), seguidas das diarreias em adultos com 22,5% de frequência relativa.

Tabela 1. Afeções do sistema digestivo, em número absoluto (n) e FR (%; n=160).

Sistema digestivo	n	%
Diarreia em jovens	61	38,1
Diarreia em adultos	36	22,5
Indigestão simples	15	9,4
Suspeita de retículo-peritonite traumática	15	9,4
Subnutrição	7	4,3
Indigestão láctea	5	3,1
Timpanismo gasoso	5	3,1
Cólica abdominal	4	2,5
Dilatação de ceco	3	1,9
Indigestão vagal	3	1,9
Timpanismo espumoso	3	1,9
Úlcera do abomaso	3	1,9
Total	160	100

A diarreia neonatal é uma doença de grande importância nos bezerros, estando associada a uma diminuição no ganho de peso e ao aumento das taxas de mortalidade nas explorações. Apesar da diarreia ser um sinal clínico fácil de diagnosticar, não é específico. Ocorre principalmente em bezerros com menos de seis semanas, embora possam ser afetados até aos quatro meses de idade (Gulliksen *et al.*, 2009; Milleman, 2009).

A etiologia da diarreia neonatal é multifatorial e pode incluir causas infecciosas, ambientais, nutricionais e aspetos relacionados com o próprio manejo, sendo a falha de transferência de imunidade passiva (FTIP) um dos exemplos mais importantes. Pode ainda estar relacionada com o tamanho do efetivo, sendo os efetivos maiores mais problemáticos (Gulliksen *et al.*, 2009).

Relativamente às causas nutricionais, a diarreia alimentar pode ocorrer por sobrecarga, quando os bezerros são alimentados com quantidades excessivas de leite, manifestando-se normalmente por diarreia ligeira, fezes volumosas e amarelo-pálidas; pode ser devido a alimentação à base de substitutos do leite de qualidade inferior manifestando-se, nestes casos, por diarreia subaguda e crónica, perda de peso progressiva e ausência de resposta ao tratamento convencional, obtendo-se uma resposta positiva quando se retiram os substitutos do leite fornecendo-se apenas leite integral de vaca; ou ainda, por deficiência em dissacaridase intestinal que origina diarreia subaguda irresponsiva à terapia comum, obtendo-se, nestes casos, uma resposta favorável quando se retira o leite da alimentação (Radostits *et al.*, 2007).

A diarreia infecciosa tem como origem infeções com agentes patogénicos como vírus, bactérias e protozoários (Gunn *et al.*, 2009; Bilbao *et al.*, 2011). Os agentes patogénicos mais importantes associados a diarreias incluem Rotavírus, Coronavírus, *Cryptosporidium* spp., *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) e *Salmonella* spp. (Gunn *et al.*, 2009).

O diagnóstico deve assentar sobretudo num exame clínico completo e numa anamnese precisa (Milleman, 2009). Inicialmente a única manifestação poderá ser a sujidade dos quartos posteriores, da cauda e o aumento do número de defecações com alteração da consistência das fezes. Numa fase mais avançada os sinais podem tornar-se evidentes com fezes aquosas, sinais de desidratação, extremidades frias, perda gradual do apetite, sinais de dor abdominal e dificuldade em levantar-se ou manter-se em estação (Bilbao *et al.*, 2011). De acordo com Milleman (2009), cada uma das doenças neonatais que se caracterizam por diarreia tem, normalmente, um pico de incidência numa idade específica (figura 2).

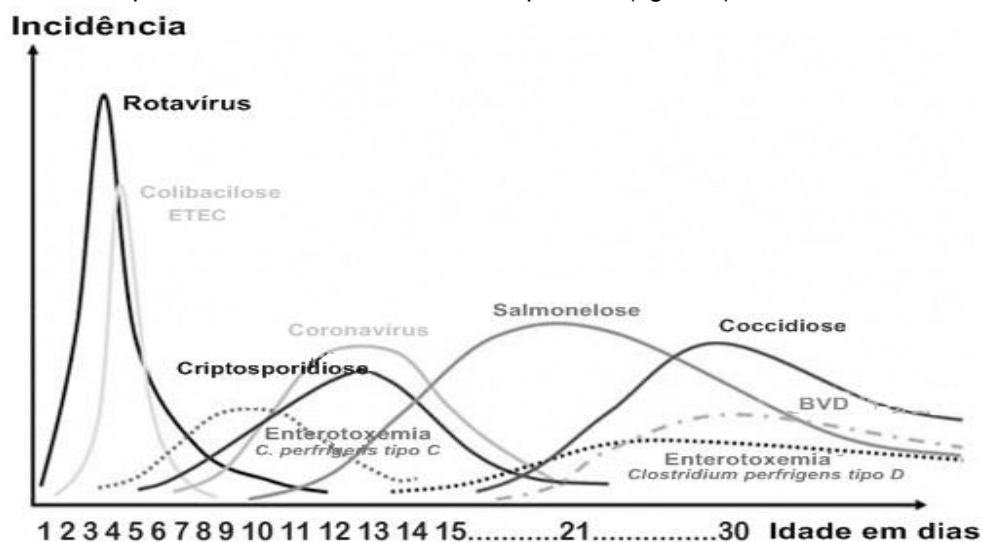


Figura 2. Incidência das causas de diarreia de acordo com a idade dos bezerros (adaptado de Milleman, 2009).

Segundo Milleman (2009), o aspeto das fezes, associado aos sinais clínicos e à idade dos animais afetados são aspetos úteis na orientação do diagnóstico (tabela 2). No entanto, geralmente é impossível fazer um diagnóstico etiológico definitivo com base apenas no quadro clínico (Gunn *et al.*, 2009).

Tabela 2. Aspetos úteis na orientação do diagnóstico das diarreias neonatais (adaptado de Milleman, 2009).

Idade média dos bezerros afetados	Sinais clínicos	Diagnóstico etiológico provável
1-3 dias	Fezes muito líquidas e amarelas Desidratação rápida e severa Fraqueza e extremidades frias	Colibacilose (ETEC)
4-11 dias	Fezes com muco, acizentadas/amarelas Hipertermia, anorexia, dor abdominal Desidratação progressiva	Rotavírus Coronavírus Criptosporidiose
> 11 dias	Fezes muito líquidas com vestígios de sangue, hipertermia severa (> 41°C)	Salmonelose
> 18 dias	Fezes escuras, +/- sangue e cólicas Fezes com muco, hipertermia, ptialismo, anorexia, epífora	Coccidiose (<i>Eimeria zuernii</i>) Diarreia viral bovina

ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigénica

O exame físico é o primeiro e importante passo para o estabelecimento das necessidades terapêuticas. O tratamento dependerá assim do grau de desidratação estimado, da severidade da acidose, da probabilidade de infecção intercorrente e da presença ou ausência de hipotermia e hipoglicemia (Gunn *et al.*, 2009). A fluidoterapia é essencial para correção da desidratação e desequilíbrios eletrolítico e ácido-base. Os agentes terapêuticos utilizados no tratamento das diarreias incluem ainda antibióticos, antiprotozoários, modificadores da motilidade gastrointestinal e protetores gastrointestinais. A detecção precoce dos sinais clínicos é muito importante para o êxito do tratamento (Bilbao *et al.*, 2011). Nos diversos casos acompanhados o tratamento instituído consistiu em fluidoterapia oral e/ou intravenosa (IV) acompanhada, em alguns casos, por um suplemento dietético (Diaproof k[®]) e por um complexo multivitamínico (Duphalyte[®]). O antimicrobiano usado com maior frequência nestes casos foi uma associação de sulfadoxina e trimetropin (Trivetrin[®]), na dose de 15mg/kg. Em alguns casos administrou-se um suplemento de ferro, vitaminas e minerais (Fercobsang[®]).

A abordagem mais importante para reduzir a incidência das diarreias é a prevenção. Para que a proteção seja efetiva, é primordial a correta administração de colostro nas seis a oito horas após o nascimento. Este colostro deve provir de mães adultas e imunizadas durante o período de vaca seca, com vacinas específicas para prevenção das diarreias neonatais. Para além disto, é igualmente importante adotar medidas de controlo que permitam interromper o ciclo da doença e diminuir a carga microbiana no meio ambiente, sendo necessário a adoção de medidas de higiene e manejo adequadas (Bilbao *et al.*, 2011).

As diarreias verificam-se ao longo de todo o ano, no entanto, nos Açores são mais comuns entre Dezembro e Maio (Vidal, 2006 citado por Sousa, 2007). Segundo o mesmo autor, as baixas temperaturas e maior humidade deste período, aliadas a problemas de manejo onde os vitelos muitas vezes não ingerem o colostro na quantidade adequada e são criados em grupo, geralmente em pastagens ao ar livre e muito contaminadas numa altura de grande fragilidade imunitária, contribuem para o aumento desta doença neste período.

1.3.1.2. Sistema reprodutor

De todos os sistemas incluídos na área da Clínica Médica, o sistema reprodutor foi aquele que apresentou a segunda maior frequência relativa (22,2%). Tal como no caso do sistema digestivo, as causas de intervenção foram bastante diversificadas, englobando os casos de retenção das membranas fetais (RMF), metrite puerperal, endometrite, casos de distócia, resolvidos por meio de manobras obstétricas, quisto ovárico, aborto, salpingite, torção uterina, indução de parto, mumificação fetal e hidropisia das membranas fetais.

Como se pode observar na tabela 3, dos casos clínicos que implicaram intervenção ao nível do sistema reprodutor, a RMF foi o mais frequente, apresentando uma frequência relativa de 19,4% (n=27), tendo-se verificado, no decorrer de todo o estágio, que esta é uma situação extremamente frequente nas explorações.

Tabela 3. Causas de intervenção ao nível do sistema reprodutor, em número absoluto (n) e FR (%), n=139).

Sistema reprodutor	n	%
RMF	27	19,4
Metrite puerperal	23	16,6
Endometrite	21	15,1
Distócia	19	13,7
Quisto ovárico	15	10,8
Aborto	9	6,5
Salpingite	9	6,5
Torção uterina	7	5,0
Indução de parto	5	3,6
Mumificação fetal	3	2,2
Hidropisia membranas fetais	1	0,6
Total	139	100

RMF – retenção das membranas fetais

A retenção primária das membranas fetais resulta de uma falha do destacamento das carúnculas maternas, enquanto a retenção secundária está relacionada com uma dificuldade mecânica na expulsão das membranas fetais já destacadas (p. ex. atonia uterina), podendo estes dois mecanismos coexistir (Eiler & Fecteau, 2007). A expulsão fisiológica das membranas fetais ocorre nas oito horas pós-parto, sendo que, segundo Beagley *et al.* (2010), a maioria das vacas elimina os invólucros fetais em seis horas após o parto. Assim, a RMF define-se como a ausência de expulsão das membranas fetais nas 24 horas após o parto (Beagley *et al.*, 2010; Amin *et al.*, 2013; Qu *et al.*, 2014), e são diversos os fatores físicos, endócrinos e celulares envolvidos no processo (Qu *et al.*, 2014).

Os principais fatores de risco associados à RMF incluem partos prematuros, aborto, hidropisia, torção uterina, partos gemelares, distócia, fetotomia, cesariana, stresse térmico e hipocalcémia periparto (Hillman & Gilbert, 2008; Beagley *et al.*, 2010; Qu *et al.*, 2014). Os partos induzidos pela administração de corticosteróides exógenos são também um fator de risco e, nestes casos, deve ser prevista a RMF (Hillman & Gilbert, 2008). As causas nutricionais são outro dos fatores de risco importantes e incluem situações como a sobrealimentação de vacas secas e as deficiências em carotenos, selénio e vitamina E (Hillman & Gilbert, 2008; Beagley *et al.*, 2010; Qu *et al.*, 2014). Segundo Hillman & Gilbert (2008), em locais pobres em selénio, existe tendência para um aumento da incidência de RMF, metrite e quistos ováricos. Os agentes infecciosos, como o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), e a imunossupressão são fatores de risco para a ocorrência de RMF (Hillman & Gilbert, 2008; Qu *et al.*, 2014).

Os sinais clínicos são óbvios quando as membranas fetais se encontram visíveis no exterior da vulva, muitas vezes pendentes alcançando o úbere e os curvilhões (figura 3). No entanto, a RMF pode não ser aparente em situações em que os invólucros fetais permanecem no interior do útero e/ou vagina o que exige que seja realizado exame vaginal para a sua deteção. Em alguns casos pode observar-se a presença de tenesmo associado à tensão e irritação

constantes do trato reprodutivo caudal provocados pelas membranas pendentes. A metrite é a complicação secundária mais comum e, quando esta se desenvolve, aumenta a probabilidade de ocorrência de mastite, de doenças metabólicas, de infecções ascendentes do trato urinário e de deslocamento do abomaso (Hillman e Gilbert, 2008).



Figura 3. Retenção das membranas fetais.

As principais sequelas da RMF incluem atrasos na involução uterina, aumento do intervalo entre partos, aumento do intervalo entre o parto e a primeira ovulação com diminuição da eficácia da primeira IA pós-parto, podendo ainda estar associadas ao desenvolvimento de claudicações (Beagley *et al.*, 2010; Amin *et al.*, 2013; Binabaj *et al.*, 2014). Para além disto, uma vaca com RMF tem elevada probabilidade de que o mesmo ocorra nos anos seguintes (Hillman & Gilbert, 2008).

Os objetivos do tratamento da RMF são: promover um rápido destacamento e expulsão das membranas fetais a fim de reduzir a ocorrência de metrite, diminuir as perdas de leite e reduzir a ineficiência reprodutiva (Eiler & Fecteau, 2007). Vários métodos têm sido utilizados no tratamento da RMF, embora a sua eficácia seja questionável pelo que as opções são controversas (Beagley *et al.*, 2010). Algumas das opções de tratamento sugeridas são a antibioterapia local, a antibioterapia sistémica, a utilização de hormonas, como a prostaglandina e a ocitocina, e a remoção manual (Beagley *et al.*, 2010; Amin *et al.*, 2013).

A dequitação das membranas fetais é contraindicada uma vez que as infeções uterinas são mais frequentes e mais severas após a sua execução (Hillman & Gilbert, 2008; Amin *et al.*, 2013). As hormonas não originam o destacamento das membranas fetais retidas mas são utilizadas com o objetivo de promover a contração uterina que facilita a expulsão das mesmas (Amin *et al.*, 2013).

A utilização de antibióticos no tratamento da RMF tem resultados contraditórios, existindo mesmo alguns autores que desaconselham a sua utilização por estes atrasarem o processo de

destacamento das membranas fetais (Beagley *et al.*, 2010; Amin *et al.*, 2013). Sendo a metrite a complicação mais comum da RMF, o propósito da aplicação de antibioterapia sistêmica é sobretudo a prevenção ou o tratamento desta afeição e diminuição dos subsequentes efeitos negativos sobre a fertilidade (Amin *et al.*, 2013). Assim, em animais com febre ou em maior risco a administração, p. ex., de ceftiofur (2,2mg/kg, por 5 dias) é benéfica no seu controle, auxiliando a um retorno à normal função reprodutiva (Beagley *et al.*, 2010; Amin *et al.*, 2013). De acordo com Hillman & Gilbert (2008), não existem evidências de que a aplicação intrauterina de antibióticos para tratamento da RMF tenha efeito benéfico na fertilidade subsequente. Segundo os mesmos autores, a aplicação intrauterina de tetraciclina pode atrasar a expulsão das membranas fetais, através da inibição das metaloproteínases locais que desempenham um papel importante no destacamento das mesmas.

A outra abordagem ao tratamento da RMF é a injeção de colagenase nas artérias umbilicais que se revela eficaz na eliminação mais rápida das membranas fetais, no entanto, o seu custo torna-a proibitiva em muitos casos (Hillman & Gilbert, 2008; Beagley *et al.*, 2010; Amin *et al.*, 2013).

A reduzida disponibilidade das opções de tratamento efetivo enaltece a importância da prevenção e as recomendações atuais para prevenção da RMF incluem diversos aspetos de manejo como, por exemplo, a garantia do bem-estar animal, reduzindo o stress na altura do parto, e um manejo nutricional cuidado especialmente durante o período de transição, três semanas antes até três semanas após o parto. A administração de selénio e vitamina E três semanas antes do parto é uma importante ação profilática para prevenir a RMF (Amin *et al.*, 2013).

Como referido anteriormente, por se tratar de uma região de origem vulcânica, os solos da ilha de São Miguel são muito deficitários em selénio. Uma das consequências da carência deste microelemento, e que apresenta grandes proporções nesta ilha, é a RMF. Observou-se, durante todo o período de estágio, que a suplementação com vitamina E e selénio no período pré-parto ainda não é uma prática comum o que contribui marcadamente para a ocorrência de um elevado número de casos. O tratamento dos casos observados consistiu na antibioterapia sistêmica com ceftiofur (Eficur[®]), na dose de 1 mg/kg e na suplementação com selénio e vitamina E (Selepherol[®]). Recorreu-se ainda a um análogo da prostaglandina F₂ alfa (PGF_{2α}) (Estrumate[®]), a fim de se promover a contratibilidade uterina facilitando a expulsão das membranas fetais retidas.

A grande maioria dos casos de aborto a que se assistiu ocorreu em vacas no sexto ou sétimo mês de gestação (figura 4a), tendo-se assistido apenas a um caso de aborto no início da gestação (figura 4b). Existem diversas causas que podem originar aborto em bovinos, entre elas, agentes infecciosos (bactérias, vírus, protozoários e fungos), agentes tóxicos, stress térmico e anomalias genéticas. As gestações gemelares e as mastites também podem estar

envolvidas. Os agentes infecciosos são as causas mais comumente diagnosticadas (Norman *et al.*, 2012). Segundo Christensen *et al.* (2009), o BVDV, o herpesvírus bovino do tipo 1, a *Leptospira interrogans* e a *Neospora caninum* são algumas das principais causas de aborto bovino. Apesar de não se conhecer a causa específica de nenhuma das situações a que se assistiu, foi possível constatar durante o período de estágio que as causas de aborto acima mencionadas são agentes de elevada prevalência em São Miguel.



Figura 4. Aborto bovino. **a:** feto abortado no final do segundo terço da gestação. **b:** feto abortado na fase inicial da gestação.

1.3.1.3. Sistema respiratório

No âmbito do sistema respiratório a totalidade das intervenções deveram-se a afeções do trato respiratório inferior, mais concretamente, pneumonias. Como se pode verificar na tabela 4, as pneumonias surgiram em elevado número tanto em animais jovens (51,7%; n=61) como em animais adultos (48,3%; n=57) sendo, no entanto, em número ligeiramente superior nos animais jovens.

Tabela 4. Afeções do sistema respiratório, em número absoluto (n) e FR (%; n=118).

Sistema respiratório	n	%
Pneumonia em jovens	61	51,7
Pneumonia em adultos	57	48,3
Total	118	100

A broncopneumonia nos bezerros, designada por pneumonia enzoótica, afeta sobretudo animais entre as quatro semanas e os seis meses de idade (Woolums *et al.*, 2009) e a sua prevalência tende a aumentar com o aumento do tamanho do efetivo (Al-Qudah, 2009; Lorenz *et al.*, 2011). É uma doença multifatorial causada pela combinação ativa de um ou mais agentes infecciosos, das condições do meio ambiente e da falha das defesas do hospedeiro (Al-Qudah, 2009; Woolums *et al.*, 2009). Os principais agentes implicados nas broncopneumonias dos bezerros incluem o vírus respiratório sincicial bovino, parainfluenza tipo 3, herpesvírus bovino tipo 1, BVDV, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni* e micoplasmas. O BVDV desempenha um importante papel causando imunossupressão e,

consequentemente, tornando os bezerros mais suscetíveis à ação de outros agentes (Potter, 2007; Icen *et al.*, 2009; Lorenz *et al.*, 2011).

Os animais mantidos em áreas de pequenas dimensões têm maior probabilidade de contrair afeções respiratórias, sobretudo se existirem problemas de ventilação e higiene inadequada das camas. A FTIP é outro dos fatores importantes para a ocorrência deste tipo de afeções uma vez que influencia fortemente a falha das defesas do hospedeiro face aos agentes patogénicos tornando-os mais suscetíveis à infeção. As alterações bruscas nas temperaturas entre os dias e as noites constituem também fatores de risco que tornam os vitelos mais predispostos às doenças respiratórias (Al-Qudah, 2009; Lorenz *et al.*, 2011).

As alterações bruscas nas temperaturas são um aspeto muito importante nos Açores uma vez que, na grande maioria das explorações, os vitelos são mantidos permanentemente na pastagem estando muito expostos às condições climáticas. Existem ainda outros casos em que os vitelos são mantidos em grupo em parques ou em viteiros de madeira, algumas vezes com grande concentração de animais e/ou ventilação insuficiente. Todos estes aspetos associados à FTIP verificada em algumas situações, justificam o elevado número de animais intervencionados.

Os sinais clínicos mais comuns incluem febre, tosse, inapetência, dispneia e corrimento nasal/ocular. Em estados mais avançados as crepitações pulmonares são facilmente audíveis (Potter, 2007; Al-Qudah, 2009; Lorenz *et al.*, 2011).

Relativamente ao tratamento, podem ser utilizados vários recursos na tentativa de aumentar as taxas de cura e reduzir os prejuízos, normalmente associando medicamentos para aliviar os sinais clínicos e combater as infeções (Coutinho, 2005). O tratamento com antimicrobianos deve ser iniciado o mais cedo possível a fim de evitar lesões a nível do parênquima pulmonar que conduzem à resistência ao tratamento, dificultando a regeneração tecidual (Lorenz *et al.*, 2011). Segundo Lorenz *et al.* (2011), um a dois terços dos animais que não respondem ao tratamento inicial ficarão permanentemente afetados. A escolha do antimicrobiano depende muitas vezes da experiência com casos anteriores (Radostits *et al.*, 2007). A administração de anti-inflamatórios não esteroides (AINES) nestes casos resulta numa redução da febre e da inflamação pulmonar fazendo com que os animais mantenham ou retomem a ingestão de alimentos e água (Coutinho, 2005; Woolums *et al.*, 2009). Os mucolíticos e broncodilatadores são utilizados a fim de melhorarem a atividade do aparelho mucociliar, aliviando a dificuldade respiratória, e a fluidoterapia corrige a desidratação (Coutinho, 2005).

O tratamento dos casos assistidos consistiu na administração de antibioterapia, cuja escolha dependeu da experiência com outros casos na exploração, tendo-se utilizado, por exemplo, a tilmicosina (Micotil[®]), na dose de 10 mg/Kg, ou o florfenicol (Nuflor[®]), na dose de 20 mg/Kg, e de terapia anti-inflamatória com ácido tolfenâmico (Tolfedine[®]), na dose de 2 mg/Kg. Sempre que necessário, recorreu-se à fluidoterapia e à suplementação com um complexo

multivitamínico. Nos casos mais exuberantes recorreu-se também à administração de um mucolítico, o cloridrato de bromexina (Eres[®]).

O manejo preventivo dos fatores de risco assume destacada importância no controlo destas doenças respiratórias, por isso, o controlo eficaz exige a implementação de determinadas práticas, entre elas: manter o animal em ambiente limpo, seco, ventilado e com temperatura adequada, garantir o fornecimento de alimentos palatáveis e de boa qualidade e em quantidade suficiente, evitar a FTIP, evitar a sobrelotação, isolar os animais doentes e monitorizar os restantes, evitar fatores de stresse, introduzir programas de vacinação adequados, entre outros. Relativamente às mães, alguns dos aspetos importantes são: garantir uma boa nutrição da vaca gestante, evitar a ocorrência de partos distócicos, providenciar um ambiente adequado na maternidade e vacinação (Coutinho, 2005).

1.3.1.4. Afeções da glândula mamária

Tal como expresso na tabela 5, a mastite foi, claramente, a principal afeção observada ao nível da glândula mamária (80,8% FR; n=59). O teste californiano de mastites (TCM) ainda não é uma prática frequente nas explorações, sendo utilizado, na grande maioria dos casos, apenas quando o produtor suspeita de mastite por observação de alterações a nível do leite e/ou úbere e/ou alterações comportamentais da vaca que não entra na máquina de ordenha voluntariamente. Desta forma, torna-se complicada a deteção de casos de mastite subclínica, destacando-se fortemente os casos de mastite clínica.

O período em que decorreu o estágio – inverno/primavera - é um período propício ao aparecimento de um maior número de casos de mastite. No inverno, assim como ao longo de todo o ano, as vacas permanecem na pastagem. No entanto, nesta altura do ano, é notória a dificuldade em manter a higiene de todos os equipamentos assim como a existência de locais com grande quantidade de lama, sobretudo na zona da máquina de ordenha, o que aumenta a predisposição para o aparecimento de mastites ambientais. Por outro lado, e relativamente ao que se observou na prática do dia-a-dia, existem vários procedimentos frequentes nas explorações e que constituem fatores de risco para a maior ocorrência de mastite, entre os quais: lavagem dos úberes utilizando uma esponja/pano partilhada entre todas as vacas ou a lavagem dos úberes com mangueira seguida da colocação das tetinas sem ser realizada a secagem dos tetos; não eliminação dos primeiros jatos que, quando executada, se faz para o chão não permitindo a observação clara dos mesmos; realização da ordenha maioritariamente de forma aleatória; existência de explorações onde não é realizada a desinfeção dos tetos antes e/ou após a ordenha e, mesmo que este procedimento seja realizado, é relativamente fácil o contacto dos tetos com a lama após a ordenha.

Em parte dos casos acompanhados o produtor já tinha realizado tratamento uma vez que é prática comum, no caso das mastites clínicas, o produtor efetuar tratamento e caso este não

resulte então solicitar a assistência do médico veterinário. As mastites serão detalhadamente desenvolvidas na segunda parte deste relatório.

Tabela 5. Afeções da glândula mamária, em número absoluto (n) e FR (%; n=73).

Afeções da glândula mamária	n	%
Mastite clínica	59	80,8
Edema do úbere	7	9,6
Obstrução do canal do teto	6	8,2
Abcesso no úbere	1	1,4
Total	73	100

1.3.1.5. Desequilíbrios metabólicos

A hipocalcemia clínica e a cetose clínica foram os dois principais desequilíbrios metabólicos encontrados sendo, no entanto, a hipocalcemia clínica aquela a que se assistiu em maior número de casos (75%; n=51) (tabela 6). O facto de o estágio ter decorrido durante toda a época alta de partos contribuiu para o elevado número de casos assistidos.

Tabela 6. Desequilíbrios metabólicos, em número absoluto (n) e FR (%; n=68).

Desequilíbrios metabólicos	n	%
Hipocalcemia clínica	51	75,0
Cetose clínica	17	25,0
Total	68	100

A hipocalcemia é uma doença metabólica frequente em bovinos de aptidão leiteira que ocorre nos primeiros dias pós-parto quando a vaca é incapaz de compensar a demanda súbita de cálcio necessário para a produção de colostro no momento do parto e início da lactação (Charbonneau *et al.*, 2006; Salgado-Hernández *et al.*, 2014). Segundo Radostits *et al.* (2007), uma vaca que produza 10Kg de colostro perderá 23g de cálcio numa única ordenha, o que é cerca de nove vezes a quantidade de cálcio presente em todo o plasma do animal. O cálcio que se perde a partir do plasma terá que ser repostado através do aumento da absorção intestinal e por reabsorção óssea.

A hipocalcemia subclínica caracteriza-se por baixas concentrações de cálcio no sangue (<7,5 mg/dL) (Retamal, 2011) e ocorre em cerca de 60% das vacas nas primeiras 24 horas após o parto, sendo mais frequente que a forma clínica (Salgado-Hernández *et al.*, 2014). Apesar da ausência de sinais clínicos, a hipocalcemia subclínica é igualmente prejudicial uma vez que predispõe ao desenvolvimento de outros distúrbios metabólicos e à diminuição da produção de leite e da fertilidade (Chaborneau *et al.*, 2006; Retamal, 2011; Salgado-Hernández *et al.*, 2014).

Relativamente à hipocalcemia clínica do pré-parto, grande parte dos casos ocorre nos últimos dias de gestação ou durante o parto. Alguns casos ocorrem algumas horas antes do parto ou mesmo no momento do parto, sendo que, nestes casos, não ocorre a segunda fase do parto

devido à inércia uterina provocada pela hipocalcémia. A grande maioria dos casos de hipocalcémia clínica ocorre dentro das primeiras 48 horas pós-parto podendo ocorrer até aos 10 dias pós-parto (Radostits *et al.*, 2007).

Com ou sem sinais óbvios, a hipocalcémia está associada a uma variedade de problemas secundários que ocorrem devido ao facto de os níveis de cálcio serem essenciais para a função dos músculos e nervos, particularmente funções de suporte do sistema músculoesquelético e da motilidade gastrointestinal (Retamal, 2011; Oetzel, 2013). As alterações em qualquer um destes aspetos podem desencadear uma cascata de efeitos negativos que originam a redução da ingestão de matéria seca, aumento das doenças metabólicas, diminuição da produção de leite e da fertilidade (Retamal, 2011; Oetzel, 2013). Desta forma, são animais mais predispostos a RMF, deslocamento de abomaso e mastite (Salgado-Hernández *et al.*, 2014).

Dos 51 casos de hipocalcémia clínica assistidos durante o estágio, 11 deles ocorreram no momento do parto, tendo-se assistido a este após ou ainda durante a administração IV de cálcio. Os restantes 40 ocorreram nas primeiras 48 horas pós-parto.

A hipocalcémia clínica pode dividir-se em três estádios, consoante os sinais clínicos observados (Oetzel, 2013):

- Primeiro estágio - a vaca mantém-se em estação. Ocorre uma breve fase de excitação e tetania com hipersensibilidade e tremor muscular na cabeça e membros. Pode observar-se protusão da língua e bruxismo, e a temperatura retal é, geralmente, normal. O animal apresenta rigidez dos membros posteriores, ataxia e cai facilmente (Radostits *et al.*, 2007; Oetzel, 2013).
- Segundo estágio - a vaca apresenta-se em decúbito esternal geralmente com torção lateral do pescoço ou com a cabeça apoiada no flanco, deprimida, com o focinho seco, pele e extremidades frias e a temperatura subnormal (36-38°C). Ocorre uma diminuição marcada da intensidade absoluta dos sons cardíacos e taquicardia, o pulso arterial é fraco e a pressão venosa baixa. Os olhos apresentam-se geralmente secos e fixos e o reflexo pupilar à luz é diminuído ou ausente. A estase ruminal e o timpanismo secundário são comuns e a alteração na defecação característica, podendo ainda observar-se relaxamento do ânus e perda de reflexo do esfíncter anal (Radostits *et al.*, 2007; Oetzel, 2013).
- Terceiro estágio - o animal apresenta-se em decúbito lateral, em estado comatoso, com flacidez muscular, sem resposta a estímulos sendo incapaz de se colocar em decúbito esternal. A temperatura corporal e o sistema cardiovascular apresentam uma depressão marcada. Os sons cardíacos são praticamente inaudíveis e ocorre um aumento dos batimentos cardíacos até aos 120bpm. É frequente a ocorrência de timpanismo devido ao decúbito lateral (Radostits *et al.*, 2007; Oetzel, 2013).

Segundo Oetzel (2013), a administração oral de cálcio é a melhor abordagem para os animais que se mantêm em estação – primeiro estágio – ou nos casos onde a hipocalcemia não é detetada – hipocalcemia subclínica. Nestes casos não é recomendada a administração IV de cálcio uma vez que originará um aumento rápido das concentrações de cálcio para níveis potencialmente perigosos que poderão causar complicações cardíacas fatais e diminuir a capacidade da própria vaca de mobilizar o cálcio de que necessita nesta fase crítica (Oetzel, 2013).

No caso de animais que se apresentem no segundo e terceiro estádios de hipocalcemia clínica deve ser realizado o tratamento imediato com a administração IV de 500mL de borogluconato de cálcio a 20% (Oetzel, 2013). A administração deve ser realizada lentamente enquanto o clínico monitoriza o batimento e ritmo cardíacos (figura 5) devendo esta ser imediatamente interrompida se existir evidência de arritmia. Em situações em que não existem outras complicações, os animais respondem imediatamente (cerca de cinco minutos) à administração IV de cálcio (Brozos *et al.*, 2011). É desejável que este tratamento seja realizado tão rápido quanto possível uma vez que a permanência em decúbito pode originar rapidamente lesões músculoesqueléticas graves (Oetzel, 2013).



Figura 5. Administração de cálcio IV a uma vaca com hipocalcemia clínica pós-parto.

São vários os métodos de prevenção da hipocalcemia clínica em bovinos de aptidão leiteira. Estes incluem o manejo da dieta durante o período de transição, a administração de cálcio oral na altura do parto e ainda, a administração de vitamina D imediatamente antes do parto a fim de aumentar a mobilização de cálcio. Quando a incidência de hipocalcemia clínica é superior a 10% em animais de alto risco (com três ou mais lactações) torna-se necessário definir um programa de controlo específico na exploração (Radostits *et al.*, 2007).

O baixo teor de cálcio das pastagens locais é uma das particularidades que contribui para o elevado número de casos verificados. Por outro lado, constatou-se que a quantidade de concentrado fornecida diariamente aos animais geralmente também não é suficiente para colmatar esta carência.

1.3.1.6. Sistema músculoesquelético

Tal como se pode observar na tabela 7, entre os casos clínicos que envolveram o sistema músculoesquelético destacam-se, com uma FR 32,5%, as claudicações originadas por patologia podal diversa, na maioria dos casos sem um diagnóstico definitivo, ou por laminite.

Tabela 7. Casos clínicos com envolvimento do sistema músculoesquelético, em número absoluto (n) e FR (%; n=34).

Sistema músculoesquelético	n	%
Claudicação	11	32,5
Parésia pós-parto por compressão dos nervos periféricos	9	26,5
Luxação coxo-femoral	6	17,6
Artrite/poliartrite	5	14,7
Fratura do metacarpiano MAE	1	2,9
Fratura do metacarpiano MAD	1	2,9
Fratura do metatarsiano MPE	1	2,9
Total	34	100

MAE - membro anterior esquerdo; MAD - membro anterior direito; MPE - membro posterior esquerdo.

A claudicação em bovinos leiteiros é uma condição debilitante e dolorosa que, para além de ser um importante problema de bem-estar animal, é também uma das afeções com maior impacto negativo ao nível da produção leiteira (Olmos *et al.*, 2009).

A etiologia das claudicações é multifatorial, sendo resultado das interações entre o meio ambiente, o manejo da exploração, a nutrição e a genética. Muitos dos fatores de risco estão relacionados com as próprias instalações (piso, ventilação, higiene, entre outros) e, como resultado, existe uma perceção de que as claudicações são um problema muito menor em sistemas sob condições de pastagem relativamente aos sistemas onde a estabulação é permanente (Olmos *et al.*, 2009). No entanto, de acordo com Rama (2006), resultados de estudos realizados na Nova Zelândia, país onde a produção leiteira se baseia em sistemas extensivos, revelaram valores de incidências de afeções podais que variaram entre dois e 38%, dependendo da exploração. Por outro lado, e de acordo com o mesmo autor, também têm sido reportados casos de laminite grave com uma redução de 70% na produção de leite e taxas de refugo de aproximadamente 60% em animais neste tipo de sistema de exploração.

Os fatores ambientais como a abundância de lama, a elevada humidade e os locais com grande quantidade de pedras, associados a fatores de manejo como o tipo de pastoreio e as longas caminhadas têm uma ação mecânica/traumática de grande importância na ocorrência destas afeções (Rama, 2006; Olmos *et al.*, 2009). Segundo Rama (2006), 75% das afeções podais na Nova Zelândia têm origem traumática. No entanto, a nutrição tem também um papel muito importante na ocorrência deste tipo de afeção (Rama, 2006; Olmos *et al.*, 2009).

Os fatores nutricionais interferem na incidência e severidade da claudicação por contribuírem para a ocorrência de laminite (Westwood & Lean, 2001). A alimentação das vacas em

explorações de regime extensivo baseia-se em pastagens compostas por uma ampla variedade de gramíneas e/ou leguminosas (Olmos *et al.*, 2009). A forragem é altamente digerível podendo muitas vezes ser rica em hidratos de carbono solúveis e proteína e pobre em fibra, o que predispõe a ocorrência de alterações a nível do rúmen. Para além disto, a própria ingestão de matéria seca pode ser variável, estando esta estreitamente relacionada com a qualidade da própria pastagem e com as condições ambientais. Tal pode originar um desequilíbrio entre a energia adquirida através da alimentação e a energia necessária para manter a produção de leite. São estes os dois principais fatores que, neste tipo de regime de produção leiteira, podem conduzir a acidose subclínica/clínica que aumentam o risco de laminite (Rama, 2006; Olmos *et al.*, 2009).

Apesar de se terem acompanhado apenas 11 consultas motivadas por claudicação, as afeções podais apresentam prevalência elevada na ilha devido às constantes movimentações dos animais entre pastos ou entre o pasto e a ordenha, por caminhos de alcatrão ou cobertos de cascalho. No entanto, muitas vezes os produtores acabam por solicitar diretamente o serviço de podologia corretiva, realizado pelos inseminadores, e não o serviço médico-veterinário, o que explica o facto do relativamente baixo número de casos acompanhados. Nos inquéritos de recolha de informação nas explorações (anexo I), realizados no âmbito do trabalho experimental que será apresentado na terceira parte deste relatório, apurou-se que as afeções podais são o problema mais frequente em 30% das explorações incluídas no estudo.

Dentro deste grupo foram ainda acompanhados casos de parésia pós-parto por compressão dos nervos periféricos, consequência de partos distócicos, casos de luxação coxo-femoral, que surgiram maioritariamente como consequência da descoordenação motora originada pela lesão de nervos periféricos resultante de partos distócicos. Os casos de artrites/poliartrites surgiram em vitelos, normalmente associadas a casos de onfalite compatíveis com FTIP. As fraturas dos metacarpianos ocorreram como consequência da assistência a partos mais complicados devido à exagerada força de tração exercida pelo produtor/empregado.

1.3.1.7. Outros casos

Neste grupo incluíram-se os casos clínicos que não foram englobados por nenhum dos sistemas anteriormente descritos, nomeadamente, casos de fotossensibilidade, papilomatose, onfalite, abcedação e um caso de intoxicação por nitratos (tabela 8).

Tabela 8. Afeções de origem diversa, em número absoluto (n) e FR (%), n=35).

Outros casos	n	%
Papilomatose	12	34,3
Abcedação	11	31,4
Fotossensibilidade	8	22,8
Onfalite	3	8,6
Intoxicação por nitratos	1	2,9
Total	35	100

A papilomatose bovina, que representa neste grupo uma frequência relativa de 34,3% (n=12), é uma doença que tem como etiologia um conjunto de vírus da família *Papillomaviridae*, que se manifesta pelo desenvolvimento de neoplasias benignas denominadas de “verrugas” (Özsoy *et al.*, 2011; Kavithaa *et al.*, 2014).

Os papilomas podem ocorrer em todas as idades, sendo mais frequentes nos animais mais jovens (com idade inferior a dois anos), nos quais regridem espontaneamente devido à resposta imunitária desenvolvida por estes (Salib & Farghali, 2011). As lesões associadas à papilomatose podem ocorrer na cabeça, face, pescoço e membros (vírus da papilomatose bovina (BPV) tipo 1 e BPV-2) (figura 6), tratos digestivo e urinário superiores (BPV-4), úbere e tetos (BPV-1, BPV-3, BPV-5, BPV-6) e epitélio genital (BPV-1) (Wilson *et al.*, 2009).

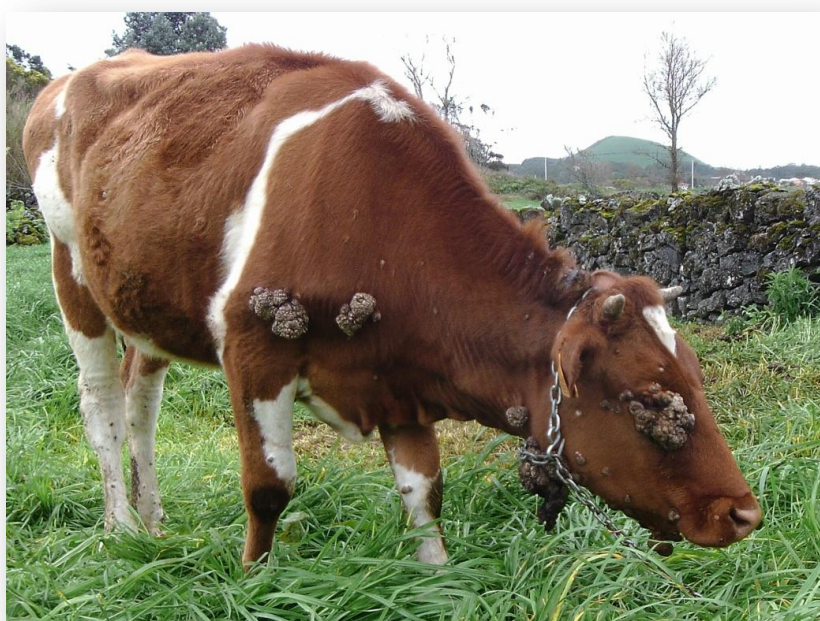


Figura 6. Lesões de papilomatose na cabeça, pescoço e membros de uma novilha.

A papilomatose propaga-se, principalmente, por contacto direto com animais infetados e a infeção desenvolve-se por exposição de lesões da pele ao papiloma vírus (Salib & Farghali, 2011). Em animais mais velhos, os papilomas encontram-se principalmente ao nível do úbere e tetos e a sua propagação ocorre através das tetinas, durante a ordenha e através das mãos dos ordenhadores. Normalmente não interferem na ordenha, no entanto, quando ulcerados podem causar dor (Kavithaa *et al.*, 2014).

A hereditariedade, os problemas nutricionais e hormonais, a exposição à luz solar e a imunossupressão são fatores que podem desempenhar um papel importante na patogénese da doença (Özsoy *et al.*, 2011). Segundo um estudo recente realizado por Kavithaa *et al.* (2014), a autohemoterapia é a terapia mais efetiva no tratamento da papilomatose do úbere e tetos. Embora existam referências relativamente à sua aplicação, a autohemoterapia é ainda um tema pouco estudado e conhecido, porém os casos assistidos durante o estágio e os

resultados relatados pelos médicos veterinários da AJAM, relativamente aos casos em que foi aplicada esta terapia, sugerem que esta pode ser, de facto, uma terapia útil e eficaz neste tipo de casos de papilomatose.

Apesar de não ter sido a causa de intervenção com maior expressão neste grupo, devido ao facto do período de estágio não coincidir com a época de maior incidência, a fotossensibilidade é um problema com alguma importância nos Açores. A fotossensibilidade (FTS) nos animais caracteriza-se por uma dermatite severa que resulta de uma reação exagerada das células cutâneas e tecidos dérmicos associados à exposição à luz solar, após a ingestão de plantas que possuem na sua constituição agentes fotodinâmicos (Quinn *et al.*, 2014). Tendo em conta a sua patogénese, a FTS pode ser classificada em primária, sem lesão hepática, e secundária ou hepatógena em que ocorre lesão hepática (Vidal, 2013).

Nos animais afetados, esta reação é mais severa nas zonas despigmentadas e/ou desprovidas de pelagem e ainda, nas áreas mais expostas à luz solar (Seixas *et al.*, 2007; Quinn *et al.*, 2014). Porém, a fotodermatite é um sinal clínico que pode ocorrer em diferentes grupos de doenças e para o seu diagnóstico é necessário associá-la aos achados anátomo-histopatológicos, que variam de acordo com o agente envolvido e com o grau de intoxicação. É importante determinar os níveis de filoeitrina no sangue ou na urina e os níveis da atividade sérica das enzimas hepáticas (Kelerman *et al.*, 2005 referido por Seixas *et al.*, 2007).

Nos Açores são comuns os relatos de FTS por produtores e com frequência são observadas sequelas de FTS na prática clínica e na inspeção sanitária no matadouro, o que resulta em prejuízos significativos tanto em função da rejeição de fígados para o consumo, como pela drástica redução na produção de leite (Seixas *et al.*, 2007). A forma secundária ou hepatógena é a mais importante nas explorações de bovinos dos Açores e resulta essencialmente da ingestão de esporos produzidos por um fungo saprófita (*Phitomyces chartarum*) que possui uma hepatotoxina – a esporodesmina - que provoca graves lesões hepáticas. Na sequência da disfunção hepática a filoeitrina não é excretada, mantém-se em circulação e atinge a pele, onde desencadeia reações fotoquímicas com ação citotóxica nos tecidos cutâneos e resposta inflamatória aguda da pele (Vidal, 2013).

Todos os anos, com maior incidência no período compreendido entre Agosto e meados de Outubro, ocorrem diversos casos de fotossensibilização. Esta doença encontra-se disseminada nas regiões que possuem condições climáticas propícias (temperatura e humidade elevadas) ao desenvolvimento do fungo *Phitomyces chartarum* e produção de esporos (Seixas *et al.*, 2007; Vidal, 2013). O animal apresenta anorexia, fotofobia, excitação, prurido e as áreas despigmentadas e glabras da pele apresentam hiperémia e ulceração (Figura 7). Numa fase mais avançada as zonas queimadas ficam escuras com a pele muito dura, desidratada, os animais apresentam-se ictéricos e o aborto ocorre frequentemente (Vidal, 2013).



Figura 7. Novilho com múltiplas lesões de fotossensibilidade.

De acordo com Vidal (2013), o tratamento consiste essencialmente em proporcionar o bem-estar dos animais, colocando-os em locais sombrios sem incidência de luz solar, retirar o alimento potencialmente tóxico e reduzir ou eliminar o consumo de alimentos verdes ricos em clorofila, administrar anti-inflamatórios e/ou anti-histamínicos e vitaminas. Segundo o mesmo autor, caso ocorra infecção da pele torna-se necessária a administração de antibiótico. O tratamento dos casos assistidos consistiu em colocar os animais em locais abrigados e sombrios e na administração de AINE (ácido tolfenâmico), de suplementos de vitaminas e minerais (Selepherol[®], Duphalyte[®], Fercobsang[®]), de um protetor hepático (Ornipural[®]) e ainda, na aplicação de *bolus* intra-ruminais de óxido de zinco.

Profilaticamente é recomendada a monitorização das pastagens, através da contagem de esporos e observação das condições climáticas favoráveis ao crescimento do fungo (humidade relativa do ar superior a 90% e temperatura mínima diária superior a 16 °C) e utilização de sais de zinco (Zn) (15-30mg Zn/Kg/dia) na água, no alimento, ou através de *bolus* intra-ruminais de libertação lenta de óxido de zinco (Munday *et al.*, 2001 citado por Seixas *et al.*, 2007).

1.3.1.8. Outras intervenções

Realizaram-se ainda três necrópsias, três eutanásias e 21 colheitas de tronco encefálico. Com a realização das necrópsias confirmaram-se um caso de síndrome da veia cava, um caso de reticuloperitonite traumática e um caso de úlcera do abomaso. As eutanásias corresponderam, na sua totalidade, a casos de vitelos com politraumatismos resultantes de ataques de cães, não havendo qualquer hipótese de recuperar estes animais. As colheitas de tronco encefálico foram efetuadas em animais mortos na exploração, com mais de 48 meses, no âmbito do plano de vigilância da encefalopatia espongiiforme bovina.

1.3.2. Clínica Cirúrgica

A área de Clínica Cirúrgica foi outra das quatro áreas de intervenção inicialmente definidas e as cirurgias realizadas representam 5,2% do total das intervenções. Na tabela 9 pode observar-se a distribuição das 73 cirurgias realizadas tendo estas sido agrupadas por região anatómica.

Tabela 9. Distribuição das intervenções na área de Clínica Cirúrgica por região anatómica, em número absoluto (n) e FR (%; n=73).

Intervenção		n	%
Sistema reprodutor	Resolução de prolapso uterino	8	11,0
	Cesariana	7	9,6
	Sutura vaginal	6	8,2
	Resolução de prolapso vaginal	3	4,1
Oftalmologia	Excisão de neoplasias da 3ª pálpebra	15	20,6
	Enucleação do globo ocular	3	4,1
Sistema digestivo	Abomasopexia paralombar esquerda	13	17,8
	Piloro-omentopexia paralombar direita	2	2,7
Glândula mamária	Remoção de tetos supranumerários	6	8,2
	Sutura do teto	3	4,1
Outros	Resolução de feridas originadas por ataques de cães	5	6,9
	Redução de hérnia umbilical	2	2,7
	Total	73	100

O sistema reprodutor foi aquele onde, no conjunto, se realizaram mais intervenções cirúrgicas (32,9% FR; n =24) englobando as cesarianas, as resoluções dos prolapso uterinos e vaginais e sutura de lacerações vaginais. As principais razões que conduziram à realização de cesarianas foram distócias que tiveram como causas principais a desproporção feto-maternal, dilatação cervical insuficiente ou ainda, torção uterina. As suturas vaginais realizaram-se sobretudo na sequência de lacerações vaginais originadas pela tração aquando do auxílio no parto. Por fim, os prolapso uterinos (figura 8a) cujo tratamento foi composto por três passos: preparação do útero através da remoção cuidadosa, sempre que possível, das membranas fetais e da sua limpeza e lavagem com água e iodopovidona diluída (figura 8b), reintrodução do útero (figura 8c) na cavidade abdominal e redução da eversão uterina e, por último, realização de uma sutura de retenção (o método utilizado na totalidade dos casos foi o de *Buhner*, figura 8d). Este método foi também a sutura de retenção eleita para todos os casos de prolapso vaginais, após a sua redução. O tratamento aplicado era ainda composto pela administração de antibioterapia (ceftiofur, 1mg/kg), de AINE (flunixin meglumina, 2,2mg/kg) e ainda, de ocitocina e de cálcio IV. Em alguns casos recorreu-se ainda à fluidoterapia e suplementação com ferro.



Figura 8. Resolução de prolapso uterino. **a:** prolapso uterino. **b:** lavagem do útero com água e iodopovidona diluída. **c:** reintrodução do útero na cavidade abdominal. **d:** realização da sutura de *Buhner*.

A excisão de neoplasias da terceira pálpebra foi, de todas, a intervenção cirúrgica mais frequente (n=15). Apesar de se terem assistido a apenas 15 intervenções cirúrgicas para extirpação de carcinomas oculares das células escamosas, foi possível constatar que esta é uma afeção com uma expressão muito marcada em São Miguel uma vez que se observou que, na grande maioria das explorações visitadas, existiam vários animais no efetivo com este tipo de neoplasia. Dentro dos principais fatores de risco associados ao desenvolvimento deste tipo de neoplasia destacam-se, neste tipo de sistema de exploração, os fatores ambientais, nomeadamente, a prolongada exposição à luz solar.

O carcinoma ocular das células escamosas é uma das neoplasias do olho mais comuns e importantes que resulta em elevadas perdas económicas, sobretudo devido ao refugo precoce e à reprovação de carcaças no matadouro (Pugliese *et al.*, 2014). É uma neoplasia primária de origem epitelial que pode ocorrer em diferentes tecidos oculares e perioculares, especialmente no epitélio da conjuntiva, na junção da córnea com a esclera, na membrana nictante (figura 9) e córnea e nas pálpebras (Tsujiita & Plummer, 2010; Ames, 2014).



Figura 9. Carcinoma das células escamosas na membrana nictitante de uma vaca Holstein-Frísia.

Existem vários fatores associados ao desenvolvimento do carcinoma das células escamosas, que incluem a despigmentação e a ausência de pelagem nas áreas onde a neoplasia se desenvolve; fatores hereditários; fatores ambientais, como a latitude, altitude e a exposição prolongada à luz solar; a idade e os hábitos alimentares (Daryoush *et al.*, 2011; Pugliese *et al.*, 2014). Apesar de já ter sido reportada em diferentes raças, esta neoplasia crônica e invasiva afeta predominantemente as raças Hereford (Weaver *et al.*, 2005; Tsujita & Plummer, 2010) e Holstein, tendo um pico de incidência em animais entre os seis e os oito anos de idade (Tsujita & Plummer, 2010; Ames, 2014). Para além destes fatores, a sua etiologia também tem sido associada a alguns agentes virais, especialmente ao BPV e ao herpesvírus tipos 1 e 5. A luz ultravioleta, os vírus e a despigmentação periocular são os fatores de risco epidemiológico mais importantes para o desenvolvimento desta neoplasia (Pugliese *et al.*, 2014)

Existem quatro fases de desenvolvimento do carcinoma das células escamosas nos bovinos: a primeira fase corresponde ao desenvolvimento de uma placa, pequena, saliente e com áreas de cor branca no tecido afetado; segue-se o desenvolvimento de queratomas, que correspondem à segunda fase e de papilomas (terceira fase) e, por fim, desenvolve-se o carcinoma (Tsujita & Plummer, 2010).

O diagnóstico baseia-se frequentemente na aparência clínica típica podendo, no entanto, ser confirmado rapidamente por exame citológico de esfregaços por aposição ou por exame histopatológico das amostras de biópsia. Nas lesões de maior desenvolvimento ocorre invasão dos tecidos subepiteliais e disseminação linfática ou vascular. A probabilidade de ocorrência de metástases varia com a localização do tumor primário, sendo que os tumores localizados nas pálpebras demonstram uma frequência mais elevada de metastização do que os tumores da córnea e do limbo (Tsujita & Plummer, 2010).

Existem vários protocolos de tratamento descrito, entre eles: a excisão cirúrgica e/ou enucleação, a crioterapia, a radioterapia, a imunoterapia e a quimioterapia (Tsujita & Plummer,

2010; Ames, 2014). A excisão das lesões é o método mais utilizado para o tratamento desta neoplasia. Nos casos de lesões com maior envolvimento tecidual, a enucleação geralmente é recomendada, tendo esta um prognóstico favorável se a cirurgia for realizada precocemente e se envolver a remoção completa do tecido neoplásico (Tsuji & Plummer, 2010).

As 15 intervenções cirúrgicas realizadas corresponderam à excisão da terceira pálpebra (figura 10) cuja realização, segundo Edwards (2010), não acarreta qualquer compromisso da saúde ocular. Todas as intervenções foram realizadas com o animal em estação, sendo imperativa uma boa contenção da cabeça. Realizou-se uma sedação ligeira, através da administração IV de xilazina a 2%, apenas nos animais que se verificou ser necessário. A anestesia foi realizada localmente através da infusão de cerca de 2mL de lidocaína a 2% na base da terceira pálpebra. Após realizada a anestesia local, são colocadas duas pinças hemostáticas entre a neoplasia e a base da terceira pálpebra sendo a excisão da lesão realizada com bisturi entre as duas pinças (figura 10a). Por último, remove-se a última pinça hemostática (figura 10b), podendo observar-se nesse momento uma pequena hemorragia que pode mesmo ser inexistente (figura 10c).



Figura 10. Excisão de carcinoma das células escamosas da terceira pálpebra. **a:** excisão da neoplasia. **b:** remoção da segunda pinça hemostática. **c:** hemorragia praticamente inexistente após remoção da segunda pinça hemostática.

No sistema digestivo está incluída a segunda intervenção cirúrgica mais frequentemente realizada - a abomasopexia paralombar esquerda para correção do deslocamento do abomaso à esquerda (n=13). Ao nível deste sistema realizou-se ainda a piloro-omentopexia paralombar direita para correção do deslocamento do abomaso à direita.

1.3.3. Profilaxia

A profilaxia é a terceira das quatro áreas de intervenção inicialmente definidas e representa uma frequência relativa de 21,2% (n=296). Os procedimentos profiláticos incluídos nesta área de intervenção foram a administração de *bolus* intra-ruminais, a desparasitação e a vacinação (tabela 10).

Tabela 10. Intervenções profiláticas, em número absoluto (n) e FR (%; n=73).

Profilaxia	n	%
Desparasitação	120	40,5
Vacinação	90	30,4
Administração de <i>bolus</i> intra-ruminais	86	29,1
Total	296	100

Nesta área de intervenção incluiu-se a vacinação contra os vírus do complexo respiratório bovino de 90 animais de um efetivo (FR 30,4%). A vacinação foi realizada mediante administração intramuscular, no pescoço, de 2mL da vacina *Hiprabovis*[®], por animal. Esta é uma vacina composta por vírus inativados que está indicada para prevenção de rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), vulvovaginite postular infecciosa e diarreia viral bovina (BVD) em bovinos adultos e IBR, parainfluenza 3, BVD e pneumonia por vírus respiratório sincicial bovino em bezerros. O protocolo de vacinação que foi aplicado é o aconselhado pela *European Medicines Agency* (EMA, 2011): vacinação com uma dose e revacinação passados 21-30 dias. A primeira injeção pode ser administrada a bezerros a partir dos três meses de idade. Posteriormente, de seis em seis meses, é administrada uma dose de reforço.

Apesar da doença respiratória ser um problema muito importante e muito frequente em São Miguel, verificou-se que são raros os produtores que optam pela vacinação dos seus animais.

Relativamente à administração de *bolus* intra-ruminais, as 86 intervenções correspondem à administração de *bolus* intra-ruminais de libertação lenta de óxido de zinco para profilaxia de casos de FTS num efetivo que permanecia em pastagens consideradas problemáticas, tendo-se mesmo diagnosticado dois casos de FTS nos dias anteriores a estas administrações. A desparasitação profilática foi realizada em todos os animais jovens, machos e fêmeas, pertencentes ao mesmo produtor que, a propósito da manipulação dos animais para administração dos *bolus* intra-ruminais, solicitou também a sua desparasitação. Em todos os casos a desparasitação foi realizada mediante injeção subcutânea de ivermectina (*Noromectin*[®]), na dose de 200 µg/kg.

1.3.4. Acompanhamento reprodutivo

O acompanhamento reprodutivo é a última das três áreas de intervenção inicialmente definidas e representa 26,7% (n=372) da totalidade das intervenções efetuadas. No decorrer de todo o estágio foi possível a participação em algumas das visitas para acompanhamento reprodutivo dos efetivos de seis explorações. Por norma, estes acompanhamentos são realizados

quinzenalmente e, nas explorações onde é praticado um regime de pastoreio permanente, decorrem em simultâneo com a ordenha devido à dificuldade de manipulação dos animais na pastagem. Na tabela 11 encontram-se referidas todas as intervenções realizadas no âmbito das referidas visitas de acompanhamento reprodutivo.

Tabela 11. Intervenções efetuadas durante os programas de acompanhamento reprodutivo, em número absoluto (n) e FR (%; n=372)

Acompanhamento reprodutivo	n	%
Diagnóstico de gestação	250	67,2
Avaliação pós-parto	49	13,2
IA	34	9,1
Indução de estro	27	7,3
Sincronização da ovulação (protocolo <i>Ovsynch</i>)	7	1,9
Aplicação de CIDR	5	1,3
Total	372	100

IA – inseminação artificial; CIDR - *controlled internal drug release*.

Os diagnósticos de gestação foram realizados, na sua totalidade, por palpação transretal entre os 35 e os 45 dias após IA. Nos animais positivos ao diagnóstico de gestação, era realizado um novo exame aos 90 a 120 dias após IA, para confirmação da gestação. As avaliações pós-parto eram realizadas cerca de 20 dias após o parto a fim de se avaliar o estado de involução uterina, de atividade ovárica e de eventuais lesões palpáveis no trato reprodutivo.

As 27 induções de estro referidas na tabela 11 correspondem aos casos em que o estro foi induzido através da aplicação de uma única dose luteolítica de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Devido ao facto da $\text{PGF}_{2\alpha}$ não ter qualquer efeito sobre os folículos em desenvolvimento, nem qualquer controlo sobre a onda de folículos emergente, as vacas às quais é aplicado um protocolo deste tipo iniciarão o período de estro em dias diferentes depois da sua administração, havendo pouca precisão sobre o momento da inseminação ou da ovulação (Cavaliere *et al.*, 2006). O tempo entre a administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e a ovulação depende do estado do desenvolvimento folicular, no momento do tratamento. Se estiver presente um folículo dominante funcional no momento da administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$, os animais entrarão em estro no espaço de dois a três dias. No entanto, se a aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ for realizada na fase de pré-dominância da onda folicular será necessário um período adicional de dois a quatro dias para que um folículo se torne dominante, o que alonga e torna mais variável o intervalo desde o tratamento ao início do estro (Diskin *et al.*, 2002). O protocolo de sincronização acima descrito encontra-se representado na figura 11.

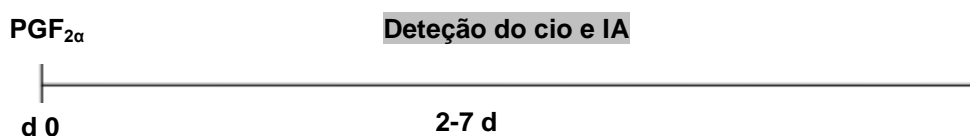


Figura 11. Representação esquemática do protocolo para sincronização de estro baseado na administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ apenas às vacas com um corpo lúteo e deteção do cio nos 2-7 dias seguintes.

A sincronização da ovulação recorrendo ao protocolo *Ovsynch* tem como objetivo principal permitir a IA a tempo fixo sem necessidade de deteção deaios. Foi utilizado sobretudo em casos de vacas com estros “silenciosos”. Este protocolo consiste na administração da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH) ou análogos numa altura aleatória do ciclo éstrico (Santos *et al.*, 2003). Esta primeira administração induz a ovulação ou a luteinização do folículo dominante (dependendo da fase do ciclo éstrico em que a vaca se encontra), sincroniza a onda de folículos emergente e controla o estado de desenvolvimento do folículo pré-ovulatório antes da administração da PGF_{2α}, que é realizada sete dias depois da administração de GnRH. A PGF_{2α} induz a regressão do corpo lúteo original e/ou do corpo lúteo induzido (Thatcher *et al.*, 2006). Uma segunda administração de GnRH é realizada 48h mais tarde para induzir um pico pré-ovulatório da hormona luteinizante (LH) e a ovulação subsequente do folículo dominante, no espaço de 24 a 32 horas (Pursley & Bello, 2007). A inseminação a tempo fixo, irá ocorrer 12 a 16 horas mais tarde, no dia 10 após a primeira administração de GnRH (Chastant-Maillard, 2006) (Figura 12).



Figura 12. Representação esquemática do protocolo *Ovsynch*.

A aplicação do dispositivo intravaginal libertador de progesterona (CIDR[®]) foi outra das intervenções realizadas no âmbito das visitas de acompanhamento reprodutivo das explorações. O CIDR[®] é um dispositivo intravaginal impregnado com progesterona e que é utilizado para a sincronização do estro e indução da ciclicidade nas vacas (Cavalieri *et al.*, 2006). Este dispositivo intravaginal está indicado na sincronização de novilhas e vacas pós-parto, especialmente para aquelas que revelam problemas no reinício da atividade ovária, sendo considerado o tratamento de eleição para animais em anestro (Lane *et al.*, 2008). O protocolo de tratamento mais comum é a aplicação do CIDR[®] no dia zero que permanece sete dias, associado à administração de PGF_{2α} no dia seis ou sete (figura 13). Este protocolo pode ser melhorado através da inclusão de uma administração de GnRH na altura da aplicação do CIDR[®], com o objetivo de favorecer o recrutamento de uma nova onda folicular (Santos *et al.*, 2003).

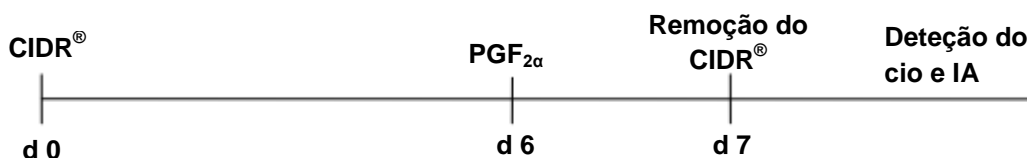


Figura 13. Representação esquemática do protocolo de sincronização à base de progesterona.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Anatomia e fisiologia da glândula mamária

As quatro glândulas mamárias dos bovinos de aptidão leiteira são consolidadas numa massa única, o úbere. O aspeto do úbere varia muito, dependendo da maturidade e do estado funcional, bem como de características individuais e raciais. O úbere divide-se em quartos, que correspondem às quatro glândulas. Cada um contém um teto principal podendo, por vezes, existir tetos acessórios comumente associados a tecido glandular funcional, particularmente nos quartos posteriores (Dyce *et al.*, 2004). O teto e, particularmente, o canal do teto desempenham funções muito relevantes na prevenção de infeções do úbere (Teixeira *et al.*, 2008; Biggs, 2009; Morin, 2009).

Atualmente, o úbere dos bovinos de aptidão leiteira tem uma enorme capacidade para produzir e armazenar leite, sendo comum picos de produção de 40 a 50 litros de leite por dia (Biggs, 2009). Assim, o úbere pode pesar mais de 30Kg e suportar até o dobro do seu peso. Uma das adaptações anatómicas importantes do úbere, que permite que os animais transportem elevadas quantidades de leite, é o desenvolvimento de um possante sistema de suspensão, que inclui um conjunto de três ligamentos diferentes: os ligamentos superficiais laterais, os ligamentos profundos laterais e os ligamentos médios (Davidson & Stabenfeldt, 2004; Blowey & Edmondson, 2010). Para além disto, é fundamental que exista um vasto suprimento de nutrientes necessários à produção de elevadas quantidades de leite. Assim, para a produção de um litro de leite, fluirão pelo úbere 400 a 500 litros de sangue, o que num bovino de aptidão leiteira corresponde a, aproximadamente, 280mL de fluxo de sangue por segundo (Biggs, 2009).

Histologicamente, a glândula mamária é uma glândula exócrina, destinada à secreção de leite. A estrutura interna do úbere é constituída por parênquima glandular e por tecido conjuntivo. O parênquima é o tecido secretor, que inclui um sistema de ductos e lobos. Os lobos são constituídos por vários lóbulos, formados por grupos de alvéolos e os seus ductos adjacentes (figura 14) (Davidson & Stabenfeldt, 2004; Dyce *et al.*, 2004; Lopez, 2011).

As células que sintetizam o leite, denominadas células epiteliais, estão dispostas em centenas de alvéolos, cada um com um lúmen central. Os principais componentes do leite, tais como a caseína, a lactose e a gordura, são sintetizadas pelas células epiteliais e segregadas para o lúmen, onde se combinam com outros componentes para formar o leite. Uma parte do leite sintetizado entre ordenhas (a fração da cisterna) é drenado dos alvéolos através de uma série de ductos que vão alargando progressivamente para ser posteriormente armazenado nas cisternas da glândula e do teto. No entanto, grande parte do leite (fração alveolar) permanece nos alvéolos até que ocorra a ejeção do leite. Na ordenha, quando ocorre estimulação táctil dos tetos, os recetores sensíveis à pressão existentes na pele dos mesmos, desencadeiam um reflexo neuro-hormonal que conduz à libertação, por parte da hipófise, de ocitocina na corrente

sanguínea. Também os estímulos auditivos, visuais e olfativos, que ocorrem perto ou dentro da sala de ordenha, podem induzir a liberação de ocitocina. O leite é ejetado quando as células mioepiteliais que rodeiam os alvéolos e ductos adjacentes se contraem em resposta à ligação com a ocitocina. Por esta razão, a ativação do sistema nervoso simpático, que ocorre em situações de stresse ou excitação, pode inibir a liberação de ocitocina pela hipófise ou a ligação da ocitocina às células mioepiteliais, impedindo assim a ejeção do leite (Davidson & Stabenfeldt, 2004; Morin, 2009).

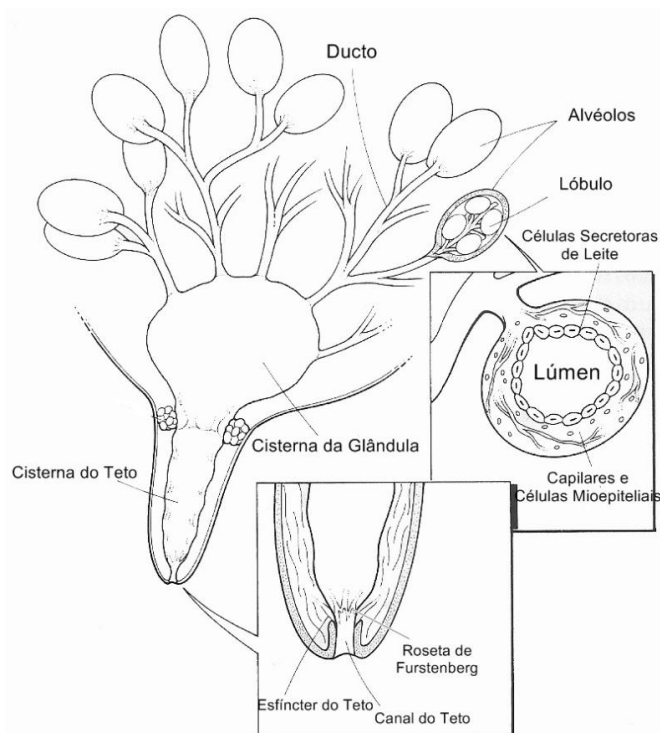


Figura 14. Anatomia da glândula mamária (adaptado de Biggs, 2009).

No decurso natural da lactação, a qual está estandardizada em 305 dias, as células produtoras do leite vão degenerando, seguindo-se uma fase de regeneração celular que decorre ao longo do período seco, preparando-se assim o úbere para a próxima lactação. Durante o período seco há uma perda de tecido alveolar que se denomina por involução da glândula mamária (Teixeira *et al.*, 2008).

2.2. A mastite bovina

Mastite (*mast*: mama, *itis*: inflamação) é a inflamação do parênquima da glândula mamária, independentemente da causa (Radostits *et al.*, 2007). A inflamação deve-se, com maior frequência, a uma resposta patofisiológica à invasão e multiplicação de microrganismos, maioritariamente bactérias (Biggs, 2009), podendo no entanto, ser causada por lesões químicas, térmicas e físicas (Biggs, 2009; Tiwari *et al.*, 2013). Existem muitas bactérias com capacidade de causar infeção da glândula mamária e a resposta desencadeada pelo hospedeiro a essas infeções é o que se reconhece como mastite (Schukken *et al.*, 2014). Se os

mecanismos de defesa da glândula mamária combaterem a infecção de forma rápida e eficaz a mastite será apenas ligeira e transitória. No entanto, quando os mecanismos de defesa estão comprometidos (p. ex., durante o período periparto) ou quando o agente patogénico é capaz de resistir aos mecanismos de defesa do hospedeiro (p. ex., resistindo à fagocitose), pode desencadear-se uma mastite mais severa (Morin, 2009). A inflamação resulta numa série de alterações físicas, químicas e, frequentemente, bacteriológicas do leite e ainda, alterações patológicas do tecido glandular (Radostits *et al.*, 2007).

2.2.1. Etiologia

A mastite pode ser originada por uma grande variedade de agentes patogénicos que, quanto ao tipo, podem ser divididos em agentes patogénicos maiores e menores. Esta divisão baseia-se na severidade da mastite, como por exemplo, no aumento da CCS e na ocorrência de mastite clínica (Leelahapongsathon *et al.*, 2014).

- Agentes maiores - os agentes designados “maiores” incluem os microrganismos que frequentemente originam episódios de mastite clínica, possuem baixas taxas de cura ou que são facilmente transmitidos entre animais, tendo portanto um grande impacto sobre a saúde do úbere. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Mycoplasma bovis* são alguns destes agentes (Hassan *et al.*, 2009 referido por Bexiga, 2011).
- Agentes menores - os agentes designados “menores” são aqueles que se encontram normalmente na pele do úbere (Biggs, 2009) e que não apresentam nenhuma das características acima referidas (Bexiga, 2011). Os agentes patogénicos menores incluem os *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN), *Corynebacterium bovis* (Biggs, 2009) e outras espécies do género *Corynebacterium* (Bexiga, 2011).

Quanto à origem da infecção, os agentes podem ser classificados em contagiosos ou ambientais, com base no seu reservatório primário e no modo de transmissão (Biggs, 2009).

As mastites contagiosas são causadas por bactérias que se multiplicam sobretudo em lesões do teto e que se transmitem de uns animais para outros (Biggs, 2009; Awale *et al.*, 2012; Tiwari *et al.*, 2013). O úbere de vacas com mastite subclínica serve de reservatório primário para os agentes contagiosos e as infeções disseminam-se entre vacas ou entre os quartos mamários durante a ordenha por meio de equipamentos contaminados, mãos dos ordenhadores, ou através da utilização dos mesmos panos de secagem dos tetos em vários animais (Ruegg, 2011). Dentro dos agentes contagiosos incluem-se: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e *Mycoplasma* spp. (George *et al.*, 2008; Blowey & Edmondson, 2010), *Streptococcus dysgalactiae* e *Corynebacterium bovis* (Blowey & Edmondson, 2010), sendo os dois primeiros, agentes contagiosos maiores que originam CCS persistentemente elevadas e redução da produção de leite (Morin, 2009). Segundo Ruegg (2011), na maioria dos casos, quartos com

mastite subclínica originada por agentes contagiosos apresentam CCS que variam entre as 200.000 céls/mL e mais de 10.000.000 céls/mL.

O termo “mastite ambiental” refere-se à mastite causada por um vasto grupo de microrganismos cujo principal reservatório é o meio ambiente (Smith & Hogan, 2008; Morin, 2009; Ruegg, 2011). As fontes de infecção mais comuns são as fezes, as camas, o solo e a água contaminada. Os agentes ambientais podem ainda ter acesso ao canal do teto e à cisterna se a extremidade do teto não for adequadamente desinfetada antes da administração de terapia intramamária ou quando é utilizada uma cânula contaminada (Smith e Hogan, 2008; Morin, 2009). Os microrganismos ambientais tendem a ser menos adaptados à sobrevivência na glândula mamária e, por esse motivo, estimulam frequentemente uma resposta inflamatória aguda que resulta, normalmente, em sinais clínicos ligeiros a moderados (Ruegg, 2010). A mastite ambiental caracteriza-se, na maioria dos casos, pela sua curta duração, sendo que apenas uma pequena percentagem (<15%) dos animais afetados desenvolvem infecções subclínicas crónicas (Ruegg, 2004). As infecções intramamárias (IIM) com agentes ambientais ocorrem principalmente durante o período seco (Radostits *et al.*, 2007; Molina *et al.*, 2013).

Os agentes ambientais incluem *Streptococcus uberis*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Trueperella pyogenes*, *Nocardia* spp., *Bacillus* spp., leveduras, fungos e algas (Smith & Hogan, 2008; Blowey & Edmondson, 2010).

2.2.2. Classificação clínica da mastite

As mastites podem ser divididas consoante a evidência ou não de sinais clínicos em mastite clínica e mastite subclínica (Teixeira *et al.*, 2008).

- Mastite clínica - pode estar associada a uma ampla variedade de microrganismos e podem ocorrer vários episódios na mesma lactação (Hertl *et al.*, 2014). Caracteriza-se por alterações visíveis no leite, que incluem a presença de grumos, coágulos ou até mesmo presença de sangue, e por alterações visíveis no úbere que se pode apresentar inflamado, doloroso e quente (Schukken *et al.*, 2014). Os episódios de mastite clínica estão associados a uma redução marcada da produção de leite, decréscimo da fertilidade e risco aumentado de refugo precoce (Hertl *et al.*, 2014).
- Mastite subclínica - o úbere não evidencia sinais externos, sendo esta identificada somente através do recurso a provas laboratoriais ou de campo, como a CCS ou a realização do TCM, entre outros (Teixeira *et al.*, 2008). Caracteriza-se por um aumento da CCS, diminuição da produção de leite e, em muitos casos, elevado risco de refugo precoce (Schukken *et al.*, 2014). A mastite subclínica é a forma mais comum, podendo ser 15 a 40 vezes mais frequente que a mastite clínica (Biggs, 2009).

Relativamente ao tipo de resposta do sistema imunitário, a mastite clínica pode ser classificada em mastite hiperaguda, aguda, subaguda e crónica (Radostits *et al.*, 2007; Awale *et al.*, 2012).

- Mastite hiperaguda – é uma inflamação severa de início repentino que resulta num quarto quente, edemaciado com uma secreção anormal, frequentemente aquosa, e acompanhada por sinais sistêmicos severos, que podem ser fatais em alguns casos (Radostits *et al.*, 2007; Biggs, 2009). Os sinais de doença sistêmica surgem muitas vezes antes de serem detetadas alterações a nível do leite e do úbere e devem-se frequentemente a septicémia ou toxémia, originando pulso rápido, febre, depressão, diminuição da motilidade ruminal, perda de apetite e diarreia. Este tipo de mastite pode fazer cessar a produção de leite (Biggs, 2009).
- Mastite aguda - caracteriza-se frequentemente pelo aparecimento súbito de uma inflamação moderada a severa do úbere com diminuição da produção de leite e, por vezes, secreção aquosa, sendo no entanto mais frequente o aparecimento de flocos. Os sinais sistêmicos são semelhantes aos anteriormente descritos sendo, neste caso, menos severos (Biggs, 2009).
- Mastite subaguda - caracteriza-se por inflamação ligeira, com alterações persistentes do leite. Não se verificam sinais de doença sistêmica (Radostits *et al.*, 2007; Biggs, 2009).
- Mastite crónica - persiste por um longo período de tempo mas, normalmente, sem grande intensidade (Blowey & Edmondson, 2010). Numa mastite crónica, a única alteração visível é ao nível do leite que, periodicamente, se apresenta viscoso e de cor alterada. O úbere pode apresentar regiões com consistência alterada à palpação, resultantes de tecido necrótico e cicatricial aglomerado, característicos de infeções crónicas por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Teixeira *et al.*, 2008).

2.3. Fatores de risco para a ocorrência de mastite

A mastite bovina é uma doença de ocorrência complexa na qual estão envolvidos muitos fatores. Os microrganismos são responsáveis pela infeção, no entanto, para que exista invasão da glândula mamária e para que se estabeleçam a ponto de causar inflamação, existe o envolvimento de múltiplos fatores (Awale *et al.*, 2012). A identificação dos fatores de risco da mastite é essencial no desenvolvimento de programas de prevenção e controlo das mesmas (McDougall *et al.*, 2009).

Os fatores de risco que predis põem a ocorrência de mastite distribuem-se por três grupos: fatores de risco associados ao animal, fatores de risco ambientais e fatores de risco relacionados com o agente patogénico (Radostits *et al.*, 2007).

2.3.1. Fatores de risco associados ao animal

2.3.1.1. Raça

De uma forma geral, a incidência de mastite é superior em bovinos da raça Holstein-Frísia relativamente a bovinos de raça Jersey (Radostits *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2012). De acordo com Sharma *et al.* (2012), as diferenças de suscetibilidade entre raças poderão dever-se a diferenças na resposta imunitária das diferentes raças face a IIM.

2.3.1.2. Idade e número de lactações

Vários autores referem que a ocorrência de mastite em quartos infetados aumenta com a idade e número de lactações, atingindo os valores mais elevados aos sete anos de idade. As vacas mais velhas (sete a nove anos) são mais suscetíveis, sobretudo a mastite subclínica, devido a lesões no interior da glândula mamária, ao desgaste sofrido pelo esfíncter do teto e da própria glândula e ao relaxamento dos ligamentos do úbere (Prestes *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2012). Por outro lado, a maior eficiência dos mecanismos de defesa inata nos animais mais jovens é uma das possibilidades que os torna menos suscetíveis à infeção (Tiwari *et al.*, 2013).

2.3.1.3. Fase da lactação

A incidência de mastite é superior durante o período pós-parto (primeiros dois meses de lactação) e nas primeiras duas a três semanas do período seco, especialmente com agentes ambientais. Nas novilhas, a prevalência de infeções é frequentemente mais elevada no último trimestre da gestação e alguns dias antes do parto (Radostits *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2012).

2.3.1.4. Características morfológicas do úbere e tetos

Úberes muito grandes, quartos posteriores mais baixos que os anteriores, tetos compridos e/ou largos favorecem o acesso dos agentes infecciosos ao interior da glândula mamária (Awale *et al.*, 2012; Tiwari *et al.*, 2013). Outro fator predisponente importante é a existência de tetos supranumerários que providenciam reservatórios adicionais aos microrganismos causadores de mastite (Tiwari *et al.*, 2013).

2.3.1.5. Alterações e lesões do úbere e tetos

A eficácia dos mecanismos de defesa locais, que formam uma primeira barreira de defesa, depende da integridade dos tecidos que constituem o teto/úbere (Radostits *et al.*, 2007). O canal do teto é a principal porta de entrada dos microrganismos patogénicos e, por esse motivo, qualquer lesão no teto faz deste o fator de risco mais importante para a IIM. As alterações sobretudo ao nível da pele da extremidade do teto e do canal do teto favorecem a penetração das bactérias no úbere e aumentam o risco de ocorrência de nova mastite (Sharma *et al.*, 2012). As lesões provocadas pela máquina de ordenha, a hiperqueratose do epitélio, secundária a lesões primárias, e a excessiva dilatação do canal do teto devido a administrações medicamentosas intramamárias são exemplos de traumatismos físicos que predis põem a infeções secundárias por microrganismos (Teixeira *et al.*, 2008).

2.3.1.6. Higiene do úbere e tetos

Úberes sujos estão associados a CCS elevadas e a um aumento da prevalência de IIM (Radostits *et al.*, 2007). Num estudo realizado por Schreiner & Ruegg (2003), no qual a higiene dos úberes foi classificada entre o grau um (limpos) e o grau quatro (sujos) (figura 15), a CCS e os casos de mastite subclínica foram significativamente superiores em animais cujo úbere foi classificado como “sujo”, tendo sido isoladas quantidades superiores de agentes contagiosos e

ambientais a partir de amostras de leite pertencentes a estes animais. Segundo Ruegg (2004), úberes classificados em grau três ou quatro apresentam risco acrescido de ocorrência de mastite.



Figura 15. Classificação do grau de higiene do úbere. Grau 1: limpo; Grau 2: ligeiramente sujo (2-10%); Grau 3: moderadamente sujo (10-30%); Grau 4: Sujo (> 30%) (adaptado de Ruegg, 2004).

2.3.1.7. Estado de nutrição

A nutrição tem um efeito direto sobre o sistema imunitário da vaca e, por conseguinte, irá influenciar de forma indireta a resistência à infecção e a severidade da inflamação. Alguns nutrientes específicos encontram-se fortemente relacionados com o ótimo desempenho da função imunitária, entre eles: as vitaminas e os minerais, tais como as vitaminas A e E, o selênio, o cobre e o zinco (Ryn, 2009; Bruno, 2010).

A vitamina E e o selênio são componentes integrantes da defesa antioxidante dos tecidos e células. As carências destes elementos resultam em alterações da atividade dos polimorfonucleares (O'Rourke, 2009), fazendo com que a suplementação com selênio e vitamina E seja das mais importantes para o aumento da capacidade de resposta do sistema imunitário da vaca (Bruno, 2010; Tiwari *et al.*, 2013) e, conseqüentemente, para a diminuição da incidência de mastite (Bruno, 2010).

A vitamina A e os β -carotenos desempenham um papel essencial na manutenção da integridade do tecido epitelial e da mucosa da glândula mamária o que contribui para prevenir a entrada de agentes patogênicos na glândula mamária (Heinrichs *et al.*, 2009; O'Rourke, 2009; Bruno, 2010).

O zinco tem atividade oxidante e promove a reparação celular e a cicatrização de feridas (Tiwari *et al.*, 2013). A suplementação com zinco é ainda essencial para a formação do tampão de queratina no canal do teto (O'Rourke, 2009). O cobre é um componente da ceroplasmina e da enzima superóxido dismutase, reduz a incidência de mastite no periparto, especialmente por coliformes (Heinrichs *et al.* 2009).

De acordo com Biggs (2009), a nutrição poderá ainda influenciar a ocorrência de mastite de forma indireta, através do seu efeito sobre a consistência das fezes. Segundo este autor, uma

dieta bem formulada permite que a consistência das fezes seja adequada e, conseqüentemente, não exista uma excessiva contaminação fecal dos tetos, reduzindo o risco de desenvolvimento de mastites ambientais.

2.3.1.8. Genética

Existem diversos fatores morfológicos, fisiológicos e imunológicos que contribuem para a resistência ou suscetibilidade dos bovinos à mastite, e cada um destes fatores pode ser influenciado em parte pela hereditariedade (Radostits *et al.*, 2007). Estes incluem a resistência natural, o tamanho e a conformação do teto, o posicionamento dos tetos, a distância relativa entre os tetos, a produção de leite e o teor de gordura no leite (Tiwari *et al.*, 2013), e devem ser tidos em conta quando se faz a seleção dos animais. No entanto trabalhos citados por Biggs (2009) indicam que apenas 10% da resistência à mastite pode ser atribuída à genética.

A suscetibilidade genética à mastite está diretamente relacionada com a capacidade de produção de leite, sendo que quanto maior a quantidade de leite produzido e quanto maior o teor de gordura no leite, maior a suscetibilidade à IIM (Biggs, 2009; Tiwari *et al.*, 2013). Segundo Radostits *et al.* (2007), a correlação genética positiva (0,2 a 0,3) que existe entre a produção de leite e o aparecimento de mastite sugere que os genes que originam um aumento da produção de leite tendem a um aumento da suscetibilidade à mastite. Desta forma, a seleção genética no sentido de se obterem animais de maior produção leiteira tem levado a um aumento da incidência de IIM (Radostits *et al.* 2007).

2.3.1.9. Ocorrência de outras doenças

A ocorrência de outras doenças como a laminite (Breen *et al.*, 2009) e, em particular doenças do periparto tais como hipocalcemia, metrite, deslocamento do abomaso (Biggs, 2009), cetose (O'Rourke, 2009) e RMF (Breen *et al.*, 2009) irão aumentar a suscetibilidade à mastite. Existem ainda agentes específicos, tal como o BVDV, que causam imunossupressão generalizada, resultando num aumento da suscetibilidade a IIM (Biggs, 2009). Num estudo realizado por Zadoks *et al.* (2001) a infecção com herpes vírus bovino tipo 4 foi um fator de risco significativo, aumentando a suscetibilidade às IIM, especialmente por *S. aureus*.

2.3.2. Fatores de risco ambientais e de manejo

2.3.2.1. Higiene e manejo das instalações

A limpeza e o conforto das instalações são dois aspetos muito importantes a ter em consideração. As camas e os espaços sujos, juntamente com uma má ventilação e condições de humidade ideais para os microrganismos, favorecem o crescimento e multiplicação de bactérias, levando ao aumento da contaminação e desenvolvimento de IIM (Radostits *et al.*, 2007; Morin, 2009).

O material utilizado nas camas é dos aspetos mais importantes no desenvolvimento de microrganismos. Os materiais orgânicos, como a palha, a serradura e as aparas de madeira

são meios que aumentam o crescimento dos microrganismos devendo, por esse motivo, optar-se por materiais inorgânicos, tais como a areia, que retêm menos humidade e não proporcionam uma fonte de nutrientes aos agentes patogénicos, expondo os animais a menor quantidade bacteriana (Hogan & Smith, 2003; Radostits *et al.*, 2007). Para além disso, é importante que as camas possuam dimensões adequadas a fim de evitar conspurcações excessivas e o aparecimento de lesões (Radostits *et al.*, 2007).

O tamanho da exploração constitui igualmente um importante fator de risco, notando-se um aumento de incidência de mastites clínicas em explorações com efetivos superiores, uma vez que existe maior dificuldade no controlo da propagação de agentes entre animais, principalmente de agentes contagiosos (Radostits *et al.*, 2007).

O controlo de insetos é outro aspeto importante do maneio das explorações uma vez que estes causam lesões ao nível da extremidade do teto e atuam como vetores, disseminando os agentes causadores de mastite entre vacas (McDougall *et al.*, 2009; Arnold & Bewley, 2011; Nickerson, 2014).

Relativamente às explorações em sistema extensivo, os animais mantidos na pastagem, geralmente, têm um risco mais reduzido de desenvolverem mastite quando comparados com animais confinados. No entanto, algumas condições da pastagem, como zonas baixas alagadas e/ou sombrias e zonas de maior concentração dos animais, favorecem o desenvolvimento de microrganismos ambientais, aumentando probabilidade de contaminações (Prestes *et al.*, 2002; Smith & Hogan, 2008).

2.3.2.2. Maneio e higiene da ordenha

Os equipamentos da ordenha e todos os procedimentos nela envolvidos, seja mecânica ou manual, podem influenciar direta ou indiretamente a saúde da glândula mamária (Prestes *et al.*, 2002). A higiene de todos os equipamentos e procedimentos da ordenha constitui um importante fator de risco, tendo esta uma influência considerável na taxa de novas infeções quer por agentes contagiosos quer por agentes ambientais (Prestes *et al.*, 2002; Biggs, 2009). Para além da higiene, o inadequado funcionamento da máquina de ordenha é outro fator de risco muito importante, uma vez que irá originar lesões ou alterações na pele do teto, canal do teto e mucosa, tornando-o mais suscetível à infeção (Biggs, 2009; Jones, 2009).

Desta forma, a rotina diária das práticas e correto maneio da ordenha são as principais medidas preventivas que podem diminuir o número de animais com mastites clínicas e subclínicas, reduzir a taxa de novas infeções, diminuir a CCS do efetivo e melhorar a qualidade do leite produzido (Rupp *et al.*, 2000). Medidas simples como a formação dos ordenhadores em aspetos como a higiene pessoal e dos próprios animais, a ordem da ordenha, devendo os animais com mastite ser sempre ordenhados após os restantes ou separadamente, a utilização de luvas descartáveis durante todo o processo da ordenha, a eliminação e exame dos primeiros jatos de leite, a desinfeção dos tetos antes da ordenha (*pré-dipping*), a secagem

completa dos tetos com toalha de papel descartável e individual, a colocação e remoção correta das tetinas, a desinfecção dos tetos após a ordenha (*pós-dipping*), o funcionamento adequado do equipamento da ordenha, a higiene e conforto na área de permanência dos animais são essenciais para diminuir a incidência de mastites no efetivo (Johnson, 2000; Ruegg, 2004).

A máquina da ordenha, as mãos do ordenhador ou outros materiais contaminados são importantes veículos de transmissão de bactérias ou de disseminação destas entre vacas, no entanto, a infecção da glândula mamária pode ocorrer no período de tempo entre ordenhas, sendo o período imediatamente após a ordenha um período muito crítico. Após a ordenha, o canal do teto mantém-se aberto por 30 a 120 minutos, o que facilita a penetração dos microrganismos, sendo por isso aconselhável o fornecimento de alimento na manjedoura após a saída do animal da sala de ordenha a fim de se tentar garantir que permanece em estação durante este período de tempo (Biggs, 2009; Langoni, 2013).

2.3.2.3. Estação do ano

O calor, a humidade e o frio são fatores predisponentes importantes (Tiwari *et al.*, 2013). Segundo Biggs (2009), quando existe exposição a situações de muita humidade, tanto dos animais em estabulação (onde a ventilação, a densidade animal e a higiene em geral podem influenciar as taxas de infecção) como dos animais na pastagem (onde o tempo é inconstante, umas vezes muito frio e outras muito quente) a tendência é para um aumento da incidência de novas IIM. Em climas tropicais e subtropicais, a incidência é maior durante o inverno e a primavera, devido ao aumento da humidade. Em climas temperados, esta tende a aumentar nos meses de outono e inverno, altura em que existe uma maior permanência dos animais em estabulação (Radostits *et al.*, 2007). No caso de explorações onde os animais permanecem na pastagem, as taxas de mastite clínica geralmente são mais elevadas durante os períodos chuvosos e húmidos (Hogan & Smith, 2003).

2.3.3. Fatores de risco relacionados com o agente patogénico

A viabilidade do agente patogénico constitui um dos fatores de risco importantes, sendo esta, uma característica de cada agente que está relacionada com a sua capacidade de sobreviver no meio ambiente, resistindo aos procedimentos de higiene e desinfecção (Radostits *et al.*, 2007).

Para além da viabilidade, existe uma grande variedade de fatores de virulência entre os microrganismos causadores de mastite, sendo estas importantes características do agente patogénico e que aumentam a probabilidade de ocorrência de mastite, entre eles: a capacidade para colonizar e aderir ao epitélio mamário iniciando o processo de inflamação, a produção de toxinas, como as enterotoxinas, a coagulase, as α e β toxinas, a hemolisina, a hialurodinase e as leucocidinas envolvidas no processo de inflamação e que agravam as lesões dos tecidos da glândula mamária, a produção de biofilme, que lhes confere capacidade de persistir nos

equipamentos da ordenha e de resistir aos mecanismos de defesa do sistema imunitário e aos antimicrobianos e ainda, a capacidade de invadir e sobreviver no interior das células como os macrófagos e os polimorfonucleares (Radostits *et al.*, 2007; Arnold & Bewley, 2011; Middleton, 2013; Prenafeta, 2014).

2.4. Diagnóstico

A detecção das infeções do úbere é importante tanto para as decisões terapêuticas, como para a implementação de planos de controlo de mastites (Waller, 2013). Para a maioria dos produtores é muito importante a detecção precoce, a fim de reduzir as perdas na produção e de aumentar as perspectivas de recuperação dos animais (Sharma *et al.*, 2010).

O diagnóstico das mastites clínicas baseia-se nas alterações sistémicas e locais e nas alterações do leite (alterações da cor, secreção aquosa, aparência sanguinolenta e presença de coágulos ou flocos). O diagnóstico das mastites subclínicas é mais problemático uma vez que não se observam alterações ao nível do leite sendo, no entanto, características frequentes deste tipo de mastite uma elevada CCS, alterações químicas do leite (aumento da condutividade, aumento do pH, aumento da seroalbumina, presença de α 1-antitripsina) e presença de microrganismos. O diagnóstico precoce é vital uma vez que as alterações no úbere ocorrem muito mais cedo do que aparentam (Sharma *et al.*, 2010).

O diagnóstico de mastite inicia-se com a inspeção visual, sendo o papel do ordenhador indiscutivelmente muito importante nesta fase (Lam *et al.*, 2009). Na sua forma mais simples a detecção da mastite resultará da observação de uma ou da combinação de várias alterações, entre elas: alterações visíveis no leite, alterações visíveis ou palpáveis do úbere (ou ambas) e, por vezes, alterações comportamentais da própria vaca. As vacas são animais de hábitos e rotinas. Uma dessas rotinas é a entrada na sala de ordenha, que realizam em ordem semelhante todas as vezes que são ordenhadas. Assim, a observação de um animal mais inquieto enquanto se realiza a preparação do úbere pré-ordenha ou a sua entrada na sala de ordenha numa ordem diferente da que habitualmente se observa são indicadores de um possível caso de mastite (Biggs, 2009).

Existem alguns testes que podem ser realizados na exploração (testes de campo) e outros realizados em laboratório de forma a poder aumentar a certeza que se está perante um problema de mastite e que complementam a habitual e tradicional inspeção e palpação dos úberes (Teixeira *et al.*, 2008), permitindo assim o diagnóstico da mastite subclínica.

2.4.1. Contagem de células somáticas

As células somáticas são um conjunto de células que estão presentes na glândula mamária saudável e que lhe conferem proteção face aos microrganismos patogénicos, entre elas: neutrófilos, linfócitos, macrófagos e células epiteliais resultantes da descamação do epitélio (Morin, 2009; Li *et al.*, 2014). O leite de uma glândula mamária saudável possui uma baixa

concentração (<100.000/mL) de células que são, na sua maioria, macrófagos. Quando os microrganismos invadem a glândula mamária, ocorre a libertação de citocinas pelos macrófagos e pelas células epiteliais, originando o afluxo de neutrófilos. Assim, os neutrófilos são as células predominantes no leite mastítico, encontrando-se em concentrações superiores a 1.000.000/mL durante a inflamação aguda. Os macrófagos, os linfócitos e as células epiteliais estão presentes em concentrações mais baixas e a concentração total destas células corresponde à CCS (Morin, 2009).

Por ser um importante indicador de IIM, a CCS é um parâmetro utilizado em programas de controlo e prevenção de mastite em todo o mundo (Schukken *et al.*, 2003). Segundo Ruegg (2003), a CCS apenas se torna um bom indicador de mastite quando os valores da CCS se encontram acima das 200.000 céls/mL. A CCS pode ser efetuada individualmente a partir do leite de cada quarto, a cada animal ou ao nível do leite do tanque. Apesar de o leite individual ser o que permite a identificação do animal afetado, o leite do tanque pode ser utilizado mais rotineiramente, de forma a dar uma ideia geral da possível presença de mastites ao nível do efetivo (Ruegg, 2003).

A interpretação dos valores da CCS é, em alguns casos, difícil uma vez que este parâmetro é influenciado por vários fatores, tais como a idade, a frequência da ordenha, o intervalo entre ordenhas, variações diurnas, variações sazonais, a fase da lactação, o parto, o stresse e a fração da amostra de leite utilizada (Biggs, 2009; Lam *et al.*, 2009). No entanto, segundo Lam *et al.* (2009), o fator mais importante que influencia a CCS é a presença de IIM.

2.4.1.1. Teste californiano de mastites

O TCM é um dos testes mais fáceis, rápidos e baratos para estimar a CCS. Este teste mede indiretamente a CCS em amostras de leite e é amplamente utilizado como método de deteção de mastites subclínicas (Lam *et al.*, 2009; Viguier *et al.*, 2009; Deb *et al.*, 2013).

Para a realização do teste é utilizado um reagente (teepol + bromocresol púrpura) que, quando em contacto com o leite, provoca a lise da membrana celular das células somáticas e a subsequente libertação dos ácidos nucleicos, originando a formação de uma matriz gelatinosa cuja viscosidade é proporcional ao número de células (Viguier *et al.*, 2009). A sua leitura deve ser efetuada em 15 segundos após agitação, uma vez que a reação desaparece passado pouco tempo (Ruegg, 2003). A reação é classificada numa escala de zero (no qual a mistura permanece inalterada) a três (formação de um gel), sendo as classificações dois e três consideradas resultados positivos (Deb *et al.*, 2013). A relação entre a CCS e o TCM não é muito precisa, mas permite fazer uma correspondência aproximada (Ruegg, 2003), tal como expresso na tabela 12. As suas principais desvantagens são a baixa sensibilidade e a subjetividade de interpretação (Viguier *et al.*, 2009).

Segundo Teixeira *et al.* (2008), o TCM deve ser realizado periodicamente (quinzenalmente ou mensalmente) em todas as vacas e os seus resultados registados de modo a manter um controlo da situação na exploração.

Tabela 12. Interpretação e leitura do TCM (adaptado de Biggs, 2009).

Resultado TCM	Reação visível	CCS (células/mL)
Negativo	A mistura mantém-se líquida, sem evidência de viscosidade	0-200.000
Duvidoso	Viscosidade ligeira que desaparece com o movimento contínuo	200.000 – 500.000
1	Aumento da viscosidade, mas com pouca ou mesmo sem tendência de formação de gel	400.000 – 1.500.000
2	A mistura engrossa imediatamente e move-se em direção ao centro	800.000 – 5.000.000
3	Formação de gel e a superfície torna-se convexa	> 5.000.000

TCM – teste californiano de mastites; CCS – contagem de células somáticas.

2.4.2. Medição da condutividade elétrica

A medição da condutividade elétrica no leite para detetar a mastite baseia-se nas alterações iónicas que ocorrem durante a inflamação (Pyörälä, 2003). A condutividade elétrica no leite é determinada pela concentração de aniões e catiões, como o sódio, o potássio e o cloro (Ruegg, 2003). Devido à ocorrência de mastite, a concentração de sódio e cloro aumenta e a concentração de potássio diminui no leite, o que provoca um aumento da condutividade elétrica. Uma das vantagens deste método é que a medição da condutividade pode ser automaticamente realizada enquanto decorre a ordenha, através da utilização de sensores no sistema de ordenha (Morin, 2009). A sua principal desvantagem é o facto de as variações na condutividade elétrica poderem ser influenciadas por outros aspetos não relacionados com a mastite (Viguier *et al.*, 2009), como é o exemplo da diminuição do teor de gordura no leite (Pyörälä, 2003).

2.4.3. Indicadores de pH

O aumento do pH, devido à presença de mastite, pode ser detetado através da utilização de tiras de papel impregnadas com azul de bromotimol (George *et al.*, 2008; Awale *et al.*, 2012). O valor do pH no leite normal é de aproximadamente 6,5 a 6,7, enquanto no leite proveniente de um quarto com mastite o valor é de aproximadamente 7,4 (George *et al.*, 2008).

2.4.4. N-acetil-b-D-glucosaminidase (NAGase)

O teste baseia-se na medição da NAGase no leite sendo que uma elevada atividade desta enzima está associada a uma elevada CCS (Radostits *et al.*, 2007). A NAGase é uma enzima lisossomal que deriva das células epiteliais danificadas mas principalmente dos leucócitos, sendo por isso um indicador da inflamação (Pyörälä, 2003; Radostits *et al.*, 2007). O teste da NAGase é o mais preciso dos testes indiretos (Radostits *et al.*, 2007).

2.4.5. Detecção de anticorpos no leite

Este teste consiste numa prova ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) que deteta anticorpos no leite. Apesar de serem muitos os microrganismos causadores de mastite, esta técnica foi desenvolvida apenas para os agentes patogénicos mais prevalentes, como *S. aureus* e *E. coli*. Como exemplo, no caso do *S. aureus*, a prova ELISA para deteção de anticorpos pode ser o primeiro teste realizado em animais com suspeita de infeção por este agente. No entanto, nos casos positivos ao ELISA é necessária a realização de cultura bacteriológica de confirmação (Viguiet *et al.*, 2009). É um teste no qual podem ocorrer falsos positivos, uma vez que os anticorpos permanecem durante algum tempo após a resolução da mastite (Teixeira *et al.*, 2008).

2.4.6. Teor microbiano total (TMT)

O TMT é também uma medida de avaliação da qualidade do leite e da incidência de mastites na exploração. Conjugando os dados provenientes deste teste com outros, pode-se aferir sobre a higiene da ordenha e o estado higio-sanitário dos animais (Teixeira *et al.*, 2008).

2.4.7. Culturas bacteriológicas

As culturas bacteriológicas podem ser realizadas ao nível do efetivo, por meio de amostras colhidas a partir do leite do tanque, ou a nível individual por meio de amostras colhidas em cada quarto ou de amostras compostas por leite dos quatro quartos (Radostits *et al.* 2007; Lam *et al.*, 2009). De referir que as bactérias presentes no leite do tanque resultam de glândulas mamárias infetadas, das superfícies dos tetos e dos úberes e de variadas fontes do meio ambiente. O número de microrganismos encontrados varia com o número de vacas infetadas, com a produção de leite e com a gravidade da infeção (Radostits *et al.*, 2007).

O método de eleição para o diagnóstico de infeções bacterianas intramamárias é a cultura bacteriológica (Nyman *et al.*, 2013), a partir de amostras de leite cuja colheita tem que ser assética. É um método no qual são utilizados meios de cultura apropriados a fim de identificar os diferentes microrganismos envolvidos no desenvolvimento da mastite (Awale *et al.*, 2012). O conhecimento do agente predominante responsável pelos casos de mastite na exploração é essencial para se conseguir alcançar o seu controlo através da implementação de medidas de controlo específicas e adequadas aos tipos de agentes, contagiosos ou ambientais (Biggs, 2009). Para além disso, o registo dos resultados das culturas bacteriológicas obtidos num efetivo, são uma fonte de informação que pode ser útil para otimizar o tratamento de futuros casos de mastite na exploração (Lam *et al.*, 2009).

A utilidade do diagnóstico a partir da cultura bacteriológica de amostras de leite dependerá da qualidade da colheita das amostras e da forma como a amostra chega ao laboratório. A hipótese de um diagnóstico microbiológico correto aumenta de forma marcada se as amostras forem colhidas asseticamente e mantidas e transportadas refrigeradas desde a colheita até à

sua chegada ao laboratório (Waller, 2013). A contaminação bacteriana pode não só mascarar os agentes patogénicos causais, tornando a interpretação incorreta, como também deixa de existir garantia de que qualquer dos potenciais agentes de mastite identificados tenha origem no úbere. De acordo com o *National Mastitis Council* (NMC), uma vez que raramente coexistem mais de três microrganismos na mesma infeção, quando são isolados mais de três agentes está convencionado que a amostra é considerada contaminada (Biggs, 2009).

2.4.8. Polymerase chain reaction (PCR)

Nos últimos anos, as técnicas de PCR foram desenvolvidas no sentido de se obter, de forma mais rápida e objetiva, a identificação simultânea dos agentes patogénicos mais comuns no leite (Nyman *et al.*, 2013). Segundo Awale *et al.* (2012) as técnicas mais recentes de PCR multiplex e PCR em tempo real podem detetar 11 dos principais agentes patogénicos associados às mastites, entre os quais estão incluídos *E. coli*, *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus uberis*.

A rapidez deste método e o facto de identificar o DNA de microrganismos vivos ou mortos na amostra são duas vantagens da PCR relativamente às culturas bacteriológicas (Deb *et al.*, 2013, Nyman *et al.*, 2013). Segundo Taponen *et al.* (2009), a ausência de crescimento bacteriano verifica-se em mais de 30% das culturas convencionais realizadas a partir de amostras de leite provenientes de mastites clínicas e subclínicas. Um estudo realizado por este autor permitiu concluir que a PCR em tempo real pode resultar num diagnóstico bacteriológico para, aproximadamente, metade dos casos em que os resultados das culturas bacteriológicas são negativos. Os diagnósticos com base na PCR são também muitas vezes utilizados em estudos de amostras de leite do tanque (Waller, 2013), podendo ser, segundo Mahmmod *et al.* (2013) uma ferramenta valiosa no controlo das mastites por *Streptococcus agalactiae* e *S. aureus*.

2.5. Caracterização das mastites por *Staphylococcus* spp. e coliformes

2.5.1. *Staphylococcus aureus*

2.5.1.1. Etiologia e epidemiologia

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram-positiva, geralmente hemolítica, anaeróbia facultativa, imóvel, não esporulada, catalase-positiva, coagulase-positiva (Teixeira *et al.*, 2008; Middleton, 2013) e considerada uma das maiores causas de mastite subclínica, clínica, recorrente e crónica nos bovinos leiteiros (Melchior *et al.*, 2011).

Segundo Radostits *et al.* (2007), em explorações com baixas CCS no tanque do leite a prevalência de mastites por *S. aureus* é de 1 a 10%, sendo de 50% em explorações com elevadas CCS onde as taxas de quartos infetados rondam os 10 a 25%. O *S. aureus* é o microrganismo mais comumente isolado em vacas no período de secagem (Teixeira *et al.*, 2008).

As estirpes de *S. aureus* diferem na sua transmissibilidade, virulência e suscetibilidade aos antimicrobianos, o que origina respostas variáveis ao tratamento e às medidas de controlo entre explorações e entre vacas. Normalmente, cada exploração possui uma estirpe predominante, aparecendo estirpes adicionais esporadicamente (Morin, 2009).

2.5.1.2. Fatores de virulência e patogénese

Uma nova infeção inicia-se pela invasão do canal do teto pela bactéria, seguida de adesão às células epiteliais após a qual se inicia o processo de multiplicação (Morin, 2009; Arnold & Bewley, 2011). A defesa primária do sistema imunitário da vaca contra a infeção é a fagocitose, por meio da ação dos macrófagos e dos neutrófilos, no entanto, o *S. aureus* produz fatores antifagocíticos, tais como a cápsula e uma proteína de superfície (proteína A), resistindo assim à fagocitose (Morin, 2009; Middleton, 2013).

Inicialmente, as bactérias danificam os tecidos de revestimento do teto e da cisterna da glândula do quarto afetado, podendo originar a formação de tecido cicatricial. Em seguida, a bactéria progride para o sistema de ductos e estabelece bolsas de infeção profundas nas células secretoras de leite (alvéolos) e, posteriormente, formam-se microabcessos que lhe conferem proteção face aos mecanismos de defesa e face à ação dos antibióticos (Petersson-Wolfe *et al.*, 2010; Arnold & Bewley, 2011).

Durante a infeção, a destruição das células alveolares e dos ductos reduz a produção de leite. Estas células danificadas podem combinar-se com os leucócitos e obstruir os ductos de leite que drenam as áreas alveolares, contribuindo para uma maior formação de tecido cicatricial, oclusão dos ductos e acentuada diminuição da produção de leite. Os ductos podem reabrir num momento posterior o que resulta numa libertação de *S. aureus* para outros locais da glândula mamária com formação adicional de abcessos que podem tornar-se muito grandes e detetáveis através da palpação do úbere (Petersson-Wolfe *et al.*, 2010).

As lesões nos tecidos da glândula mamária são agravadas pelas toxinas e enzimas extracelulares produzidas pelo *S. aureus* que incluem toxinas α , β , γ e δ , toxina do síndrome de choque tóxico (TSST-1), enterotoxinas, nuclease, coagulase, catalase, hialurodinase, fosfatase, lipase e proteases (Middleton, 2013).

A resposta inflamatória da glândula mamária varia ao longo do tempo, existindo uma grande flutuação da CCS e uma intermitente excreção da bactéria durante a infeção (tabela 13) (Biggs, 2009). A formação de microabcessos e a capacidade de sobreviver no interior dos macrófagos, dos polimorfonucleares e das células epiteliais explicam em parte estas variações nas vacas infetadas cronicamente (Blowey & Edmondson, 2010). A flutuação da CCS deve-se ao facto de, numa primeira fase, as bactérias serem eliminadas pelo sistema imunitário, sendo reduzida a causa que levou ao aumento das células somáticas e, por esse motivo, diminui a CCS. Como a resposta do sistema imunitário abranda, torna-se possível que as bactérias sobreviventes se multipliquem, provocando um novo aumento da CCS (Biggs, 2009).

Tabela 13. Variação da CCS e do grau de excreção bacteriana de uma glândula mamária infectada com *S. aureus* (adaptado de Blowey & Edmondson, 2010).

Dia colheita amostra	bactérias/mL	CCS (x 1000/mL)
1	2800	880
2	6000	144
4	7000	104
5	10.000	896
13	> 10.000	152
14	1200	1000
15	> 10.000	168

CCS – contagem de células somáticas.

2.5.1.3. Transmissão

O *S. aureus* pode ser isolado em diversos locais do corpo do animal, do meio ambiente e das mãos do ordenhador. No entanto, o úbere infectado continua a ser considerado o principal reservatório de *S. aureus* (Benić *et al.*, 2012; Middleton, 2013). A bactéria multiplica-se sobretudo nas extremidades dos tetos com lesões causadas por sobreordenação, em fendas, nas ulcerações pelo frio, nos traumatismos causados por picadas de insetos ou por má configuração da pulsação e vácuo da máquina de ordenha (Petersson-Wolfe *et al.*, 2010; Arnold & Bewley, 2011).

As infecções disseminam-se entre vacas ou entre quartos durante a ordenha através dos equipamentos, das mãos dos ordenhadores, de panos utilizados na lavagem, na limpeza e na secagem dos úberes de vários animais, das tetinas, por meio de insetos e por amamentação cruzada (Petersson-Wolfe *et al.*, 2010; Arnold & Bewley, 2011). As novilhas infectadas durante a gestação, sendo portadoras da infecção até ao parto, representam um importante reservatório a partir do qual o *S. aureus* se pode propagar para outros animais do efetivo (Petersson-Wolfe *et al.*, 2010).

2.5.1.4. Sinais clínicos

A mastite por *S. aureus* pode originar um largo espectro de sinais clínicos, desde casos ligeiros sem sinais clínicos a casos extremos que acabam por ser fatais (Benić *et al.*, 2012). As perdas mais importantes são causadas pela forma crónica ou subclínica da mastite, que são as mais frequentes (Radostits *et al.*, 2007; Benić *et al.*, 2012). Na maioria dos casos caracteriza-se unicamente pelo aumento significativo da CCS e, conseqüentemente, pelo resultado positivo no TCM (George *et al.*, 2008). Segundo Radostits *et al.* (2007), embora 50% do efetivo de uma exploração possa estar afetado, apenas um pequeno número irá apresentar alterações reconhecíveis pelo ordenhador. No entanto, a presença de infecção no efetivo pode ser observada por episódios clínicos e tentativas repetidas de tratamentos mal sucedidos no mesmo animal (Benić *et al.*, 2012).

As mastites por *S. aureus*, aguda e hiperaguda, são raras mas ocorrem e podem mesmo ser fatais, mesmo que tratadas agressivamente. A mastite aguda ocorre mais frequentemente no

início da lactação (Radostits *et al.*, 2007). O animal pode apresentar-se febril, com edema doloroso da glândula mamária e o quarto afetado pode apresentar-se quente, podendo ainda observar-se uma ligeira diminuição do apetite. O leite tende a ter uma aparência cremosa ou purulenta alternada com uma secreção aquosa intercalada por coágulos ou grumos. De referir que o tipo de secreção não é de forma nenhuma patognomónico de qualquer tipo de microrganismo intramamário (George *et al.*, 2008).

A mastite hiperaguda ocorre com maior frequência nos primeiros dias pós-parto e é altamente fatal. Ocorre uma reação sistémica severa com subida da temperatura corporal para os 41-42°C, elevação da frequência cardíaca (100-120 bpm), anorexia, depressão, ausência de contrações ruminais e fraqueza muscular, frequentemente até ao ponto de decúbito. O início das reações sistémicas e locais é repentino (Radostits *et al.*, 2007). A mastite gangrenosa é o pior exemplo de mastite hiperaguda por *S. aureus*. Os sinais de toxémia agravam-se quando a gangrena se desenvolve, a cor do quarto afetado evolui de rosado para cianótico em poucas horas e a sua temperatura diminui (George *et al.*, 2008).

2.5.1.5. Diagnóstico

A identificação é baseada em culturas bacteriológicas de amostras de leite colhidas de forma apropriada (Arnold & Bewley, 2011). As culturas realizadas a partir do leite do tanque podem ser utilizadas para alertar o produtor para a presença de *S. aureus* e para a necessidade de um exame individual das vacas problema. Para além das culturas, a monitorização das bactérias no leite do tanque também pode ser realizada recorrendo a PCR (Katholm *et al.*, 2012).

A excreção intermitente tem um impacto significativo na sensibilidade das culturas bacterianas como método de diagnóstico da mastite por *S. aureus*. No caso das mastites clínicas, o número de bactérias excretado é normalmente elevado e contínuo e o diagnóstico fácil. No entanto, nos casos subclínicos, nos quais as alterações inflamatórias são pouco marcadas e a excreção bacteriana variável, os resultados falsos negativos não são incomuns (Biggs, 2009). Segundo Blowey & Edmondson (2010), devido à excreção intermitente ou à excreção em pequenas quantidades, apenas cerca de um terço das culturas realizadas a partir de amostras de leite de vacas infetadas são positivas. A fim de se evitarem os resultados falsos negativos, a sensibilidade das culturas bacterianas como diagnóstico de *S. aureus* pode ser aumentada através da repetição das amostras, que será vantajosa nos casos de excreção intermitente (Biggs, 2009).

Segundo Arnold & Bewley (2011), o método de eleição para deteção de mastites por *S. aureus* compreende, em primeiro lugar, a identificação de todos os animais com elevadas CCS (> 200.000 céls/mL), seguida da realização de TCM nesses animais a fim de determinar qual o quarto ou quartos infetados e, por último, cultura bacteriológica das amostras de leite dos quartos afetados. A identificação das IIM é de extrema importância não só para prevenir a sua

disseminação pelo efetivo como também para aumentar as hipóteses de cura (Arnold & Bewley, 2011).

2.5.1.6. Tratamento

Existem duas opções de tratamento para a mastite por este agente contagioso: o tratamento durante a lactação de episódios de mastite aguda, a fim de reduzir o número de bactérias e células somáticas no tanque, e o tratamento de vaca seca (George *et al.*, 2008). No entanto, segundo Radostits *et al.* (2007), as taxas de cura deste tipo de mastite, seja com infusões intramamárias ou com administração parentérica de antimicrobianos, são notoriamente pouco satisfatórias em vacas em lactação, sendo que as taxas de cura após tratamento antimicrobiano raramente excedem os 50% e as infecções persistem, frequentemente, para o resto da vida do animal. O insucesso no tratamento deste tipo de mastite deve-se à produção de β -lactamases por algumas estirpes, que lhes confere resistência a antibióticos como a penicilina e a amoxicilina, à existência de formas-L (Morin, 2009), à capacidade de sobrevivência no interior dos macrófagos e polimorfonucleares (Arnold & Bewley, 2011) e à formação de colônias aderentes protegidas por um biofilme que lhes confere resistência face à fagocitose e aos antibióticos, promovendo a cronicidade da infecção (Morin, 2009; Arnold & Bewley, 2011; Prenafeta, 2014).

O tratamento na secagem é mais efetivo na eliminação das infecções do que o tratamento durante a lactação, sendo recomendado o tratamento dos quatro quartos. No entanto, este deixa de ser efetivo se, até ao final da lactação, a infecção se tornar crónica (Pettersson-Wolfe *et al.*, 2010). Este tratamento não só reduz a IIM existente, como também diminui a incidência de uma nova infecção. O tratamento de vaca seca também tem sido utilizado em novilhas antes do parto, quando a incidência de mastite por *S. aureus* nas novilhas em lactação é elevada (George *et al.*, 2008).

As hipóteses para o tratamento de mastite clínica e subclínica envolvem uma ampla variedade de antimicrobianos que incluem cefalosporina, cloxacilina, eritromicina, penicilina, penicilina-neomicina, pirlimicina, tetraciclina, tilosina, tilmicosina (Quinn *et al.*, 2011). No entanto, uma vez que existe sempre uma estirpe de *S. aureus* que é predominante numa exploração, a colheita de amostras para realização de cultura e teste de suscetibilidade a antibióticos é sempre aconselhável e necessária a fim de se tomar conhecimento de quais os problemas específicos de cada exploração em particular (Arnold & Bewley, 2011). Segundo os mesmos autores, as estirpes resistentes à penicilina têm muito menor probabilidade de responder a qualquer outro tipo de antibiótico, o que significa que a taxa de cura para todos os *S. aureus* resistentes à penicilina é considerada bastante baixa, podendo este ser um importante fator quando se toma uma decisão entre o tratamento e o refugo.

Para além da terapia antimicrobiana, a administração de um fármaco com ação antitóxica e anti-inflamatória (p. ex.: flunixinina-meglumina) pode ser também um bom adjuvante no

tratamento deste tipo de mastite (George *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008). Os casos de mastite gangrenosa devem ser tratados com antibioterapia sistémica, anti-inflamatório não esteroide (flunixinina-meglumina) e ainda, fluidoterapia (George *et al.*, 2008).

2.5.1.7. Prevenção

Dadas as dificuldades no tratamento da mastite causada por este agente, a prevenção do aparecimento de novos casos é o fator determinante para o controlo da prevalência de IIM por *S. aureus* (Dufour *et al.*, 2012), sendo, à semelhança de outros tipos de mastite, a abordagem mais importante e economicamente viável (Arnold & Bewley, 2011).

Um dos aspetos de extrema importância num programa de controlo de mastites por *S. aureus* é a decisão de quais os casos a tratar ou quais os casos em que se deve optar pelo refugo (Arnold & Bewley, 2011). Existem determinados fatores relacionados com os próprios animais que reduzem a probabilidade de cura e que devem ser considerados nesta tomada de decisão, entre eles: a idade da vaca - segundo Ruegg (2010), a probabilidade diminui de 81% em vacas com idade inferior a 48 meses para 55% em vacas com mais de 96 meses -, elevadas CCS, a duração da infeção, o grau de infeção, o número de quartos afetados e quais os quartos infetados (Arnold & Bewley, 2011). De acordo com George *et al.* (2008), as IIM no início da lactação têm maiores possibilidades de cura e vacas com IIM de um só quarto têm duas vezes maior probabilidade de cura que vacas com vários quartos afetados. As taxas de cura são mais elevadas para os quartos anteriores comparativamente aos quartos posteriores e diminuem com o aumento da CCS e da duração da infeção (George *et al.*, 2008).

Segundo Ruegg (2010), a maioria das evidências demonstra que o tratamento de casos de mastite clínica causada por infeções crónicas não é compensador, sendo que muitos desses animais terão episódios esporádicos de mastite clínica ligeira a moderada. Não é considerado economicamente viável o tratamento de vacas cronicamente infetadas com *S. aureus* uma vez que as taxas de cura são tipicamente inferiores a 35% e, na maioria dos casos, quando os sinais clínicos deixam de existir significa que a infeção apenas voltou ao estado subclínico (Ruegg, 2010).

2.5.2. *Staphylococcus coagulase-negativos*

2.5.2.1. Etiologia

Os SCN são os agentes mais frequentemente isolados a partir de amostras de leite em vários estudos em larga escala, em diversos pontos do mundo (Bexiga, 2011). Pertencem a um grupo heterógeno de, pelo menos, 50 espécies e subespécies diferentes das quais, aproximadamente 10 são frequentemente encontradas nas amostras de leite e encontram-se abundantemente nas extremidades dos tetos (Piepers *et al.* 2013). Segundo Reksen *et al.* (2012), o *Staphylococcus chromogenes*, o *Staphylococcus simulans* e o *Staphylococcus epidermidis* são as espécies de SCN mais frequentemente isoladas em amostras de leite em

muitos dos estudos realizados. Frequentemente, no diagnóstico de mastites, os SCN normalmente não são identificados por espécies mas tratados como um grupo uniforme (Pyörälä & Taponen, 2008).

Os SCN são parte integrante da microflora da pele do teto e do orifício externo do canal do teto. Todos os fatores que contribuam para a irritação ou lesão da pele do teto originam um aumento do número de SCN nestes locais. O leite do tanque pode ser fortemente contaminado com SCN se os procedimentos da ordenha forem inadequados, a higiene for pobre, se existir irritação ou lesões da pele do teto e ainda, se não for realizada a desinfecção dos tetos após a ordenha (George *et al.*, 2008, Blowey & Edmondson, 2010).

2.5.2.2. Epidemiologia

A incidência de novas infeções é máxima durante o período seco e antes do parto e, por isso, a percentagem de quartos infetados é elevada no momento do parto (Sansano, 2012). No entanto, muitas das IIM curam de forma espontânea e a prevalência decresce nas primeiras semanas pós-parto (Biggs, 2009).

A prevalência de SCN é mais elevada em vacas primíparas que nas múltíparas. Segundo Piepers *et al.* (2013), a grande maioria das mastites em novilhas no início da lactação é causada por SCN. Em sistemas intensivos, a prevalência de quartos infetados em novilhas no pré-parto pode exceder os 50% e, mesmo em condições de pastagem, os SCN são os agentes predominantes com 77% dos quartos bacteriologicamente positivos (Pyörälä & Taponen, 2008). Segundo Paradis *et al.* (2010), este tipo de IIM nas novilhas poderá prejudicar o desenvolvimento da glândula mamária e, conseqüentemente, ter um efeito negativo sobre a qualidade do leite e a futura produção de leite.

2.5.2.3. Fatores de virulência e patogénese

Os SCN são considerados agentes patogénicos menores porque têm um impacto ligeiro na saúde do úbere (Bexiga, 2011). No entanto, a sua relevância clínica/patológica permanece um ponto de discussão sendo que alguns autores consideram-nos como verdadeiros agentes de mastite com importantes fatores de virulência, um elevado nível de resistência antimicrobiana e a capacidade de originar infeções crónicas (Rajala-Schultz *et al.*, 2009 e Gillespie *et al.*, 2009 citados por Supré *et al.*, 2011).

Sendo encontrados frequentemente na pele, a capacidade de se estabelecerem na glândula mamária é o que confere aos SCN o seu potencial infeccioso. Este potencial depende, entre outros fatores, da sua capacidade de resistir aos mecanismos de defesa do hospedeiro através da produção de biofilme (Oliveira *et al.*, 2006 citado por Bexiga, 2011). A capacidade de produzir biofilme torna-os aptos a persistir nos equipamentos da ordenha, que funcionam como principais fontes de disseminação dos SCN (El-Jakee *et al.*, 2013). A produção de toxinas δ , leucocidinas, lipases, protease e DNase e as características da sua superfície, como a

formação de cápsula, constituem fatores de virulência descritos para algumas estirpes de SCN (Bexiga, 2011).

O efeito sobre os quartos afetados é espécie-específico (Supré *et al.*, 2011), sendo que algumas espécies de SCN têm a capacidade de persistir durante longos períodos de tempo no úbere, prolongando a sua influência sobre a glândula mamária sobretudo no que se refere à CCS (Piessens *et al.*, 2011).

2.5.2.4. Sinais clínicos

No geral, os SCN induzem apenas uma ligeira reação inflamatória nos quartos infetados (Schukken *et al.*, 2009 citado por Piessens *et al.*, 2011), originando com maior frequência casos de mastite subclínica que resultam numa diminuição da produção e num aumento da CCS dos quartos infetados (George *et al.*, 2008). Segundo Reksen *et al.* (2012), os estudos recentes têm demonstrado que as infeções persistentes são comuns em quartos infetados por SCN.

As mastites por SCN resultam assim num aumento da CCS no leite e influenciam significativamente a CCS do efetivo em geral, especialmente nas explorações com baixas CCS a nível do tanque (<200.000 céls/mL). A CCS normalmente permanece abaixo das 500.000 céls/mL (Pyörälä & Taponen, 2008). A diminuição da produção de leite ocorre sobretudo quando uma percentagem significativa do efetivo está infetado (George *et al.*, 2008).

Os SCN podem ainda ser isolados de casos de mastite clínica ligeira (Reksen *et al.*, 2012) sendo que, nestes casos, apenas se observam ligeiras alterações a nível local, tais como edema ligeiro do quarto afetado e alterações a nível do leite (farrapos) (Taponen & Pyörälä, 2008). Não é comum ocorrerem alterações do estado geral (Sansano, 2012).

2.5.2.5. Diagnóstico

O resultado positivo a SCN na cultura de uma amostra de leite nem sempre é indicativo da existência de uma reação inflamatória com aumento da CCS, e pode mesmo não ser indicativo de uma IIM. A possibilidade de contaminação da amostra de leite através do teto ou do úbere durante o procedimento de recolha nunca pode ser descartada daí que a aplicação de um bom protocolo de recolha de amostras seja importante pois irá reduzir o potencial de contaminação.

Culturas bacteriológicas positivas de uma sequência de amostras repetidas tornarão mais concisa a possibilidade de existir verdadeiramente uma IIM por SCN e auxiliarão a descartar outras causas bacterianas, que poderão não ter sido detetadas numa primeira amostra, particularmente se todas as amostras da sequência tiverem uma CCS que levará a suspeitar da presença de uma infeção persistente significativa. Em termos laboratoriais, a diferenciação entre *S. aureus* e SCN é baseada na reação positiva ao teste da coagulase (Biggs, 2009).

2.5.2.6. Tratamento

A terapia antimicrobiana pode ser realizada durante a lactação, especialmente em casos de animais no início da lactação, o que faz com que os custos do tratamento compensem relativamente às perdas de produção que ocorreriam caso não fosse aplicado tratamento. O tratamento na secagem é indicado em efetivos com elevada percentagem de mastites por SCN (George *et al.*, 2008). Segundo Taponen & Pyörälä (2008), as estratégias de tratamento variam muito entre países, sendo que, em alguns, o tratamento das mastites subclínicas é realizado durante a lactação enquanto noutros, as mastites subclínicas ou mesmo as mastites clínicas ligeiras, não são tratadas.

A antibioterapia deve ser baseada nos resultados do teste de sensibilidade a antibióticos, sendo preferíveis os antibióticos eficazes contra microrganismos produtores de β -lactamases (George *et al.*, 2008), uma vez que a produção destas é o mecanismo de resistência mais comum dos SCN (Taponen & Pyörälä, 2008). Os SCN têm alguma tendência ao desenvolvimento de multirresistências aos antimicrobianos e as taxas de cura de mastites causadas por SCN resistentes à penicilina rondam os 20% (Taponen & Pyörälä, 2008). Além das resistências aos antimicrobianos, existe também a possibilidade de existirem resistências aos compostos de amónio quaternário entre as espécies de SCN, o que pode ter impacto na saúde do úbere uma vez que os produtos utilizados na desinfeção dos tetos antes e após a ordenha têm como base este tipo de compostos (Bexiga, 2011).

Apesar disto, de acordo com Pyörälä & Taponen (2008), diversos estudos referem que, no geral, a terapia realizada em mastites por SCN tem, por norma, uma boa resposta. Vacas com maior número de lactações e com vários partos têm uma tendência significativamente mais baixa de cura (Pyörälä & Taponen, 2008). Segundo os mesmos autores, a realização de um tratamento antimicrobiano de um quarto do qual foi isolado SCN uma única vez, pode não se justificar economicamente, principalmente se estes microrganismos tiverem sido identificados em pequena quantidade na amostra de leite. Em primeiro lugar, porque estas são bactérias comuns da pele do teto e, por vezes, existe contaminação das amostras de leite, e depois porque as taxas de cura espontânea sem qualquer tratamento são relativamente elevadas. No entanto, sempre que se verificarem sinais clínicos evidentes, moderados ou severos, ou se existirem quartos com mastite persistente por SCN, está indicado o tratamento com terapia antimicrobiana intramamária que, no caso da mastite persistente, apresenta elevadas taxas de cura quando efetuado na secagem (Pyörälä & Taponen, 2008).

2.5.2.7. Prevenção

Apesar da literatura sobre fatores de risco para as IIM por SCN ser escassa, existem outras opções para além do tratamento antimicrobiano para o controlo das mastites (Bexiga, 2011) e, tal como para todos os outros tipos de mastite, a prevenção é a chave para combater este problema (Pyörälä & Taponen, 2008). No entanto, o controlo e prevenção das mastites por

SCN são complicados devido à diversidade de espécies e aos diversos e diferentes fatores de cada exploração, que influenciam todo o processo da doença (Quirk *et al.*, 2012).

2.5.3. Coliformes

2.5.3.1 Etiologia

As mastites por coliformes são o exemplo clássico de uma causa ambiental de mastite (George *et al.*, 2008), sobretudo em explorações onde os cuidados de higiene e limpeza são insuficientes (Teixeira *et al.*, 2008). O termo “mastite por coliformes” é, frequentemente, utilizado de forma incorreta para identificar a doença na glândula mamária provocada por todas as bactérias gram-negativas. Os géneros classificados como coliformes são *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter* (Hogan & Smith, 2003; Radostits *et al.*, 2007; George *et al.*, 2008; Morin, 2009; Lacy-Hulbert *et al.*, 2012).

A *E. coli* é o agente ambiental mais prevalente nas explorações e, por isso mesmo, o agente ambiental que mais origina casos de mastite ambiental (Biggs, 2009; Morin, 2009). Está presente nas fezes, no solo e nas camas em elevada quantidade e, quando a higiene é inadequada, aumenta exponencialmente. A má ventilação e a sobrelotação animal podem aumentar a prevalência deste agente (Biggs, 2009).

As espécies de *Klebsiella* são importantes em algumas explorações, sendo as espécies de *Enterobacter* isoladas menos frequentemente (Morin, 2009). A *Klebsiella* está frequentemente associada a instalações húmidas e sujas, em especial à contaminação de camas nas quais se utilizam materiais à base de madeira, como é o caso da serradura (Biggs, 2009).

A mastite por coliformes é, frequentemente, de curta duração, sendo que mais de metade destas IIM tem uma duração inferior a 10 dias. Como resultado, a prevalência de IIM por coliformes num efetivo raramente excede 1-2% e raramente são a causa de elevadas CCS no leite do tanque (Smith & Hogan, 2008).

2.5.3.2. Epidemiologia

De acordo com Smith & Hogan (2008), vários estudos demonstraram de forma clara que as bactérias coliformes são isoladas em 30 a 40% dos casos de mastite clínica dos efetivos leiteiros, particularmente em explorações onde o confinamento é permanente. O pico de incidência de mastites clínicas ocorre, na maioria das explorações, imediatamente após o parto (Quesnell *et al.*, 2012). A taxa de IIM é, aproximadamente, quatro vezes superior durante o período seco relativamente ao período de lactação, e mais elevada nas duas primeiras semanas do período seco e nas duas semanas antes do parto (Radostits *et al.*, 2007). A ocorrência de novas IIM no período seco é um dos principais fatores que afetam a manifestação de mastite clínica por coliformes no início da lactação, sendo estes casos mais severos e associados ao período de imunossupressão (Molina *et al.*, 2013).

2.5.3.3. Fatores de virulência e patogênese

Os fatores de virulência associados aos diferentes serotipos de *E. coli* incluem as adesinas, as toxinas, a membrana celular, a cápsula e a resistência ao sistema imunitário (Güler & Gündüz, 2007). Estes microrganismos, como todos os gram-negativos, possuem lipopolissacáridos (LPS), também designados de endotoxinas, na membrana exterior da parede celular que, quando em contacto com o sistema imunitário, provocam a libertação de potentes mediadores pró-inflamatórios. A glândula mamária é extremamente sensível ao LPS e os sinais sistémicos que ocorrem na mastite clínica por coliformes devem-se, essencialmente, à severa resposta inflamatória desencadeada por estas endotoxinas (Ribeiro *et al.*, 2008). As endotoxinas induzem alterações severas da permeabilidade vascular e o aumento das células somáticas na glândula mamária e no leite, resultando em edema, depressão, toxémia e outros sinais severos típicos de mastite aguda e hiperaguda (Radostits *et al.*, 2007). Para além disto, as endotoxinas originam estase ruminal e íleo, diminuindo a absorção de cálcio a nível do intestino, podendo a hipocalcémia ser o maior contributo para a fraqueza ou decúbito em bovinos com mastite por coliformes (George *et al.*, 2008).

2.5.3.4. Transmissão

O reservatório primário das infeções por coliformes são as fezes, a água, o solo e a serradura, que contaminam o canal do teto. A exposição de quartos não infetados a estes agentes pode ocorrer em qualquer altura, incluindo durante a ordenha, entre ordenhas, durante o período seco e antes do parto (Radostits *et al.*, 2007). Os procedimentos da ordenha e as lesões na extremidade dos tetos são importantes contributos para a mastite por coliformes (George *et al.*, 2008).

Segundo George *et al* (2008), as doenças metabólicas que ocorram em simultâneo, tal como a hipocalcémia, que causam decúbito permanente do animal, aumentam a exposição aos coliformes ambientais. O contacto da extremidade do teto com as membranas fetais, no caso de vacas com RMF, também pode aumentar o risco de infeções por coliformes (George *et al.*, 2008).

2.5.3.5. Sinais clínicos

De acordo com Smith & Hogan (2008), 80 a 90% das IIM por coliformes durante o período de lactação originam sinais clínicos. Uma elevada proporção dos casos está associada a sinais clínicos moderados e, aproximadamente, 10% resultarão em casos severos de mastite clínica (Smith & Hogan, 2008).

Anorexia, depressão severa, tremores, extremidades frias (especialmente as orelhas), febre (40-42°C), agalaxia, estase ruminal e desidratação são os sinais clínicos mais comuns da mastite hiperaguda por coliformes (Ribeiro *et al.*, 2008, Yeiser *et al.*, 2012). Pode ainda observar-se edema marcado da glândula mamária, sinais de congestão e necrose em algumas

regiões. A secreção mamária é característica, alterando a sua consistência de aquosa para serosa, de cor amarela, verificando-se a presença de pequenos flocos. Em seis a oito horas após o início dos sinais, o animal pode apresentar-se em decúbito e, nesta fase, a temperatura corporal pode ser normal a subnormal e a desidratação é evidente (Radostits *et al.*, 2007).

As complicações sistêmicas incluem lesões músculoesqueléticas secundárias ao decúbito e prostração, laminite, distúrbios metabólicos, tais como hipocalcemia, hipocalémia e choque com acidose láctica, e ainda, múltiplas falhas orgânicas, tais como insuficiência renal e hepática agudas. A leucopenia e a neutropenia associadas a este tipo de mastite predis põem para outras infecções como metrite, pneumonia e infecção noutros quartos do úbere (George *et al.*, 2008). Segundo o mesmo autor, a severidade dos sinais de endotoxemia varia muito entre os animais com mastite por coliformes, no entanto, as infecções por *Klebsiella* spp. são a causa dos sinais de endotoxemia mais dramáticos e persistentes.

2.5.3.6. Diagnóstico

No caso das mastites agudas e hiperagudas, a combinação dos sinais clínicos locais e sistêmicos é um indicador muito fiável do diagnóstico. Os sinais mais específicos de mastite por coliformes incluem secreção com aspeto aquoso, quarto edemaciado e duro, taquipneia, taquicardia, febre, fraqueza e tremores. Apesar destes sinais não serem absolutos, são ainda mais específicos quando a vaca pertence a um efetivo que, de uma forma geral, apresenta baixas CCS, especialmente quando o ambiente que a rodeia é húmido e a higiene insuficiente (George *et al.*, 2008).

O hemograma também pode ser sugestivo de mastite por coliformes, uma vez que a infecção aguda e a endotoxemia resultam frequentemente numa neutropenia com desvio à esquerda, leucopenia e observam-se neutrófilos em banda (George *et al.*, 2008). O diagnóstico definitivo pode ser obtido através de culturas bacteriológicas a partir de amostras de leite do quarto afetado (Radostits *et al.*, 2007, George *et al.*, 2008).

2.5.3.7. Tratamento

Segundo Suojala *et al.* (2013), a evidência da eficácia do tratamento antimicrobiano de mastite por *E. coli* é muito limitada, sendo que os únicos agentes antimicrobianos para os quais existe alguma evidência científica dos efeitos benéficos no tratamento da mastite por este agente são as fluoroquinolonas e as cefalosporinas. No caso de mastites por *E. coli* que apresentem sinais clínicos leves a moderados uma abordagem sem a administração de antimicrobianos (com tratamento anti-inflamatório, ordenha frequente e fluidoterapia) deve ser a primeira opção (Suojala *et al.*, 2013).

No entanto, em casos severos de mastite a administração parenteral de fluoroquinolonas ou cefalosporinas de terceira ou quarta geração, é recomendada devido ao crescimento ilimitado de bactérias na glândula mamária e consequente bacteriemia (Suojala *et al.*, 2013). Segundo

Ruegg (2010), num estudo recente realizado em dois grupos de vacas com mastites por *E. coli*, observou-se que a utilização de danofloxacina sistêmica num dos grupos conduziu a um aumento na eliminação da bactéria que resultou numa melhoria dos sinais clínicos, entre eles, diminuição da temperatura corporal e melhoria do apetite. De acordo com Suojala *et al.* (2013), a evidência da eficácia do tratamento antimicrobiano intramamário em mastites causadas por este agente é muito limitada e, por isso, não deve ser recomendada.

A administração de AINE é normalmente utilizada com a intenção de bloquear a inflamação, associada à endotoxemia. Os AINES devem ser utilizados com precaução por serem potencialmente tóxicos para o trato gastrointestinal e rins, sobretudo em animais muito desidratados (George *et al.*, 2008). Segundo Radostits *et al.* (2007), a administração de um AINE de longa ação (p.ex. carprofeno) reduz a febre, a taquicardia e o edema do úbere, associados à endotoxemia induzida por este tipo de mastite. Yeiser *et al.* (2012), concluiu que a administração de um AINE (flunixinina-meglumina) em vacas com mastite por *E. coli* conduz a um aumento da ingestão de matéria seca, da motilidade retículo-ruminal e da produção de leite.

A fluidoterapia intravenosa está indicada quando a desidratação é óbvia ou quando o apetite ou o consumo de água estão diminuídos. Soluções equilibradas de eletrólitos, tal como o lactato de ringer, são normalmente a melhor escolha, no entanto, animais severamente afetados que demonstram sinais de choque coincidente com acidemia requerem também terapia de reposição de bicarbonato. Para além disso, pode ser administrado cálcio a todas as vacas múltiparas com mastite por coliformes devido à possibilidade de hipocalcemia clínica ou subclínica (George *et al.*, 2008).

2.5.3.8. Prevenção

O controlo da mastite por coliformes é caracteristicamente difícil, incerto e frustrante. Para o controlo das mastites causadas por estes agentes tem que ser dado ênfase à prevenção de novas infeções (Radostits *et al.*, 2007) e, por esse motivo, os esforços devem concentrar-se na redução da exposição dos tetos às bactérias coliformes durante os períodos seco e periparto (Morin, 2009).

2.6. Controlo e prevenção da mastite

A prevenção da mastite é a abordagem mais importante e economicamente viável (Ryn, 2009; Arnold & Bewley, 2011). Os programas de controlo e prevenção da mastite têm como objetivo limitar a prevalência das infeções e, conseqüentemente, diminuir os impactos económicos na produção leiteira (Müller, 2002). Segundo Morin (2009), o controlo das mastites nas explorações passa por: determinar quais os agentes patogénicos que estão na sua origem, identificar e reduzir os reservatórios predominantes, identificar e limitar os principais fatores de risco para a transmissão e promover as defesas do hospedeiro.

Um passo importante no controlo das mastites foi a criação do chamado plano de cinco pontos, proposto e promovido pelo *National Institute for Research in Dairing* (NIRD), e posteriormente adotado pelo NMC (Radostits *et al.*, 2007).

O plano dos cinco pontos foi posteriormente atualizado para um plano de 10 pontos, compreendendo a mastite contagiosa e ambiental e a monitorização da mastite em geral (Radostits *et al.*, 2007). Assim, um programa de prevenção e controlo de mastite baseia-se nos 10 pontos fundamentais que se apresentam em seguida.

- **Procedimentos de ordenha adequados**

Os ordenhadores devem utilizar luvas descartáveis que devem ser mudadas, enxaguadas ou higienizadas quando se encontrarem sujas ou removidas após a ordenha de um animal infetado (NMC, 2001; Ruegg, 2004; Petersson-Wolfe *et al.*, 2010; Arnold & Bewley, 2011). A eliminação e observação dos primeiros três a quatro jatos de leite de cada quarto antes de cada ordenha deve ser uma prática comum em todas as explorações, facilitando a deteção precoce da mastite clínica e a descida do leite (NMC, 2001; Ruegg, 2004; Teixeira *et al.*, 2008; Langoni, 2013).

Realização apropriada de pré e pós-*dipping*, devendo garantir-se a cobertura adequada de todo o teto num período de tempo suficiente (20-30 segundos) (NMC, 2001; Arnold & Bewley, 2011; Petersson-Wolfe & Currin, 2011; Benić *et al.*, 2012; Middleton, 2013). Segundo vários autores, o pré-*dipping* reduz a incidência de novas IIM com agentes patogénicos ambientais em mais de 50% (Nickerson, 2001; Müller, 2002; Smith & Hogan, 2008). Quanto ao pós-*dipping*, a sua realização efetiva é responsável por uma diminuição significativa das mastites contagiosas (Müller, 2002; Arnold & Bewley, 2011).

Antes da colocação das tetinas, deve ser realizada a secagem efetiva dos tetos recorrendo-se à utilização de toalhas de papel individuais, limpas e secas (NMC, 2001; Zecconi, 2006; Arnold & Bewley, 2011; Petersson-Wolfe & Currin, 2011; Benić *et al.*, 2012; Middleton, 2013). Segundo Müller (2002), este procedimento é de extrema importância na higienização dos tetos já que pode reduzir em 50 a 85% os índices de novas infeções.

As tetinas devem ser colocadas no tempo de 90 segundos contados a partir do início da preparação do úbere, os deslizamentos devem ser corrigidos de forma rápida durante a ordenha e o sistema de vácuo desligado antes de retirar as tetinas (NMC, 2001; Müller, 2002; Arnold & Bewley, 2011). Deve ser estabelecida uma ordem de ordenha em que os animais com IIM sejam ordenhados por último, a fim de se diminuir a possibilidade de contaminações cruzadas (NMC, 2001; Müller, 2002; Zecconi, 2006; Arnold & Bewley, 2011).

- **Manutenção e uso adequado do equipamento de ordenha**

A limpeza do equipamento é tão importante quanto o maneo e a higiene da ordenha, sendo fundamental para a qualidade do leite (Müller, 2002). A instalação e manutenção do

equipamento devem ser realizadas segundo as normas internacionais (ISO 5707) (NMC, 2001; Müller, 2002). Deve realizar-se a manutenção e avaliação regular do funcionamento do equipamento de ordenha e proceder-se à lavagem minuciosa e desinfecção do mesmo após cada ordenha (NMC, 2001).

- **Maneio efetivo da vaca seca**

O objetivo do tratamento de secagem é eliminar as infeções presentes no momento da secagem e reduzir o aparecimento de casos de mastite durante o período de secagem (Müller, 2002; Radostits, *et al.* 2007). A composição energética da alimentação deve ser reduzida na última fase da lactação, a fim de reduzir a produção de leite. A secagem deve ser realizada de forma abrupta, aplicando-se o tratamento de secagem a todos os quartos imediatamente após a última ordenha. Em situações de elevada exposição a agentes ambientais, utilizar um selante de tetos interno ou externo em adição ao tratamento antibiótico (NMC, 2001).

É extremamente importante promover-se a otimização da resposta imunitária inespecífica através de uma boa nutrição adequada à vaca seca (NMC, 2001) e da suplementação com vitamina E e selénio duas a três semanas antes do parto (Petersson-Wolfe *et al.* 2010). A otimização da imunidade específica, através da vacinação, é também uma medida complementar útil no controlo de mastites por coliformes e por *S. aureus* (NMC, 2001, Müller, 2002; Smith & Hogan, 2008; Biggs, 2009; Schukken *et al.*, 2014; Bradley *et al.*, 2015).

- **Maneio adequado da mastite clínica durante a lactação**

Os casos de mastite clínica devem ser tratados imediatamente, sob orientação do médico veterinário (Müller, 2002). Deve ser desenvolvido e implementado um protocolo de tratamento de mastite clínica adequado ao efetivo e as diversas opções de custo do tratamento devem ser ponderadas cautelosamente. É importante que se recolha uma amostra de leite para cultura, antes do tratamento, para que os antibiogramas possam ser utilizados num momento apropriado (NMC, 2001; Müller, 2002).

O regime terapêutico aplicado deve ser apropriado, utilizando medicamentos de acordo com o protocolo. Antes de se realizar o tratamento, deve-se desinfetar o teto com germicida e a ponta do teto com algodão embebido em álcool. Na infusão dos antibióticos intramamários, utilizar uma dose única pelo método de inserção parcial (NMC, 2001). As vacas tratadas devem ser identificadas com precisão e registar todos os tratamentos. Quando necessário, após o tratamento de um caso de mastite clínica, e depois de cumprido o intervalo de segurança recomendado, testar o leite para a presença de resíduos antes da sua expedição (NMC, 2001). As infeções crónicas não responsivas não devem ser tratadas (NMC 2001; Müller, 2002; Ruegg, 2010).

- **Manutenção da biossegurança para agentes contagiosos e identificação dos animais com infeções crónicas**

Antes da aquisição de novos animais devem ser requisitados os dados referentes às CCS individuais e do tanque da exploração de proveniência e, sempre que possível, deve analisar-se bacteriologicamente, de modo individual, o leite dos animais a adquirir. Já na exploração, os animais adquiridos devem ser mantidos e ordenhados em separado, até que se comprove o seu estado de sanidade (NMC, 2001; Arnold & Bewley, 2011). Os animais cronicamente infetados com *S. aureus* ou com microrganismos não responsivos a antibióticos devem ser identificados e eventualmente optar-se pelo seu refugio (NMC, 2001; Arnold & Bewley, 2011).

- **Manutenção de um ambiente limpo, seco e confortável**

A manutenção dos animais em ambientes limpos, secos e confortáveis visa, em primeiro lugar, minimizar os problemas relativos às mastites ambientais, tendo no entanto, um reflexo indireto nas taxas de mastite contagiosa. Animais com úberes sujos exigem maiores cuidados na preparação pré-ordenha (Müller, 2002).

Uma vez que muitos casos de mastite têm origem no período pré-parto, a higiene dos locais de parto é um aspeto muito importante. Em regimes de pastoreio permanente as pastagens bem drenadas, sem grandes acumulações de água e lamas, são preferíveis como locais de parto (Pettersson-Wolfe *et al.* 2010). Para além dos aspetos relativos à higiene é importante assegurar uma dimensão e conceção corretas das camas, espaços livres suficientes para o número de animais na exploração e assegurar o bom funcionamento do sistema de ventilação (NMC, 2001 Radostits *et al.*, 2007; Morin, 2009).

O controlo de insetos é um aspeto muito importante uma vez que estes causam traumatismos nas extremidades dos tetos e disseminam as bactérias entre vacas (Biggs 2009; Arnold & Bewley, 2011; Benić *et al.*, 2012). Por fim, após a saída da sala de ordenha, os animais devem ter alimento disponível na manjedoura, a fim de se assegurar que se mantêm em estação no período imediatamente a seguir à ordenha (NMC, 2001; Biggs, 2009, Langoni, 2013).

- **Manutenção de um bom sistema de registos**

Os registos devem incluir informações importantes como o registo da CCS individual a fim de se obterem indicações das prevalências e incidências de mastites subclínicas na exploração e, para cada caso de mastite clínica, a identificação da vaca, a data em que a mastite foi detetada, os dias de lactação, qual(ais) o(s) quarto(s) infetado(s), o número e tipo de tratamentos, resultado dos tratamentos e o agente patogénico causador, caso se tenha realizado cultura bacteriológica. Estes registos constituem informações necessárias à monitorização das condições sanitárias do úbere e à tomada de decisões específicas relativamente a cada caso (NMC, 2001; Wenz, 2004; Radostits *et al.* 2007).

- **Monitorização da saúde do úbere**

É importante aderir a um programa de CCS individuais ou recorrer a outros métodos para monitorizar as infeções subclínicas. Devem realizar-se regularmente culturas bacteriológicas dos casos clínicos e das vacas com CCS elevadas. Monitorizar a saúde do úbere do efetivo através do contraste leiteiro. As taxas de mastite clínica e a sua distribuição devem ser calculadas com regularidade, tendo especial atenção às IIM nas novilhas. Por fim, deve recorrer-se às CCS e aos registos de mastite clínica para avaliar os protocolos de tratamento e tomar decisões importantes (NMC, 2001).

- **Revisão periódica do programa de controlo**

É conveniente requerer avaliações objetivas do médico veterinário e de pessoas ligadas à indústria leiteira. A utilização de uma abordagem passo a passo e de um formulário *standard* pode ser útil. Nesta revisão, deve ter-se em conta toda a equipa da exploração – o médico veterinário, o produtor, os trabalhadores, o pessoal da ordenha e os consultores (NMC, 2001).

- **Estabelecimento de metas para a saúde do úbere**

Devem ser estabelecidas metas realistas para a média da CCS e para a taxa de mastite clínica. A revisão dos objetivos deve ser feita regularmente pela equipa de trabalho e deve dar-se prioridade a mudanças de gestão a fim de se atingirem as metas estabelecidas (NMC, 2001).

2.6.1. Papel da vacinação na prevenção das mastites por *Staphylococcus* spp. e coliformes

Muitas estratégias de prevenção têm sido aplicadas a fim de minimizar a incidência da mastite bovina, entre as quais, a otimização dos procedimentos e da higiene da ordenha, terapias antimicrobianas, vacinações, separação das vacas problema e refugio dos animais persistentemente infetados. No entanto, as mastites continuam a ser uma importante doença nas explorações leiteiras, daí que a redução na severidade dos sinais clínicos, em caso de mastite, e a obtenção de uma mais rápida eliminação das infeções já estabelecidas sejam de grande valor para os produtores (Cha *et al.*, 2011; Schukken *et al.*, 2014).

As vacinas de prevenção da *E. coli* contêm a estirpe J5 desta bactéria, inativada, o que resulta na produção de anticorpos contra a componente uniforme de LPS da membrana externa das bactérias gram-negativas, que é responsável pela severidade da sintomatologia associada aos casos de mastite hiperaguda por *E. coli* (Piepers, 2014). A eficácia desta vacina foi demonstrada através de estudos que concluíram que a imunização com a bacterina J5 reduz a severidade da sintomatologia local e sistémica associada às mastites causadas por *E. coli* (Wilson *et al.*, 2007; Schukken *et al.*, 2011). Molina *et al.* (2013) concluíram que a vacinação com *E. coli* J5 demonstrou ser eficaz em reduzir a prevalência de IIM no pós-parto, bem como a ocorrência e intensidade dos casos clínicos de mastite, causados por *E. coli*, nos primeiros 100 dias de lactação.

A eficácia da vacinação para prevenção de *S. aureus* e SCN tem um conceito muito diferente da eficácia de vacinação para a *E. coli*. Enquanto no caso da vacina da *E. coli* é expectável a redução da severidade da infeção, no caso do *S. aureus* e SCN a vacina é particularmente importante quando os resultados da vacinação promovem a redução da incidência e da duração da infeção (Schukken *et al.*, 2014). A vacina para prevenção das mastites por *S. aureus* é composta por uma bacterina de estirpes de *S. aureus* com componentes particulares da parede celular, tais como exopolissacáridos, que estão envolvidos no fenótipo de biofilme dos *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (Piepers, 2014; Schukken *et al.*, 2014).

Os resultados de dois estudos internacionais recentemente publicados (Schukken *et al.*, 2014, Bradley *et al.*, 2015), nos quais foi testada a eficácia de uma vacina multivalente (Startvac[®], Hipra) no controlo da mastite, evidenciaram uma redução efetiva da incidência e duração de IIM por *S. aureus* e SCN, uma maior hipótese de cura de IIM causadas por estes agentes, uma redução da severidade das mastites agudas por coliformes e, conseqüentemente, um aumento da produção de leite em animais vacinados relativamente aos que não foram vacinados (Schukken *et al.*, 2014, Bradley *et al.*, 2015). Segundo Schukken *et al.*, (2014), a eficácia da vacinação pode variar com as diferentes práticas de manejo das explorações, assim como com a idade dos animais, particularmente no caso do *S. aureus*, sendo os animais em primeira lactação aqueles em que se verificam melhores resultados relativamente a animais com três ou mais lactações. Os autores referem ainda que a vacinação terá que ser combinada com procedimentos de ordenha muito bons, refugo dos animais infetados entre outros procedimentos, para que se reduza efetivamente a incidência e duração da infeção por *S. aureus* (Schukken *et al.*, 2014).

2.7. Impacto económico

A mastite bovina é um problema sério em explorações leiteiras de todo o mundo, sendo uma das doenças mais frequentes e mais dispendiosas. No entanto, os custos das mastites são frequentemente subestimados pelos produtores, o que pode muitas vezes resultar da dificuldade de reconhecimento de todos os componentes do custo total (Heikkilä *et al.*, 2012).

As mastites estão associadas a prejuízos que podem ser de natureza direta ou indireta. Os custos de natureza direta incluem despesas com tratamentos (assistência médico-veterinária e terapia), mão-de-obra, quantidade de leite rejeitado (durante o período de tratamento e no intervalo de segurança), redução na quantidade e qualidade de leite produzido (Petrovski *et al.*, 2006; Nielsen, 2009) e ainda, custos associados aos casos fatais e aos casos repetidos de mastite. Em muitos casos, os prejuízos de natureza direta são as únicas despesas das quais os produtores se apercebem (Petrovski *et al.*, 2006).

Os custos indiretos são aqueles que nem sempre são evidentes para o produtor de leite sendo, por isso, referidos como despesas ocultas (Nielsen, 2009). A educação dos produtores relativamente a estes custos é necessária e importante uma vez que o desconhecimento das

perdas indiretas pode ser a razão para a dificuldade de implementação de medidas de controlo na exploração (Petrovski *et al.*, 2006). Os custos indiretos incluem a redução da produção e qualidade do leite, recidivas durante a lactação, aumento da predisposição a outras doenças, aumento do risco de refugo, elevadas taxas de substituição e perda do potencial genético. No que se refere às mastites subclínicas, os prejuízos indiretos referem-se a efeitos no efetivo leiteiro (fonte de infeção para outras vacas, aumento da incidência de mastites clínicas e redução da produção), penalização financeira por alteração da qualidade de leite, elevada CCS, presença de microrganismos no leite e pelo aparecimento de resíduos antibióticos no leite (Biggs, 2009).

As perdas são diretamente proporcionais à percentagem de quartos infetados com mastite (tabela 14), tendo em consideração o efetivo animal em produção (Teixeira *et al.*, 2008).

Tabela 14. Prevalência estimada de infeções no efetivo e perdas de produção associadas a elevadas CCS no leite do tanque (NMC, 1996 citado por Schroeder, 2012).

CCS/mL no tanque	Quartos infetados (%)	Perda na produção (%)
200.000	6	0
500.000	16	6
1.000.000	32	18
1.500.000	48	29

CCS – contagem de células somáticas

3. Trabalho experimental

Fatores de risco associados à prevalência de *Staphylococcus* spp. e coliformes no leite do tanque de explorações da ilha de São Miguel, Açores

3.1. Introdução

A mastite bovina afeta uma elevada proporção de animais em todo o mundo e continua a ser a principal causa de perdas financeiras para a indústria leiteira (Piepers, 2014; Bradley *et al.*, 2015) e um grande desafio para os produtores de leite, existindo ainda um elevado número de explorações com níveis inaceitáveis da doença (Bradley *et al.*, 2015). A ocorrência de mastite é complexa e é causada por três fatores principais: exposição ao microrganismo, mecanismos de defesa do animal e fatores relacionados com o ambiente e o manejo (Zadoks *et al.*, 2001). O conhecimento da prevalência e distribuição dos agentes patogénicos causadores de mastite, bem como dos fatores de risco que estão associados à ocorrência de mastite, são cruciais para o desenvolvimento de medidas preventivas que promovam o controlo da disseminação da doença (Zadoks *et al.*, 2001; Riekerink *et al.*, 2010).

A análise e a monitorização do leite do tanque numa exploração leiteira é um método útil e eficiente para avaliação da qualidade do leite produzido na exploração (Cicconi-Hogan *et al.*, 2013). A cultura bacteriológica das amostras de leite foi durante muitos anos o método de eleição para a identificação de agentes patogénicos causadores de mastite. Uma vez que a sensibilidade de uma única cultura bacteriológica realizada a partir de uma amostra de leite do

tanque é limitada, os métodos moleculares têm sido sugeridos a fim de incrementar a sensibilidade da deteção de agentes patogénicos intramamários. Os métodos de PCR, em particular, têm sido cada vez mais utilizados no diagnóstico da mastite (Katholm *et al.*, 2012). Taponen *et al.* (2009) concluiu que a PCR em tempo real pode resultar num diagnóstico bacteriológico para, aproximadamente, metade dos casos em que os resultados das culturas bacteriológicas são negativos.

A economia dos Açores é baseada na agropecuária, sendo a produção leiteira e os lacticínios o mais importante sector económico, o qual emprega cerca de 17,6% da população ativa total (Pinto, 2010). Existem atualmente cerca de 51.684 bovinos de aptidão leiteira na ilha de São Miguel (SDASM, 2014) e, no ano de 2014, foram entregues nas fábricas do arquipélago dos Açores 579 154 841 litros de leite, dos quais 377 241 220 litros foram produzidos na ilha de São Miguel (SREA, 2015). A grande maioria das explorações de bovinos leiteiros nos Açores são normalmente fragmentadas e dispersas em pequenas parcelas de pastoreio (Pinto, 2010). Uma vez que os animais estão permanentemente na pastagem e a ordenha é realizada recorrendo a máquinas de ordenha móveis, este é um sistema com práticas de manejo muito particulares e características.

Os objetivos deste estudo foram os seguintes: (1) determinar a prevalência de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase-negativos e coliformes em 100 explorações da ilha de São Miguel, detetados recorrendo à técnica PCR em tempo real a partir de amostras colhidas no tanque do leite, (2) avaliar a correlação entre as práticas de manejo aplicadas neste sistema de produção e as prevalências encontradas para estes agentes, (3) avaliar a influência destes agentes na contagem de células somáticas no leite do tanque das explorações onde foram detetados, (4) identificar quais os fatores que mais significativamente contribuem para a ocorrência destes agentes no tanque do leite a fim de futuramente se melhorarem e implementarem planos de controlo de mastites adequados.

3.2. Materiais e métodos

3.2.1. Amostragem

Para este estudo foram consideradas 345 explorações leiteiras, que correspondem a cerca de 12.000 vacas em lactação, localizadas na ilha de São Miguel, Açores, e pertencentes a associados da AJAM.

Para que a amostragem abrangesse toda a ilha, procedeu-se à divisão da mesma em 8 regiões diferentes - Nordeste, Povoação, Vila Franca do Campo, Lagoa, Ribeira Grande/Lomba da Maia, Ponta Delgada, Arrifes e Sete Cidades – e, em cada uma destas regiões, selecionaram-se, no mínimo, 25% das explorações leiteiras de acordo com a sua dimensão e práticas de manejo aplicadas (tabela 15). Devido ao facto de a totalidade das explorações pertencerem a associados da AJAM, todas as explorações foram visitadas em variadas ocasiões durante o período de Fevereiro a Junho de 2014 no âmbito do acompanhamento dos serviços médico-

veterinários, o que permitiu ir conhecendo cada exploração, sobretudo no que se refere a procedimentos de ordenha e outros aspetos do manejo higiênico e sanitário.

No total, foram selecionadas para este estudo 100 explorações, o que corresponde a cerca de 6065 vacas em lactação, e em 95% destas explorações era praticado um sistema de pastoreio permanente. O tamanho dos efetivos das explorações incluídas no estudo variou entre as 20 e as 260 vacas em lactação

Tabela 15. Número de explorações por região nas quais foram recolhidas amostras de leite.

Região	Explorações associadas AJAM	
	Número total	Selecionadas
Nordeste	35	10
Povoação	30	8
Vila Franca do Campo	20	6
Lagoa	26	8
Ribeira Grande/Lomba da Maia	39	11
Ponta Delgada	79	20
Arrifes	86	27
Sete Cidades	30	10
Total	345	100

3.2.2. Recolha de amostras

Para a colheita das amostras, cada exploração foi visitada durante o decorrer da ordenha da manhã ou da tarde e, em cada exploração, foi recolhida no final da ordenha, uma amostra de 30 mL de leite do tanque, após homogeneização. Para a colheita asséptica das amostras utilizaram-se frascos estéreis, abertos apenas no momento da colheita e fechados e identificados logo de seguida. As amostras foram transportadas em mala de transporte isotérmica e mantidas a uma temperatura entre 2 e 6°C, até ao seu processamento, efetuado no mesmo dia da colheita, com um intervalo máximo de seis horas entre a colheita e o processamento. Em cada uma das 100 explorações envolvidas no estudo recolheu-se uma amostra de leite do tanque, perfazendo um total de 100 amostras.

3.2.3. Inquéritos

Com o objetivo de avaliar todas as explorações envolvidas no estudo, efetuou-se um questionário (anexo I) elaborado para avaliação das observações feitas no decorrer da ordenha e das respostas dos produtores a várias questões relacionadas com o manejo e que podem, segundo a literatura científica consultada, constituir fatores de risco para a ocorrência de mastites por *S. aureus*, SCN, *E. coli* e outras bactérias coliformes (COL). Assim, consideraram-se cinco grupos principais: 1) higiene dos procedimentos da ordenha (higiene da ordenha, higiene do úbere/tetos, higiene das caudas, utilização de luvas, pré-*dipping*, secagem dos tetos antes da colocação das tetinas, eliminação dos primeiros jatos de leite, higiene das tetinas entre a ordenha de cada vaca, pós-*dipping* e ordenha das vacas com mastite no final); 2) máquina de ordenha e tanque do leite (máquina de ordenha móvel, utilização de água quente

no ciclo de lavagem da máquina de ordenha e tipo de tanque do leite); 3) período de vaca seca (método de secagem, aplicação de tratamento de secagem a todas as vacas, tratamento de secagem de acordo com ATB, aplicação de selantes e separação das vacas secas); 4) diagnóstico e tratamento da mastite (implementação de contraste leiteiro, realização de TCM, realização de antibiograma (ATB) antes do tratamento, assistência veterinária e realização e manutenção de registos de tratamentos); e 5) manejo dos vitelos (ingestão do colostro por amamentação direta, administração de colostro e substituição do efetivo).

Todos os inquéritos foram preenchidos pela mesma pessoa e, desta forma, as avaliações em alguns dos pontos foram realizadas sempre com o mesmo critério. No que se refere às instalações, a classificação da ventilação foi realizada por meio da avaliação da temperatura e da humidade no interior das instalações. O número e higiene dos bebedouros classificaram-se por observação do número de bebedouros disponíveis (no mínimo dois pontos de abeberamento de dimensões adequadas por grupo de 10 animais) e das condições de higiene em que se encontravam (acumulação de sedimentos de alimento, camas, fezes). Apesar de inicialmente terem sido incluídos no inquérito, nenhum dos aspetos relacionados com as instalações foi tido em conta neste estudo devido ao número muito baixo de explorações em que era praticado um sistema de estabulação.

A higiene da ordenha classificou-se em elevada, média ou baixa tendo em conta as condições de higiene de todos os equipamentos utilizados na ordenha, a manutenção da higiene da sala de ordenha durante o decorrer da mesma e ainda, a higiene e rigor com que eram realizados todos os procedimentos. Relativamente à higiene dos animais, as classificações foram realizadas com base no sistema utilizado por Ruegg (2004). Assim, no caso dos úberes sujos (grau 4) a sua higiene classificou-se em “baixa”, moderadamente sujos (grau 3) a higiene classificou-se em “média” e para os úberes limpos (grau 1 a 2) a higiene foi classificada em “elevada”.

No que se refere ao tipo de tanque do leite, a opção “ambos” refere-se às explorações que possuíam ambos os tipos de tanque de leite: tanques móveis (não refrigerados) e tanques refrigerados. Nestes casos, o produtor recolhe o leite em primeiro lugar para o tanque móvel (não refrigerado) sendo este transportado, após o final de cada ordenha, até à exploração onde é transferido para o tanque refrigerado. A limpeza do tanque foi classificada em insatisfatória nos casos em que estes se encontravam em condições de higiene visivelmente inadequadas.

O registo da CCS do tanque foi efetuado na visita para recolha das amostras, com base na média dos três últimos registos mensais enviados pela indústria leiteira aos produtores.

Sempre que possível preencheram-se os questionários durante as visitas para recolha das amostras e, quando não foi possível, procedeu-se ao preenchimento dos mesmos nos dias imediatamente após o dia da colheita. Após a realização da totalidade dos inquéritos, todos os

dados obtidos nos questionários foram inseridos numa base de dados criada no programa Excel[®] (versão 2007) a fim de, posteriormente, se proceder à sua análise.

3.2.4. Processamento das amostras

Todas as amostras foram processadas no próprio dia da colheita, tendo sido utilizados, para este efeito, kits *Startcheck*[®], de acordo com as instruções do fabricante. O *Startcheck*[®] (HIPRA, Amer, Espanha) é uma ferramenta de diagnóstico complementar recentemente criada pelos laboratórios HIPRA para deteção dos principais agentes causadores de mastite – *S. aureus*, SCN, *E. coli* e COL – em amostras de leite do tanque. O teste consiste numa matriz de celulose - cartão FTA[®] - no qual as amostras são inoculadas e fixadas. No próprio cartão FTA[®] está assinalado um círculo, identificado para inoculação de leite do tanque. No centro do círculo foram inoculados 250µl da amostra recorrendo à utilização de uma pipeta estéril, fornecida juntamente com o teste. Todo o procedimento foi realizado utilizando luvas. Antes das inoculações o *Startcheck*[®] foi devidamente identificado com o nome da exploração à qual pertencia a amostra nele inoculada e preenchida a ficha de requisição de análise que acompanha o teste. Após um período de secagem, de cerca de uma hora, o teste foi colocado dentro de uma bolsa de fecho hermético juntamente com um agente conservante.

Por fim, os testes foram colocados em envelope juntamente com a ficha de requisição de análise e enviados por correio para os laboratórios Diagnos Laboratory (Hipra) em Amer, Girona, Espanha. Todas as amostras foram testadas para a presença de *S. aureus*, SCN, *E. coli* e outras bactérias coliformes através da realização de PCR multiplex em tempo real.

Os resultados da PCR provenientes do laboratório apresentaram-se classificados em negativo ou em diversos graus de positividade: +, ++ ou +++, de acordo com o número de ciclos de amplificação (*cycle threshold* (Ct) da PCR: classificaram-se em + quando o Ct foi superior a 27 e inferior a 37, ++ se o Ct foi superior a 17 e inferior a 27 e, por último, em +++ nos casos em que o Ct foi inferior a 17. Desta forma, para cada agente bacteriano, foram consideradas positivas as amostras cujo número de ciclos foi inferior a 37.

3.2.5. Análise estatística

A análise estatística teve como objetivos avaliar a influência dos agentes em estudo- *S. aureus*, SCN, *E. coli* e COL - na contagem de células somáticas no tanque e identificar quais os fatores em estudo significativamente associados à prevalência destes agentes no leite do tanque.

Na análise descritiva considerou-se, além da descrição da percentagem das explorações positivas a cada agente, o seu intervalo de confiança (IC) de 95%. Utilizou-se o teste do qui-quadrado para comparar diferentes percentagens entre si.

Cada variável dependente (agente microbiano) foi testada independentemente das restantes. Na categorização das variáveis independentes, e de acordo com o número de opções em cada resposta no inquérito, foi atribuído a cada fator uma letra: N (não), S (sim) ou A, B, C ou D.

Os resultados da PCR no tanque do leite para cada agente constituíram as variáveis dependentes. Para efeitos da análise por regressão logística, os resultados foram transformados em variáveis nominais: 0 ou 1 quando negativas ou positivas, respetivamente. Para isso, cada um dos resultados da PCR respeitantes a cada um dos agentes em estudo foram classificados em negativo (0) ou positivo (1), independentemente da classificação inicial deste último em +, ++ ou +++.

Foram utilizadas regressões logísticas univariadas e calculados os respetivos *odds ratios* e, para este efeito, foram considerados os *Likelihood ratio tests* e cada modelo/efeito foi considerado positivo para um nível de significância de $P < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas recorrendo ao programa estatístico JMP[®], versão 7.

Tentou-se ainda construir um modelo final de regressão logística multivariada através do método descrito por Hosmer and Lemeshow (1989). Embora se tivesse inicialmente usado um nível de significância de $P < 0,25$ ou $P < 0,05$ para seleção de variáveis independentes, não foi possível construir este modelo, provavelmente devido ao tamanho relativamente pequeno da amostra e/ou à contaminação do leite por fatores de natureza diversa.

3.3. Resultados

3.3.1. Resultados descritivos dos inquéritos

A realização dos inquéritos durante as visitas às explorações em estudo permitiu obter os dados em bruto relativos aos aspetos de maneio produtivo e higio-sanitário de cada exploração, expressos seguidamente.

3.3.1.1. Contagem de células somáticas

As CCS no tanque foram ≤ 150.000 células por mililitro (céls/mL) em 12% das explorações, >150.000 e ≤ 250.000 céls/mL em 47%, >250.000 e ≤ 400.000 céls/mL em 36% e >400.000 céls/mL em 5% (gráfico 3).

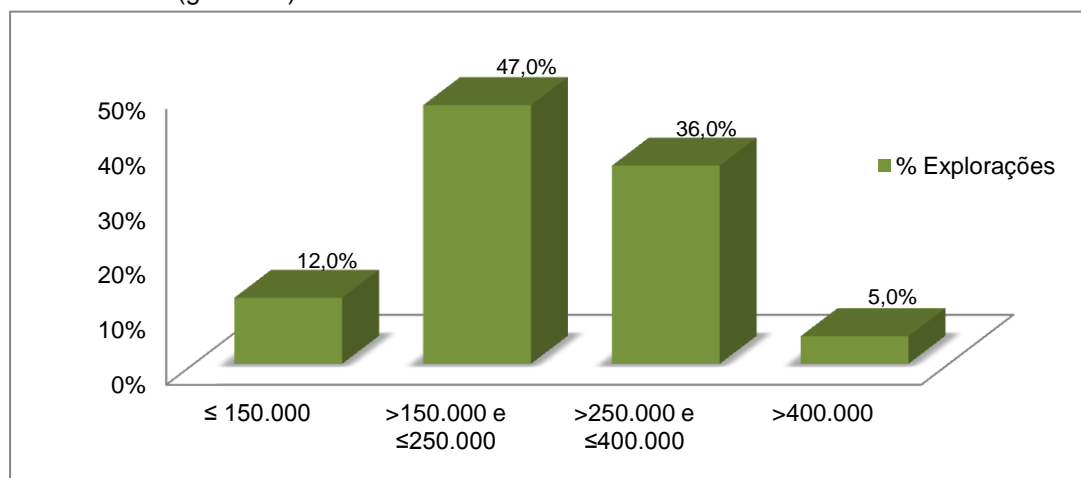


Gráfico 3. Distribuição das explorações segundo a sua contagem de células somáticas (CCS) no leite do tanque.

3.3.1.2. Higiene dos procedimentos da ordenha

Em 47% das explorações a higiene dos úberes/tetos classificou-se em “elevada” e 12% obtiveram esta classificação para o estado de limpeza das caudas, tendo as restantes obtido classificações inferiores em ambos os parâmetros.

Quanto à higiene da ordenha, 34% das explorações obtiveram uma avaliação de “elevada”, em 11% a classificação foi “baixa” e nas restantes 55% “média”. Em apenas 19% das explorações os ordenhadores utilizavam luvas durante a ordenha.

Na preparação dos úberes observou-se que em 27% se realizava *pré-dipping* e 35% realizava a secagem dos tetos antes da colocação das tetinas. A eliminação dos primeiros jatos de leite de cada quarto antes da ordenha era realizada em 83% das explorações e 86% realizava *pós-dipping*. A higiene das tetinas entre vacas ordenhadas era efetuada em 34% das explorações.

Relativamente à ordem da ordenha, somente uma exploração realizava a ordenha por grupos (vacas recém-paridas, vacas de alta produção, vacas de média e baixa produção, vacas com CCS elevadas, com mastite e/ou em tratamento), em 60% das explorações as vacas com mastite clínica eram ordenhadas sem ordem especial, ou seja, aleatoriamente, e 39% ordenhava-as no final (gráfico 4).

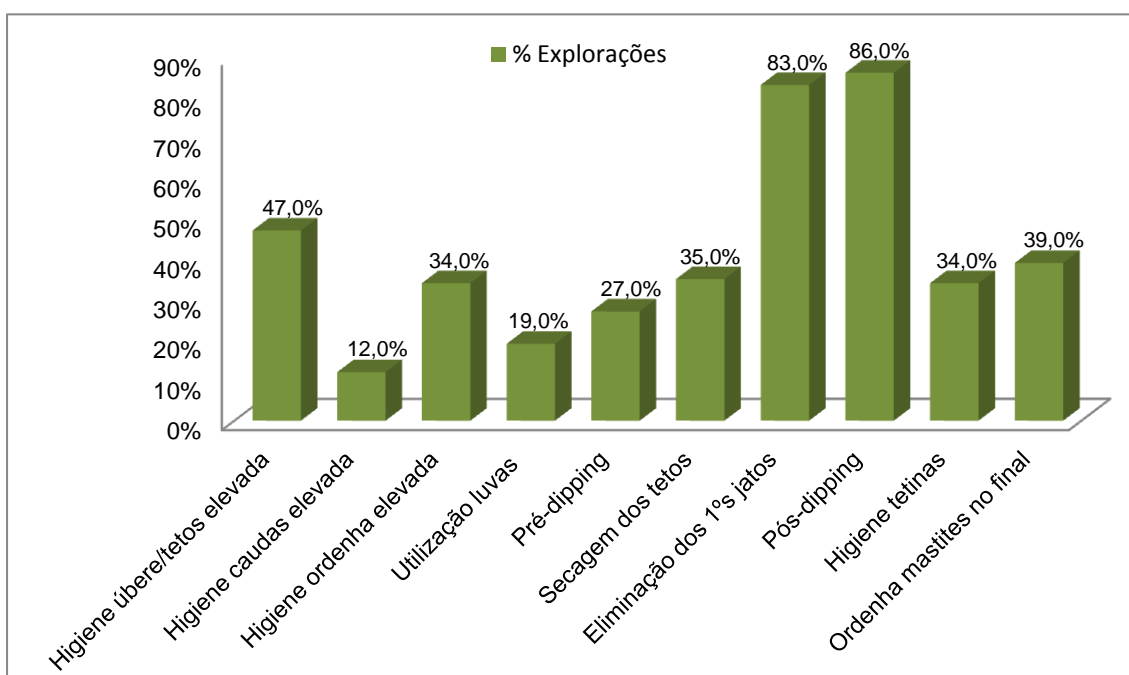


Gráfico 4. Fatores em estudo relacionados com a higiene dos procedimentos da ordenha e respetiva percentagem de explorações onde foram verificados.

3.3.1.3. Máquina de ordenha e tanque do leite

Em 51% das explorações as ordenhas eram móveis e 37% utilizavam água quente no processo de lavagem das máquinas de ordenha. Apenas 35% das explorações possuíam tanque de leite

refrigerado, 60% das explorações possuíam tanque móvel (não refrigerado) e os restantes 5% possuíam ambos os tipos de tanque (gráfico 5).

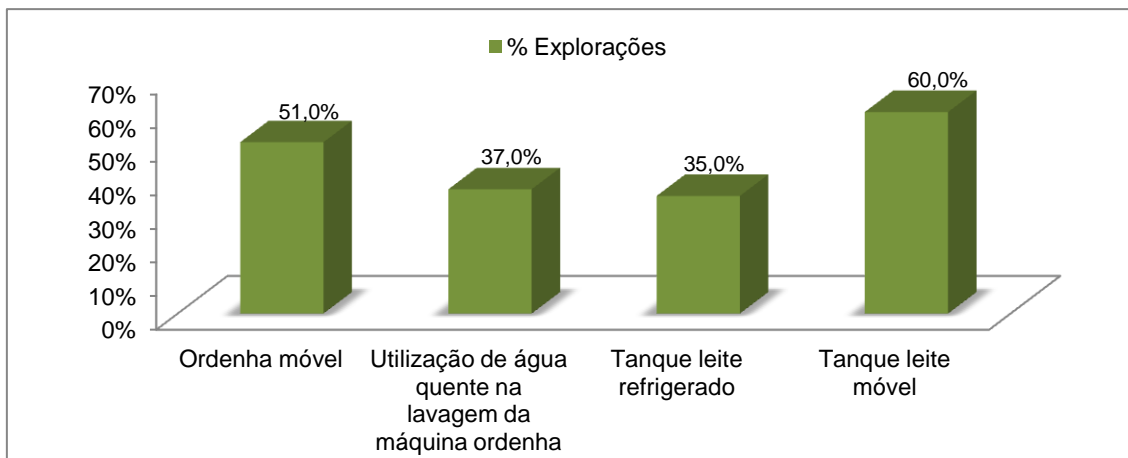


Gráfico 5. Percentagem de explorações onde se verificou a utilização de ordenhas móveis, de água quente na higienização da máquina e de tanques de leite móveis e refrigerados.

3.3.1.4. Período de vaca seca

Observou-se, como expresso no gráfico 6, que em 54% das explorações a secagem era realizada de forma abrupta, em 97% era aplicada terapia de secagem em todas as vacas e em apenas 5% o tratamento de secagem era aplicado em função do antibiograma. Apenas 5% dos produtores recorria à aplicação de selantes. Em 64% das explorações as vacas secas eram separadas das vacas em lactação.

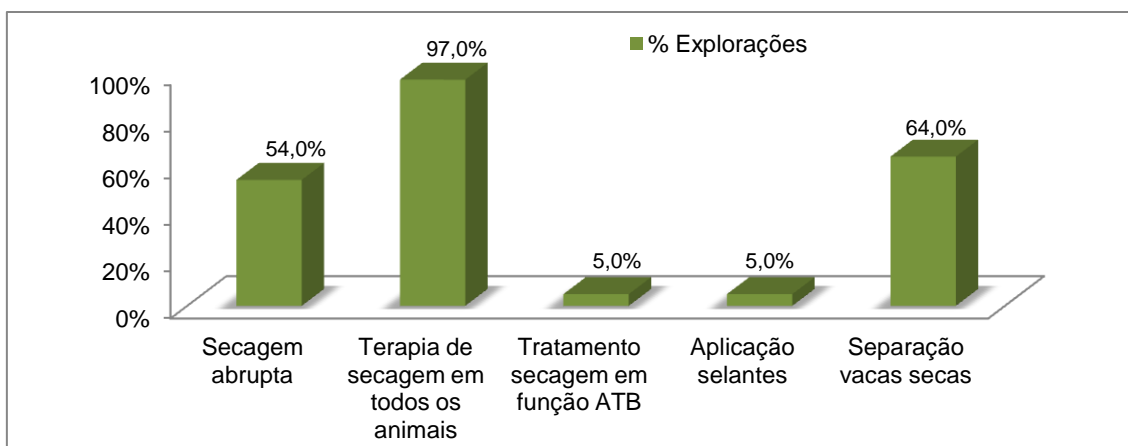


Gráfico 6. Fatores em estudo relacionados com o período de secagem das vacas e respetiva percentagem de explorações onde foram verificados. ATB – antibiograma.

3.3.1.5. Diagnóstico e tratamento das mastites

Relativamente ao diagnóstico de mastites, 85% das explorações utilizavam TCM para deteção de mastites, sendo que em 71% das explorações este não era realizado de forma periódica mas unicamente quando se suspeitava de mastite. Constatou-se que em 20% das explorações se realizava periodicamente o contraste leiteiro.

Em 16% das explorações realizava-se antibiograma antes do tratamento das mastites e em apenas 28% se realizavam registos dos tratamentos efetuados. Em 23% das explorações o primeiro procedimento após deteção de mastite era a solicitação da assistência veterinária (gráfico 7). Constatou-se que apenas um entre os 100 produtores vacinava o seu efetivo para prevenção de mastites, sendo a Startvac® (HIPRA, Amer, Espanha) a vacina utilizada por este produtor.

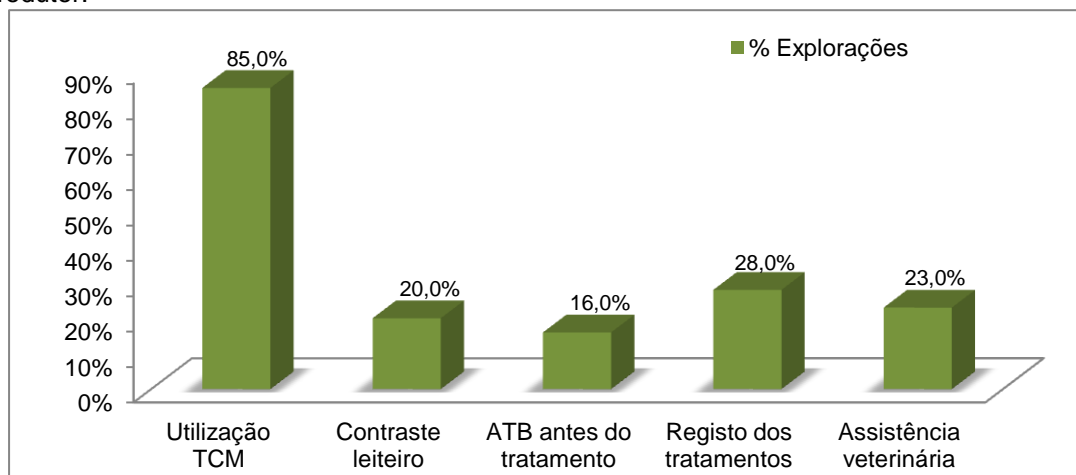


Gráfico 7. Fatores em estudo relacionados com o diagnóstico e tratamento das mastites e respetiva percentagem de explorações onde foram verificados. TCM – teste californiano de mastites; ATB – antibiograma.

3.3.1.6. Maneio dos vitelos

Tal como se pode observar no gráfico 8, em 33% das explorações os vitelos ingeriam o colostro por amamentação direta e em 69% a administração do colostro era realizada pelo produtor. A substituição do efetivo com animais nascidos na exploração era realizada em 91% das explorações.

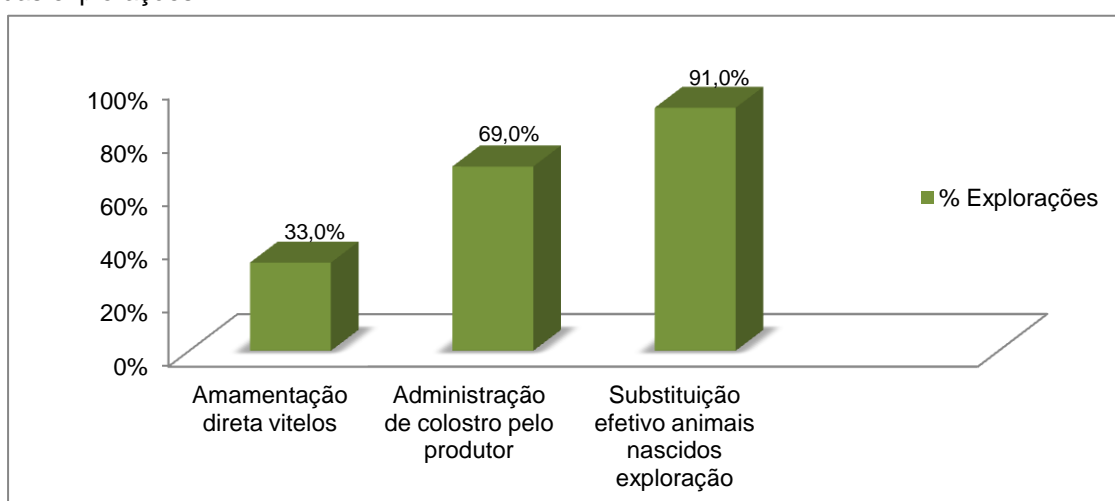


Gráfico 8. Fatores em estudo relacionados com o maneio dos vitelos e respetiva percentagem de explorações onde foram verificados.

3.3.2. Análise descritiva dos resultados da PCR

Na tabela 16 podem observar-se as diferentes percentagens de deteção bacteriana de acordo com os resultados da PCR enviados pelo laboratório.

Tabela 16. Percentagem de explorações negativas e positivas à PCR para cada agente, nas amostras de leite do tanque, e seus intervalos de confiança (IC) de 95% (n=100).

Resultado	Percentagem de explorações e IC 95%			
	<i>S. aureus</i>	SCN	<i>E. coli</i>	Outros coliformes
Negativo	41,0% (31,9 – 50,8%)	-	25,0% (17,5 – 34,3%)	65,0% (55,3 - 73,6%)
Positivo	(+) >27 <37 Ct	-	21,0% (14,2 – 30,0%)	6,0% (2,8 – 12,5%)
	(++) >17 <27 Ct	89,0% (81,4 – 93,7%)	40,0% (30,1 – 49,8%)	15,0% (9,3 – 23,3%)
	(+++) < 17 Ct	11,0% (6,3 – 18,6%)	14,0% (8,5 – 22,1%)	14,0% (8,5 – 22,1%)

Ct – cycle threshold; IC 95% - intervalo de confiança de 95%; SCN – *Staphylococcus coagulase* negativos.

Da análise dos resultados enviados pelo laboratório constatou-se que, no total, *S. aureus* foi detetado em 59% (IC 95%: 49,2 – 68,1%) das amostras, SCN foi detetado em 100% (IC 95%: 96,3 – 100,0%) das amostras, *E. coli* e outros coliformes foram detetados em 75% (IC 95%: 65,7 – 82,5%) e 35% (IC 95%: 26,4 – 44,8%) das amostras, respetivamente (gráfico 9).

Das amostras positivas, 79,7% (47/59) foram simultaneamente positivas a *S. aureus* e *E. coli* e 42,4% (25/59) a *S. aureus* e COL. *E. coli* e outras bactérias coliformes foram detetadas em simultâneo em 38,7% (29/75) das amostras. Em 22% (22/100) das explorações foram detetados concomitantemente todos os agentes em estudo.

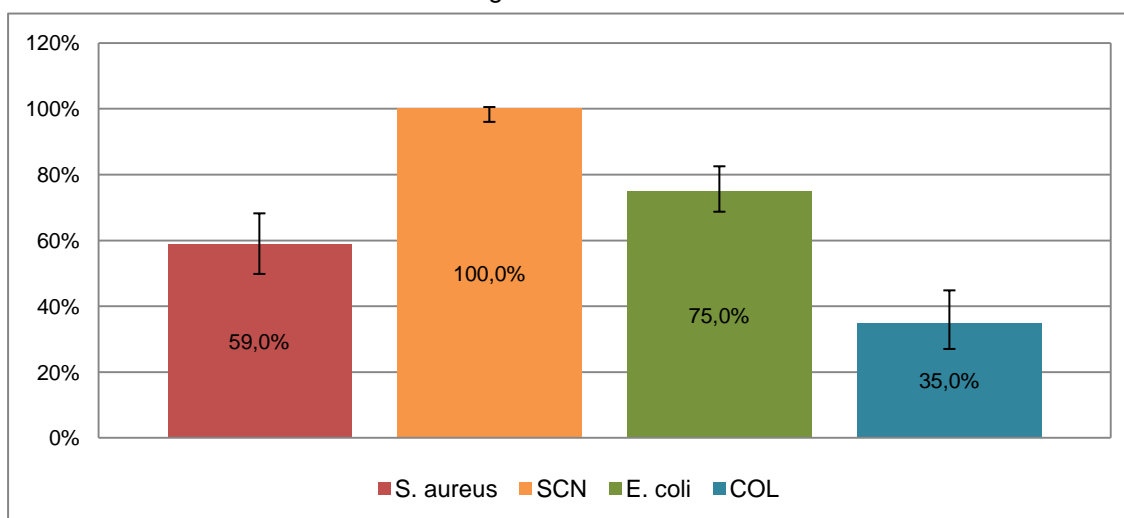


Gráfico 9. Prevalência de *S. aureus*, SCN, *E. coli* e COL no tanque de explorações da ilha de São Miguel (n=100). As barras de erro correspondem aos intervalos de confiança de 95%. SCN - *Staphylococcus coagulase* negativos; COL – outros coliformes.

3.3.3. Influência dos agentes estudados na contagem de células somáticas no tanque

Observou-se um efeito significativo do *S. aureus* na CCS no leite do tanque ($P < 0,001$). Assim, explorações cujas CCS foram >150.000 e ≤ 250.000 céls/mL tiveram uma probabilidade 6,2 (OR; $P = 0,03$) vezes superior de ser detetado *S. aureus* no leite do tanque relativamente a explorações onde as CCS foram ≤ 150.000 céls/mL. Para explorações cujas CCS foram >250.000 e ≤ 400.000 céls/mL e explorações cujas CCS foram >400.000 céls/mL, estas probabilidades foram de 13,0 (OR; $P < 0,01$) e 46,2 (OR; $P = 0,02$), respetivamente (tabela 17).

Relativamente aos restantes agentes, *E. coli* e COL, não foi observado um efeito significativo dos mesmos sobre a CCS no leite do tanque ($P = 0,07$ e $P = 0,50$, respetivamente).

Tabela 17. Percentagem de explorações positivas a *S. aureus* no leite do tanque, OR e respetivos IC 95% de acordo com a CCS no tanque.

CCS tanque (céls/mL)	Explorações positivas (%)	Odds ratio	IC 95%	Valor P
≤ 150.000	16,7% (2/12)	Referência	-	-
>150.000 e ≤ 250.000	55,3% (26/47)	6,2	1,2 – 31,4	0,03
>250.000 e ≤ 400.000	72,2% (26/36)	13,0	2,4 – 70,1	0,003
> 400.000	100% (5/5)	46,2	1,9 – 114,1	0,02

CCS – contagem de células somáticas; IC 95% - intervalo de confiança de 95%.

3.3.4. Efeito dos fatores estudados para cada agente

Foram vários os fatores de risco que demonstraram uma correlação significativa com a deteção de *S. aureus* e COL no leite do tanque. Relativamente à *E. coli*, nenhum dos fatores foi significativo. No que se refere aos SCN, a sua deteção em 100% dos tanques impossibilitou qualquer análise relativamente ao efeito dos fatores estudados sobre este agente.

3.3.4.1. *Staphylococcus aureus*

Tal como expresso na tabela 18, dos procedimentos da ordenha, a utilização de luvas durante a ordenha, a realização de *pré-dipping* e a secagem dos tetos com toalha de papel antes da colocação das tetinas revelaram estar significativamente ($P < 0,05$) associados à presença deste agente no tanque do leite. No que se refere à higiene, a higiene da ordenha, a higiene do úbere/tetos e a higiene das caudas foram fatores de risco significativos ($P < 0,05$). Constatou-se ainda a associação significativa ($P < 0,05$) da ordem da ordenha (ordenha de vacas com mastite no final da ordenha) com a prevalência deste agente contagioso no leite do tanque. As máquinas de ordenha móveis e a utilização de água quente no ciclo de lavagem da máquina de ordenha foram associadas ao aumento da probabilidade de deteção deste microrganismo no leite do tanque ($P < 0,05$). A implementação de contraste leiteiro nas explorações ($P < 0,01$) e a existência de registos ($P < 0,05$) foram também relacionados à presença de *S. aureus* nos tanques do leite.

Tabela 18. Percentagem de explorações positivas a *S. aureus* no leite do tanque de acordo com os vários fatores de risco incluídos no questionário, e respetivos OR, IC 95% e valor P.

Fator	Explorações positivas		Odds ratio	IC 95%	Valor P
	Não verificado	Verificado			
Higiene durante ordenha:					
elevada	-	29,4% (10/34)	Referência	-	-
média	-	69,1% (38/55)	5,4	2,1 - 13,6	0,0004
baixa	-	100% (11/11)	53,7	2,9 - 99,7	0,008
Higiene do úbere/tetos:					
elevada	-	44,7% (21/47)	Referência	-	-
média	-	74,0% (37/50)	3,5	1,5 - 8,3	0,004
baixa	-	33,3% (01/03)	0,6	-	0,70
Higiene das caudas:					
elevada	-	33,3%(4/12)	Referência	-	-
média	-	54,4% (31/57)	2,4	-	0,20
baixa	-	77,4% (24/31)	6,9	1,6 - 29,7	0,01
Utilização de luvas	64,2% (52/81)	36,8% (07/19)	3,1	1,1 - 8,7	0,03
Pré-dipping	65,8% (48/73)	40,7% (11/27)	2,8	1,1 - 6,9	0,03
Secagem dos tetos	72,2% (26/36)	48,6% (17/35)	2,8	1,0 - 7,4	0,04
Eliminação primeiros jatos	52,9% (09/17)	60,2% (50/83)	0,8	-	0,51
Higiene das tetinas	60,6% (40/66)	55,9% (19/34)	1,2	-	0,65
Pós-dipping	78,6% (11/14)	55,8% (48/86)	2,9	-	0,10
Ordenha das vacas com mastite no final	68,3% (41/60)	46,2% (18/39)	2,5	1,2 - 5,8	0,03
Máquina ordenha móvel	49,0% (24/49)	68,6% (35/51)	0,5	0,2 - 1,0	0,04
Utilização água quente	69,8% (44/63)	40,5% (15/37)	3,4	1,5 - 7,9	0,004
Tanque de leite:					
refrigerado	-	45,7% (16/35)	Referência	-	-
móvel	-	63,3% (38/60)	2,1	-	0,09
ambos	-	100% (5/5)	13,0	-	0,09
Contraste leiteiro	66,3% (53/80)	30% (6/20)	4,6	1,6 - 13,3	0,003
Realização TCM	73,3% (11/15)	56,5% (48/85)	2,1	-	0,23
ATB antes tratamento	63,1% (53/84)	37,5% (6/16)	2,9	-	0,06
Assistência veterinária	58,4% (45/77)	60,9% (14/23)	0,9	-	0,84
Registo tratamentos	63,9% (46/72)	46,4% (13/28)	2,5	1,0 - 5,8	0,04
Método de secagem:abrupta	67,4% (31/46)	51,9% (28/54)	1,9	-	0,12
Tratamento de secagem em todos os animais	66,7% (02/03)	58,8% (57/97)	1,4	-	0,79
Tratamento de secagem em função do ATB	60,0% (57/95)	40,0% (2/5)	2,3	-	0,39
Utilização de selantes	61,1% (58/95)	20,0% (1/5)	6,3	-	0,11
Separação das vacas secas	66,7% (24/36)	54,7% (35/64)	1,7	-	0,24
Amamentação direta	59,7% (40/67)	57,6% (19/33)	1,1	-	0,84
Administração de colostro	54,8% (17/31)	60,9% (42/69)	0,8	-	0,57
Substituição efetivo com animais nascidos exploração	44,4% (04/09)	60,4% (55/91)	0,5	-	0,36

TCM - teste californiano de mastites; ATB – antibiograma

3.3.4.2. *Escherichia coli*

Tal como se pode observar na tabela 19, nenhum dos fatores de risco em estudo foi significativamente associado à prevalência de *E. coli* no leite do tanque.

Tabela 19. Percentagem de explorações positivas a *E. coli* no leite do tanque de acordo com os vários fatores de risco incluídos no questionário, e respetivos OR e valor P.

Fator	Explorações positivas		Odds ratio	Valor P
	Não verificado	Verificado		
Higiene durante ordenha:				0,25
elevada	-	67,6% (23/34)	-	-
média	-	76,4% (42/55)	-	-
baixa	-	90,9% (10/11)	-	-
Higiene do úbere/tetos:				0,90
elevada	-	76,6% (36/47)	-	-
média	-	74% (37/50)	-	-
baixa	-	66,7%(2/3)	-	-
Higiene das caudas:				0,75
elevada	-	66,7%(8/12)	-	-
média	-	77,2% (44/57)	-	-
baixa	-	74,2% (23/31)	-	-
Utilização de luvas	76,5% (62/81)	68,4% (13/19)	1,51	0,47
Pré-dipping	76,7% (56/73)	70,4% (19/27)	1,39	0,52
Secagem dos tetos	80,6% (29/36)	65,7% (23/35)	2,16	0,16
Eliminação primeiros jatos	88,2% (15/17)	72,3% (60/83)	0,87	0,35
Higiene das tetinas	78,8% (52/66)	67,6% (23/34)	1,78	0,23
Pós-dipping	78,6% (11/14)	74,4% (64/86)	1,26	0,74
Ordenha das vacas com mastite no final	76,7% (46/60)	74,4% (29/39)	0,71	0,24
Máquina ordenha móvel	79,6% (39/49)	70,1% (36/51)	1,46	0,42
Utilização água quente	76,2% (48/63)	73% (27/37)	1,19	0,72
Tanque de leite:				0,64
refrigerado	-	80% (28/35)	-	-
móvel	-	71,7% (43/60)	-	-
ambos	-	80% (4/5)	-	-
Contraste leiteiro	75% (60/80)	75% (15/20)	1,0	1,0
Realização TCM	80% (12/15)	74,1 (63/85)	0,43	0,16
ATB antes tratamento	73,8% (62/84)	81,3(13/16)	0,65	0,51
Assistência veterinária	75,3% (58/77)	73,9% (17/23)	0,79	0,68
Registo tratamentos	77,8% (56/72)	67,9% (19/28)	1,31	0,60
Método de secagem:abrupta	76,1% (35/46)	74,1% (40/54)	0,90	0,81
Tratamento de secagem em todos os animais	66,7% (2/3)	75,3% (73/97)	0,66	0,74
Tratamento de secagem em função do ATB	74,7% (71/95)	80% (4/5)	0,0001	0,09
Utilização de selantes	75,8% (72/95)	60% (3/5)	0,0001	0,09
Separação das vacas secas	69,4% (25/36)	78,1%(50/64)	0,64	0,34
Amamentação direta	76,1% (51/67)	72,7% (24/33)	2,37	0,07
Administração de colostro	77,4% (24/31)	73,9% (51/69)	0,65	0,39
Substituição efetivo com animais nascidos exploração	77,8% (7/9)	74,7% (68/91)	1,18	0,84

TCM - teste californiano de mastites; ATB – antibiograma

3.3.4.3. Outros coliformes

Tal como reportado na tabela 20, a utilização de luvas ($P < 0,01$) e o pré-dipping ($P < 0,05$) foram os dois procedimentos da ordenha com uma associação estatisticamente significativa à deteção de COL no leite do tanque. As máquinas de ordenha móveis ($P < 0,05$), a utilização de água quente no ciclo de lavagem da máquina de ordenha ($P < 0,01$) e a utilização de tanques

móveis (não refrigerados) ($P < 0,05$) foram fatores de risco que influenciaram a presença destes agentes no leite do tanque. Por fim, explorações onde os vitelos ingeriam o colostro por amamentação direta apresentaram menor probabilidade de detecção de coliformes no leite do tanque ($P < 0,05$).

Tabela 20. Percentagem de explorações positivas a coliformes no leite do tanque de acordo com os vários fatores de risco incluídos no questionário, e respetivos OR, IC 95% e valor P.

Fator	Explorações positivas		Odds ratio	IC 95%	Valor P
	Não verificado	Verificado			
Higiene durante ordenha:					0,23
elevada	-	26,5% (9/34)	-	-	-
média	-	36,4% (20/55)	-	-	-
baixa	-	54,5% (6/11)	-	-	-
Higiene do úbere/tetos:					0,24
elevada	-	38,3% (18/47)	-	-	-
média	-	34% (17/50)	-	-	-
baixa	-	0%(0/3)	-	-	-
Higiene das caudas:					0,90
elevada	-	33,3%(4/12)	-	-	-
média	-	36,8% (21/57)	-	-	-
baixa	-	32,3% (10/31)	-	-	-
Utilização de luvas	40,7% (33/81)	10,5% (2/19)	5,8	1,3 - 27,0	0,007
Pré- <i>dipping</i>	41,1% (30/73)	18,5% (5/27)	3,1	1,1 - 9,0	0,03
Secagem dos tetos	41,7% (15/36)	22,9% (8/35)	2,4	-	0,09
Eliminação primeiros jatos	47,1% (8/17)	32,5% (27/83)	1,6	-	0,36
Higiene das tetinas	37,9% (25/66)	29,4% (10/34)	1,5	-	0,40
Pós- <i>dipping</i>	42,9% (6/14)	33,7% (29/86)	1,5	-	0,51
Ordenha das vacas com mastite no final	38,3% (23/60)	30,8% (12/39)	1,4	-	0,48
Máquina ordenha móvel	24,5% (12/49)	45,1% (23/51)	0,5	0,2 - 0,9	0,04
Utilização água quente	46% (29/63)	16,2% (6/37)	4,4	1,6 - 12,0	0,002
Tanque de leite:					
refrigerado	-	17,1% (6/35)	Referência	-	-
móvel	-	43,3% (26/60)	3,7	1,3 - 10,2	0,01
ambos	-	60% (3/5)	7,3	1,0 - 53,2	0,04
Contraste leiteiro	36,3% (29/80)	30% (6/20)	1,3	-	0,60
Realização TCM	33,3% (5/15)	35,3% (30/85)	0,9	-	0,88
ATB antes tratamento	33,3% (28/84)	43,8% (7/16)	0,6	-	0,43
Assistência veterinária	32,5% (25/77)	43,5% (10/23)	0,6	-	0,33
Registo tratamentos	37,5% (27/72)	28,6% (8/28)	1,5	-	0,40
Método de secagem:abrupta	37,0% (17/46)	33,4% (18/54)	1,2	-	0,70
Tratamento de secagem em todos os animais	66,7% (2/3)	34,0% (33/97)	3,9	-	0,26
Tratamento de secagem em função do ATB	34,7% (33/95)	40,0% (2/5)	0,8	-	0,81
Utilização de selantes	35,8% (34/95)	20,0% (1/5)	2,2	-	0,45
Separação das vacas secas	36,1% (13/36)	34,4%(22/64)	1,1	-	0,86
Amamentação direta	41,8% (28/67)	21,2% (7/33)	2,7	1,0 - 7,0	0,04
Administração de colostro	23,3% (7/31)	40,0% (28/69)	0,5	-	0,10
Substituição efetivo com animais nascidos exploração	55,6% (5/9)	33% (30/91)	2,6	-	0,18

TCM - teste californiano de mastites; ATB – antibiograma

3.4. Discussão

Este é o primeiro estudo realizado na ilha de São Miguel no qual se determinou a prevalência de *S. aureus*, SCN e coliformes em explorações desta ilha e a associação de determinadas práticas de manejo com a detecção destes agentes no leite do tanque das explorações em estudo. Desta forma, este estudo poderá vir a ser útil na determinação de quais as práticas de manejo que, ao serem adotadas pelos produtores, contribuirão para o decréscimo da prevalência dos agentes em estudo.

No entanto, é importante referir que, relativamente à presença dos microrganismos estudados no leite do tanque, apenas o *S. aureus* é indicador de IIM.

Prevalência dos agentes patogénicos

Em 59 das 100 explorações foi detetada a presença do importante agente contagioso em estudo - *S. aureus*. Este resultado encontra-se de acordo com um estudo realizado na Nova Zelândia, país onde o sistema de exploração é o que mais se assemelha ao praticado nos Açores, no qual se detetou *S. aureus* em 57% das amostras de leite do tanque (Howard, 2006). Também em três outros trabalhos, realizados na Austrália, no Canadá e na Dinamarca, as prevalências de *S. aureus* variaram entre os 33% e os 91% (Phuektes *et al.* 2003; Riekerink *et al.*, 2006a; Katholm *et al.*, 2012).

Relativamente aos restantes agentes, SCN foram os agentes de maior prevalência, detetados em 100% das amostras de leite do tanque, seguido de *E. coli* e outros coliformes que apresentaram resultados positivos em 75% e 35% dos tanques em estudo, respetivamente. No trabalho acima referido, realizado na Nova Zelândia, Howard (2006) obteve tanques positivos a SCN e coliformes em 51% e 11% das explorações, respetivamente. No estudo recente realizado por Katholm *et al.* (2012), as prevalências de *E. coli* e *Klebsiella* spp. (outros coliformes) foram de 61% e 13%, respetivamente. Desta forma, verifica-se que os resultados por nós obtidos foram elevados relativamente aos reportados em outros estudos como os acima mencionados.

Segundo Katholm *et al.* (2012), uma vez que as bactérias coliformes normalmente são excretadas durante curtos períodos de tempo por vacas com mastite clínica, a sua presença no leite do tanque é sugestiva de problemas relacionados com a manutenção das instalações e com a higiene do úbere e dos procedimentos da ordenha, que resultam em contaminação do leite do tanque. Relativamente aos SCN, vários autores referem que o leite do tanque pode ser fortemente contaminado com estes microrganismos se os procedimentos da ordenha forem inadequados, a higiene for pobre, se existir irritação ou lesões da pele do teto e ainda, se não for realizada a desinfecção dos tetos após a ordenha (George *et al.*, 2008, Blowey & Edmondson, 2010). Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho, relativamente às prevalências de SCN e coliformes, são sugestivos da aplicação de práticas de manejo inadequadas numa elevada percentagem de explorações.

Influência dos agentes estudados na contagem de células somáticas no tanque

Segundo Morin (2009), explorações onde existem mastites por *S. aureus* tendem a possuir elevadas CCS no leite do tanque e grande proporção de vacas com CCS persistentemente elevadas. De facto, os valores significativos de *odds ratio* (6,2 a 46,2) observados no tanque de explorações com CCS superiores a 150 000 céls/mL são sugestivos do importante contributo das IIM para a presença de *S. aureus* no leite das explorações em estudo. Estes resultados encontram-se de acordo com os resultados obtidos por Katholm *et al.* (2012), que refere que os *S. aureus* foram um dos principais agentes que originaram elevadas CCS no seu estudo.

Relativamente aos coliformes, não se verificou uma influência significativa destes agentes na CCS no tanque. Estes resultados encontram-se de acordo com Katholm *et al.* (2012) que refere que os mesmos seriam expectáveis uma vez que, sendo as IIM por coliformes maioritariamente infeções de curta duração, e que originam com frequência alterações visíveis a nível do leite, este normalmente é descartado não influenciando a CCS do tanque.

Efeito dos fatores de risco estudados para cada agente

Relativamente aos procedimentos da ordenha, explorações onde não se verificou a utilização de luvas pelo ordenhador ou a realização de pré-*dipping* tiveram 2,8 vezes ($P < 0,05$), ou mais, probabilidade de deteção de ambos os agentes - *S. aureus* e COL - no tanque do leite. A secagem dos tetos antes da colocação das tetinas demonstrou uma associação significativa com a deteção de *S. aureus* ($OR=2,8$; $P=0,04$). Para além da secagem dos tetos antes da colocação das tetinas, a utilização de luvas e a realização de pré-*dipping* são três das principais medidas de prevenção de mastites durante a ordenha (Pettersson-Wolfe *et al.*, 2010; Arnold & Bewley, 2011) e que constam do programa de controlo de 10 pontos publicado pelo NMC.

Segundo Nickerson (2014), as mãos dos ordenhadores podem ser um veículo de transmissão de bactérias ou de disseminação destas entre vacas. A utilização de luvas reduz essa disseminação uma vez que a adesão bacteriana às superfícies de borracha/plástico não ocorre de forma tão efetiva como acontece na pele humana (Nickerson, 2014). Este facto foi confirmado por Dufour *et al.* (2012) que refere que a utilização de luvas revelou ser uma técnica eficiente não só na prevenção da disseminação de IIM por *S. aureus* entre vacas, como também entre quartos de uma mesma vaca, sendo esta uma componente crucial de qualquer programa de controlo de mastites por *S. aureus*. No presente estudo confirmou-se também a importância desta prática como medida de prevenção e controlo dos agentes ambientais, estando a utilização de luvas associada a uma diminuição da prevalência de COL no tanque.

De acordo com Nickerson (2001), o pré-*dipping* é uma medida de controlo cujo principal objetivo é reduzir os novos casos de mastite clínica por coliformes. De facto, a realização de pré-*dipping* é normalmente recomendada como uma medida de prevenção das IIM por agentes ambientais (Nickerson, 2001; Dufour *et al.*, 2012), o que explica plenamente a associação

estatisticamente significativa entre este procedimento e a detecção de COL no leite do tanque. Segundo Nickerson (2001), a eficácia desta prática de preparação do úbere foi confirmada por vários estudos de eficácia nos quais se verificou que, de uma forma geral, a realização de *pré-dipping* reduz a incidência de novas IIM por agentes patogénicos ambientais em mais de 50%.

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram observar que o *pré-dipping* se encontra significativamente relacionado não só com a prevalência de COL mas também de *S. aureus* no tanque. Este resultado é semelhante ao reportado por Dufour *et al.* (2012), em que o *pré-dipping* foi associado a baixas prevalências e incidências de IIM por *S. aureus*. Por outro lado, os resultados obtidos por Piccinini *et al.* (2009) permitiram constatar que algumas estirpes de *S. aureus* foram isoladas tanto a partir da pele do teto como do leite de quartos infetados, realçando desta forma o possível papel da contaminação do teto e, por acréscimo, da importância da desinfeção da pele do teto, na epidemiologia das IIM por *S. aureus*.

O aspeto referido por Piccinini *et al.* (2009) explica em parte os resultados obtidos relativamente à secagem dos tetos antes da colocação das tetinas. Segundo Johnson (2000), é a toalha de secagem que irá remover a maioria das bactérias presentes na pele do teto. Ruegg (2004) refere que a secagem efetiva dos tetos é, provavelmente, o passo mais importante numa preparação higiénica pré-ordenha. Elmoslemany *et al.* (2010), constatou que a realização de *pré-dipping* seguida da secagem dos tetos com uma toalha de utilização única e individual estava associada a menores contagens bacterianas comparativamente com outros métodos de preparação dos tetos pré-ordenha.

A higiene da ordenha representou, neste estudo, um fator de risco com uma correlação significativa com a prevalência de *S. aureus*, verificando-se uma probabilidade 5,4 ($P = 0,0004$) e 53,7 ($P = 0,008$) vezes superior de detecção deste agente em tanques de explorações onde a higiene da ordenha foi classificada em “média” e em “baixa”, respetivamente. Uma vez que o principal reservatório da infeção é a glândula mamária e a transmissão ocorre sobretudo durante a ordenha, o principal foco de prevenção das mastites por *S. aureus* têm sido os procedimentos que constituem todo o processo de ordenha (Arnold & Bewley, 2011; Middleton, 2013). A higiene de todos os procedimentos da ordenha é parte essencial do programa de controlo das mastites por *S. aureus* (Zecconi, 2006) o que explica plenamente os resultados obtidos relativamente a este fator de risco.

À semelhança da higiene da ordenha, a higiene dos animais foi também um fator de risco importante tendo-se verificado um efeito estatisticamente significativo da baixa higiene do úbere/tetos ($OR=3,5$; $P =0,004$) e das caudas ($OR=6,9$; $P =0,01$) sobre a prevalência de *S. aureus* no leite do tanque. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Schreiner e Ruegg (2003), que observaram uma associação significativa entre a prevalência de agentes contagiosos e o grau de limpeza do úbere, tendo sido isolados agentes contagiosos em número significativamente superior nas amostras de leite obtidas a partir de vacas com úberes

sujos relativamente aos animais em que os úberes se apresentavam limpos. Segundo os mesmos autores, a CCS e os casos de mastite subclínica foram superiores em animais classificados como “sujos”. Schreiner e Ruegg (2003) referem que a associação entre o grau de limpeza do úbere e os agentes de mastite contagiosa pode indicar que as medidas de controlo das mastites contagiosas (p. ex.: higiene e desinfeção dos tetos) não são tão efetivas quando os úberes se encontram sujos. Como já referido, constatou-se que a higiene das caudas foi também um fator significativo o que pode indicar que a higiene das caudas é um fator determinante para a ocorrência de mastites ou ainda que os níveis de higiene do úbere são influenciados pela higiene da cauda.

Da informação recolhida junto dos produtores através dos inquéritos, concluiu-se que em apenas 39% das explorações se ordenhavam as vacas com mastite no final. A análise estatística veio posteriormente demonstrar que explorações onde a ordenha se realizava sem ordem definida apresentavam uma probabilidade 2,5 ($P=0,03$) vezes superior de presença *S. aureus* no tanque. Estes resultados estão de acordo com Riekerink *et al.* (2006b) que obteve um número inferior de culturas positivas a *S. aureus* quando estas eram realizadas a partir de amostras provenientes de explorações onde as vacas com mastite eram ordenhadas no final. Sendo as tetinas consideradas a principal forma de transmissão deste agente contagioso (Benić *et al.*, 2012), de acordo com o programa de controlo de mastites do NMC e com as principais medidas de prevenção de mastites por *S. aureus* descritas por vários autores, a ordenha de vacas com IIM por *S. aureus* deve ser executada no final da ordenha ou separadamente (NMC, 2001; Zeconi, 2006; Arnold & Bewley, 2011; Benić *et al.*, 2012; Middleton, 2013), o que explica os resultados por nós obtidos.

Apesar da probabilidade ser baixa ($OR=0,5$; $P=0,04$), verificou-se que a ordenha em máquinas móveis foi um fator significativo, podendo estar associada à possibilidade de deteção tanto de *S. aureus* como de COL no tanque do leite. Isto pode dever-se ao facto de as máquinas de ordenha móveis se encontrarem sempre muito expostas às condições climáticas e ambientais, aumentando a dificuldade na manutenção das condições de higiene que seriam desejáveis. Por outro lado, a zona onde se localiza a máquina de ordenha é uma área particularmente predisposta à acumulação de lamas devido, não só à pluviosidade frequente na ilha, como também à acumulação de águas utilizadas nos vários procedimentos da ordenha e, ainda, devido à maior concentração de animais nestes espaços no decorrer das ordenhas. Tal como referido por vários autores, estes são aspetos que favorecem a exposição a elevados níveis de agentes patogénicos, sobretudo ambientais (Prestes *et al.*, 2002; Smith & Hogan, 2008). Para além disso, existem locais onde a água e outros recursos são escassos o que muitas vezes não otimiza a operacionalidade da própria máquina e, segundo Biggs (2009), a manutenção e funcionamento inadequados da máquina de ordenha são fatores de risco para ocorrência tanto de *S. aureus* como de COL.

A higienização dos equipamentos da ordenha é um ponto crítico do processo de ordenha, uma vez que uma falha na limpeza pode influenciar o nível de contaminação bacteriana do leite do tanque (Bava *et al.*, 2009; Biggs, 2009). No presente estudo constatou-se que as explorações onde não era utilizada água quente no ciclo de lavagem da máquina de ordenha apresentaram 3,4 e 4,4 ($P < 0,01$) vezes maior probabilidade de detecção de *S. aureus* e COL no tanque, respetivamente. Bava *et al.* (2009) constatou que a temperatura da água da fase de limpeza, que inclui a utilização de detergente, teve um efeito significativo na contagem de coliformes no tanque, verificando-se que uma temperatura inferior a 40°C durante o processo de limpeza determinou um aumento destas bactérias. De acordo com Monken & Ingalls (2002), a temperatura é um fator muito importante sobretudo na eliminação dos resíduos de gordura do leite da superfície dos equipamentos da ordenha, uma vez que estes tendem a solidificar a temperaturas inferiores a 35°C. Quando ocorrem falhas na limpeza, os resíduos de leite formam depósitos em alguns locais das tubagens do equipamento o que leva ao desenvolvimento bacteriano e ao aumento do número de bactérias no leite do tanque (Monken & Ingalls, 2002), justificando assim os resultados obtidos.

A probabilidade de detecção de coliformes foi superior em explorações que possuíam apenas tanque móvel (OR = 3,7; $P < 0,01$) e naquelas que possuíam um tanque móvel (não refrigerado) e um tanque fixo (OR = 7,3; $P < 0,05$) relativamente às explorações que possuíam apenas um tanque fixo (refrigerado). Nas explorações que possuíam ambos os tipos de tanque, o tanque móvel era utilizado em primeiro lugar para transporte do leite e posterior transferência para o tanque refrigerado. A refrigeração inadequada do leite originará um aumento da contagem de bactérias uma vez que torna o ambiente mais propício à multiplicação bacteriana durante o armazenamento. O leite deve ser arrefecido até atingir uma temperatura igual ou inferior a 4,4°C nos 30 minutos seguintes à ordenha (Reinemann *et al.* 2003). Os factos descritos por este autor explicam os resultados obtidos neste estudo na medida em que os tanques móveis não possuem sistema de refrigeração e, após cada ordenha, os produtores têm que transportar o leite até à fábrica ou até aos postos de recolha ou mesmo até à exploração (no caso dos produtores que possuem ambos os tipos de tanque) o que faz com que, frequentemente, o tempo que decorre entre a ordenha e a refrigeração do leite seja superior ao indicado. Por outro lado, a contaminação com coliformes também poderá ocorrer durante o transporte e a transferência de um tanque para o outro, sendo estes possíveis aspetos a analisar em estudos futuros.

A implementação do contraste leiteiro foi um fator significativo, tendo-se observado uma probabilidade de detecção de *S.aureus* 4,6 ($P = 0,003$) vezes superior em explorações onde este não estava implementado. A monitorização da saúde do úbere é um dos pontos que constitui o plano de controlo de mastites do NMC e, segundo este, esta monitorização deve ser realizada recorrendo ao contraste leiteiro. De acordo com o NMC (2001), é importante que as explorações adiram a um programa de CCS individuais ou recorram a outros métodos para

monitorizar as infeções subclínicas. Sendo a mastite crónica e subclínica as formas mais comuns de mastite por *S. aureus* (Benić *et al.*, 2011), o contraste leiteiro constitui uma ferramenta muito útil para os produtores na deteção da mastite subclínica, sobretudo quando se apurou, através do questionário, que em 71% das explorações apenas se realiza TCM quando se suspeita de mastite, tornando ainda mais complicada a deteção das mastites subclínicas. Por outro lado, constatou-se que as explorações onde está implementado o contraste leiteiro são também aquelas onde é prestada maior atenção a outras medidas de prevenção de mastite, especialmente à higiene de todos os procedimentos, equipamentos e sala de ordenha, o que se reflete na qualidade do leite e, conseqüentemente, nos resultados obtidos.

A manutenção dos registos de tratamentos foi associada, neste estudo, a uma menor probabilidade de deteção de *S. aureus* no tanque. De facto, Biggs (2009) refere a ausência de registos como um dos fatores de risco específicos relativamente às mastites por *S. aureus*. A manutenção de bons registos na exploração é uma das práticas efetivas que constitui o plano de controlo de mastites recomendado pelo NMC. Estes registos constituem informações necessárias à monitorização das condições sanitárias do úbere e à tomada de decisões específicas relativamente a cada caso (Radostits *et al.* 2007). Segundo Wenz (2004), registos completos, precisos e fiáveis são a base de qualquer programa de monitorização de mastites. À semelhança do referido relativamente ao contraste leiteiro, também se verificou que as explorações que possuíam registos são as mesmas onde se verificou a implementação concomitante de outras medidas de prevenção de mastite, o que acabou por se refletir nos resultados apresentados.

Por último, verificou-se que a amamentação direta dos vitelos é uma prática de manejo adotada em 33% das explorações em estudo. Através da análise estatística constatou-se que a probabilidade de deteção de COL no tanque é 2,7 ($P=0,04$) vezes inferior nas explorações que aplicam esta prática de manejo. Este é um resultado que se encontra de acordo com vários estudos citados por Kalber e Barth (2014) cujos resultados têm apontado para uma diminuição da incidência de mastites em explorações que optam pela amamentação direta do vitelo.

À semelhança do descrito por Dufour *et al.* (2012) também neste estudo algumas das práticas que têm sido recomendadas ao longo de anos nos programas de controlo de mastites, tais como o tratamento de secagem e a realização de pós-*dipping*, não foram significativamente associadas à prevalência dos agentes em estudo no leite do tanque. No entanto, tal como refere este autor, estas práticas têm demonstrado associações muito desejáveis e consistentes com a saúde do úbere e não devem, por esse motivo, ser excluídas dos programas de controlo de mastites com base num trabalho em específico. Dufour *et al.* (2012) refere que as práticas identificadas como significativas devem antes ser consideradas medidas que podem incrementar a melhoria da saúde do úbere nas explorações em que outras medidas de

prevenção, como o tratamento de secagem e a realização de pós-*dipping*, foram já implementados, o que de certa forma pode ser aplicado também ao presente trabalho.

Relativamente à *E. coli*, nenhum dos fatores em estudo influenciaram significativamente a prevalência deste agente no leite do tanque. Sabendo que na realidade as medidas de prevenção não atuam de forma isolada mas interagindo entre si, teria sido importante a construção de um modelo final de regressão logística multivariada. Uma vez que a realização deste tipo de análise não foi possível, tendo-se, por esse motivo, utilizado apenas regressões logísticas univariadas, estes resultados relativos à *E. coli* podem ser explicados pelo facto de que nenhuma medida de prevenção por si só teve influência significativa no controlo desta bactéria, daí que nenhum dos fatores em estudo tenha sido significativamente associado à presença deste agente no leite do tanque.

O estudo por nós desenvolvido leva-nos a concluir que a contaminação do leite do tanque com *S. aureus* e COL é uma realidade em 59% e 35%, respetivamente, das explorações da Ilha de São Miguel e que alguns dos fatores de risco em estudo estão significativamente associados a estas prevalências. Constatou-se que a utilização de luvas, o pré-*dipping* e a utilização de água quente no ciclo de lavagem da máquina de ordenha são os fatores significativos e de maior importância que influenciaram a presença de ambos os agentes no leite do tanque. As explorações onde se verificaram problemas de higiene quer a nível dos procedimentos de ordenha quer a nível dos próprios animais, onde não é realizada a secagem dos tetos durante a preparação do úbere, onde não está implementado o contraste leiteiro nem a realização e manutenção de registos e onde a ordenha é realizada de forma aleatória foram aquelas que apresentaram maior probabilidade de deteção de *S. aureus* no tanque. A presença de coliformes também foi mais provável nas explorações que possuíam apenas tanque móvel (não refrigerado) ou ambos os tipos de tanque. Por outro lado, verificou-se uma menor probabilidade de deteção destes agentes ambientais nas explorações em que os vitelos ingeriam o colostro e o leite dos primeiros dias por amamentação direta. Para além disso, constatou-se uma influência significativa do *S. aureus* sobre o aumento da CCS no tanque.

Os resultados obtidos permitiram constatar a significância de algumas práticas de manejo, sugerindo a sua importância num programa de boas práticas, no entanto, este estudo carece de confirmação através de um modelo que abranja um maior número de explorações e de amostras.

3.5. Conclusão

O estágio superou todas as expectativas tendo-se revelado uma experiência extremamente enriquecedora. A casuística vasta e variada e a participação ativa nos diversos casos clínicos estimularam a aplicação dos conhecimentos teóricos adquiridos ao longo de toda a formação académica e a aquisição gradual de conhecimentos práticos e de atitudes indispensáveis à

prática clínica. O estágio foi fundamental na aprendizagem do trabalho em equipa tendo-se revelado de extrema importância, não só a nível profissional, como também a nível pessoal.

O tema eleito permitiu uma importante atualização e aquisição de conhecimentos neste tema tão vasto e tão importante que é a mastite bovina. Esta é, de facto, uma doença complexa e de extrema importância que afeta um elevado número de animais e de explorações, continuando a ser um grande desafio quer para os produtores quer para os médicos veterinários. O trabalho experimental veio realçar uma vez mais a importância das boas práticas de manejo na prevenção das mastites na exploração e na manutenção da qualidade do leite. Existe ainda muito trabalho a desenvolver junto dos produtores e o desafio torna-se ainda maior nas explorações da ilha de São Miguel devido às práticas de manejo tão características nas explorações desta ilha. Assim, será de extrema importância trabalhar, em conjunto com os produtores, na implementação de planos de controlo de mastites, melhores e mais eficazes, com o objetivo de se continuar a promover a qualidade e valorização do leite açoriano.

Bibliografia

- Al-Qudah K (2009). Oxidative stress in calves with acute or chronic bronchopneumonia. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 160 (5): 231-236.
- Ames NK (2014). Surgical treatment of ocular squamous cell carcinoma and corneal dermoids in cattle. In Noordsy's Food Animal Surgery. (5th edition). ed. Ames NK, Wiley Blackwell, EUA, ISBN-13: 978-1-1183-5260-17, pp. 5-81.
- Amin RU, Bhat GR, Ahmad A, Swain, PS & Arunakumari G (2013). Understanding pathophysiology of retained placenta and its management in cattle - a review. *Veterinary Clinical Science*, 1 (1): 01-09.
- Arnold M & Bewley J (2011). *Staphylococcus aureus* mastitis. University of Kentucky College of Agriculture, Food and Environment, Lexington, KY. Disponível em <http://www2.ca.uky.edu/agc/pubs/id/id190/id190.pdf>, acedido em 17/09/2014.
- Awale MM, Dudhatra GB, Kumar A, Chauhan BN & Kamani DR (2012). Bovine mastitis: a threat to economy, 1: 295, doi:10.4172/scientificreports.295.
- Bava L, Zucali M, Brasca M, Zanini L & Sandrucci A (2009). Efficiency of cleaning procedure of milking equipment and bacterial quality of milk. *Ital. J. Anim. Sci.* 8 (2), 387-389.
- Beagley JC, Whitman KJ, Baptiste KE & Scherzer J (2010). Physiology and treatment of retained fetal membranes in cattle. *Journal of Internal Veterinary Medicine*, 24: 261–268.
- Benić M, Habrun B & Kompes G (2012). Clinical and epidemiological aspects of cow mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and its methicillin-resistant strains. *Rad 511. Medical Sciences* 37: 113-122.
- Bexiga, JRD (2011). Bovine mastitis due to coagulase-negative staphylococci and the role of minor pathogens on mastitis. Tese de Doutoramento em Ciências Veterinárias Especialidade de Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, pp. 1-13.
- Biggs A (2009). Mastitis in cattle. The Crowood Press, Ramsbury, Marlborough. ISBN 978 1 847970 71 8.
- Bilbao G, Pinto A, Badaracco A, Rodriguez D, Monteavaro C & Parreño V (2011). Diarrea neonatal del ternero. *Revista Albéitar*, 142: 142-143.
- Binabaj FB, Farhangfar H, Azizian S, Jafari M & Hassan-Pour H (2014). Logistic regression analysis of some factors influencing incidence of retained placenta in a holstein dairy herd. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 4(2): 269-274
- Blowey R & Edmondson P (2010). Mastitis control in dairy herds. (2nd edition). Farming Press Books, Reino Unido. ISBN-13: 978-1-84593-550-4.

- Bradley AJ, Breen JE, Payne B, White V & Green MJ (2015). An investigation of the efficacy of a polyvalent mastitis vaccine using different vaccination regimens under field conditions in the United Kingdom. *J Dairy Sci.* 98: 1706-1720.
- Breen JE, Green MJ & Bradley AJ (2009). Quarter and cow risk factors associated with the occurrence of clinical mastitis in dairy cows in the United Kingdom. *J Dairy Sci*, 92: 2551–2561.
- Brozos C, Mavrogianni VS & Fthenakis GC (2011). Treatment and control of peri-parturient metabolic diseases: pregnancy toxemia, hypocalcemia, hypomagnesemia. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 27: 105–113.
- Bruno DR (2010). Mastitis, Mammary Gland Immunity and Nutrition. *Proceedings of the Mid-South Ruminant Nutrition Conference, Arlington, Texas*, pp. 19-26.
- Cavaliere J, Hepworth G, Fitzpatrick LA, Shephard RW & Macmillan KL (2006). Manipulation and control of the estrous cycle in pasture-based dairy cows. *Theriogenology*, 65: 45-64.
- Cha E, Bar D, Hertl JA, Tauer LW, Bennett G, González RN, Schukken YH, Welcome FL, & Gröhn YT (2011). The cost and management of different types of clinical mastitis in dairy cows estimated by dynamic programming. *J Dairy Sci.*, 94: 4476–4487.
- Charbonneau E, Pellerin D & Oetzel GR (2006). Impact of lowering dietary cation-anion difference in nonlactating dairy cows: a meta-analysis. *J Dairy Sci*, 89: 537–548.
- Chastant-Maillard S (2006). Is there a future for farmaceutical management in cow reproduction? european prespective. *Proceedings of the 24th World Buiatrics Congress, Nice, France*, pp. 282-291.
- Christensen BW, Drost M & Troedsson MH (2009). Female reproductive disorders: abortion. In *Large animal internal medicine. (4th edition)*. ed. Smith BP, Mosby Elsevier, EUA, ISBN 978-0-323-04297-0, pp. 1451-1469.
- Cicconi-Hogan KM, Gamroth M, Richert R, Ruegg PL, Stiglbauer KE & Schukken YH (2013). Risk factors associated with bulk tank standard plate count, bulk tank coliform count, and the presence of *Staphylococcus aureus* on organic and conventional dairy farms in the United States. *J Dairy Sci*, 96: 7578–7590.
- Coutinho, A. (2005). Complexo das doenças respiratórias de bezerros. *Proceedings of the II Minas Gerais Buiatrics Symposium, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil*.
- Daryoush M, Yousef D & Nazeri M (2011). Ocular squamous cell carcinoma in a black headed cow (a case report). *Advances in Environmental Biology*, 5: 853-855.
- Davidson AP & Stabenfeldt GH (2004). A glândula mamária. In *Tratado de fisiología veterinaria. (3ª edição)*. ed Cunningham JG & Klein BG, Saunders Elsevier, Brasil, ISBN 85-277-0863-9, pp. 417-431.

- Deb R., Kumar A, Chakraborty S, Verma A, Tiwari R, Dhama K, Singh U, Kumar S (2013). Trends in diagnosis and control of bovine mastitis: a review. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 16: 1653-1661.
- Diskin MG, Austin EJ, Roche JF (2002). Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, 23: 211-228.
- Dufour S, Dohoo IR, Barkema HW, Descôteaux L, Devries TJ, Reiher KK, Roy JP & Scholl DT (2012). Manageable risk factors associated with the lactational incidence, elimination, and prevalence of *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. *J Dairy Sci.*, 95 :1283–1300.
- Dyce KM, Sack WO & Wensing CJ (2004). Úbere dos Ruminantes. In *Tratado de anatomia veterinária*. (3ª edição) ed. Dyce KM., Sack WO & Wensing CJ, Saunders Elsevier, EUA, ISBN 85-352-1392-9, 700-708.
- Edwards RS (2010). Surgical treatment of the eye in farm animals. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 26: 459–476.
- Eiler H & Fecteau KA (2007). Retained placenta. In: *Current therapy in large animal theriogenology* (2nd edition) ed. Youngquist RS & Threlfall WR, Saunders Elsevier, EUA, ISBN 10: 0-7216-9323-7, pp. 345-354.
- El-Jakee JK, Aref NE, Noha E, Gomaa A, El-Hariri MD, Galal HM, Omar SA & Samir A (2013). Emerging of coagulase negative Staphylococci as a cause of mastitis in dairy animals: an environmental hazard. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 1: 74-78.
- Elmoslemany AM, Keefe GP, Dohoo IR, Wichtel JJ, Stryhn H, Dingwell RT (2010). The association between bulk tank milk analysis for raw milk quality and on-farm management practices. *Preventive Veterinary Medicine* 95: 32–40.
- EMA (European Medicines Agency) (2011). Hiprabovis IBR Marker Live. Disponível em http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/veterinary/000158/WC500101815.pdf, acessado em 17/11/2014.
- George L, Divers T, Ducharme N & Welcome F (2008). Diseases of the teats and udder. In *Rebhun's diseases of dairy cattle* (2nd edition). ed. Divers TJ & Peek SF, Saunders Elsevier, EUA, ISBN-13: 978-1-4160-3137-6, pp. 327-394.
- Güler L & Gündüz K (2007). Virulence Properties of *Escherichia Coli* isolated from clinical bovine mastitis. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 31, 361-365.
- Gulliksen S, Jor E, Lie K, Hamnes I, Løken T, Åkerstedt J & Østerås, O. (2009). Enteropathogens and risk factors for diarrhea in norwegian dairy calves. *J Dairy Sci*, 92: 5057–5066.
- Gunn AA, Naylor, JA & House JK (2009). Manifestations and management of disease in neonatal ruminants: diarrhea. In *Large animal internal medicine* (4th edition) ed. Smith BP, Mosby Elsevier, EUA, ISBN 978-0-323-04297-0, pp. 340-363.

- Heikkilä AM, Nousiainen JI & Pyörälä S (2012). Costs of clinical mastitis with special reference to premature culling. *J Dairy Sci*, 95: 139–150.
- Heinrichs AJ, Costello SS & Jones CM (2009). Control of heifer mastitis by nutrition. *Veterinary Microbiology*, 134: 172-176.
- Hertl JA, Schukken YH, Welcome FL, Tauer LW, Gröhn YT (2014). Pathogen-specific effects on milk yield in repeated clinical mastitis episodes in Holstein dairy cows. *J Dairy Sci*, 97: 1465–1480.
- Hillman R & Gilbert RO (2008). Reproductive Diseases. In *Rebhun's diseases of dairy cattle*. (2nd edition). ed. Divers TJ & Peek SF, Saunders Elsevier, EUA, ISBN-13: 978-1-4160-3137-6, pp. 395-446.
- Hogan J & Smith KL (2003). Coliform Mastitis. *Veterinary research*, 34: 507-519.
- Hosmer DW & Lemeshow S (1989). *Applied logistic regression*. New York, USA: Wiley.
- Howard P (2006). Mastitis pathogens present in bulk tank milk from seven dairy herds in the Waikato region, New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 54 (1): 41-43.
- Icen H, Sekin S, Yesilmen S, Isik N & Simsek A (2009). Viral and bacterial pathogen isolated and identified from pneumonic calves in region of diyarbakir and its treatment with tulathromycin. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8: 1545-1550.
- Johnson AP (2000). A proper milking routine: the key to quality milk. *Proceedings of the National Mastitis Council Annual Meeting*, Reno, Nevada, pp. 123.
- Jones GM (2009). The role of milking equipment in mastitis. *College of Agriculture and Life Sciences, Virginia State University*, 404-742. Disponível em <https://pubs.ext.vt.edu/404/404-742/404-742.html> , aceso em 4/4/2015.
- Kalber T & Barth K (2014). Practical implications of suckling systems for dairy calves in organic production systems – a review. *Appl. Agric. Forestry Res.*, 1 (64): 45-58.
- Katholm J, Bennedsgaard TW, Koskinen MT & Rattenborg E (2012). Quality of bulk tank milk samples from Danish dairy herds based on real-time polymerase chain reaction identification of mastitis pathogens. *J Dairy Sci*, 95: 5702-5708.
- Kavithaa NV, Rajkumar N & Jiji RS (2014). Papillomatosis in jersey cows and its different medical treatment. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 3 (2): 692-694.
- Lacy-Hulber J, Williamson J, Kolver E, Doohan H & Shelgren J (2012). Is coliform mastitis an emerging issue? *Proceedings of the New Zealand Milk Quality Conference*, 19 - 22 June, Hamilton, pp. 38-44.
- Lam TJGM, Riekerink RGMO, Sampimon OC & Smith H (2009). Mastitis diagnostics and performance monitoring: a practical approach. *Irish Veterinary Journal*, 62: 34-39.

- Lane EA, Austin EJ, Crowe MA (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.
- Langoni H (2013). Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras.*, 33 (5): 620-626.
- Leelahapongsathon K, Schukken YH & Suriyasathaporn W (2014). Quarter, cow, and farm risk factors for intramammary infections with major pathogens relative to minor pathogens in Thai dairy cows. *Trop Anim Health and Prod*, 46 (6): 1067-1078.
- Li N, Richoux R, Boutinaud M, Martin P & Gagnaire V (2014). Role of somatic cells on dairy processes and products: a review. *Dairy Sci & Technol.* 94: 517-538.
- Lopez AC (2011). Characterization of differentiation of bovine mammary epithelial cells. Honors Scholar Theses, University of Connecticut, Paper 195, pp.6.
- Lorenz I, Earley B, Gilmore J, Hogan I, Kennedy E & More SJ (2011). Calf health from birth to weaning. iii. housing and management of calf pneumonia. *Irish Veterinary Journal*, 64: 14.
- Mahmmod Y, Toft N, Katholm J, Nielsen SS, Cederlöf E & Klaas IC (2013). Diagnostic test properties of a real-time pcr mastitis test of composite milk samples from milk recordings to identify intramammary infections with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. Proceedings of the 29th NKVet Symposium: Mastitis – New Knowledge on Diagnostics and Control on Modern Dairy Farms, 13-14th May, Reykjavik, Iceland, pp.9.
- McDougall S, Parker KL, Heuer C & Compton CWR (2009). A review of prevention and control of heifer mastitis via non-antibiotic strategies. *Veterinary Microbiology*, 134: 177-185.
- Melchior MB, Van Osch MH, Lam TJ, Vernooij JC, Gaastra W & Fink-Gremmels J (2011). Extended biofilm susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for association between genetic makeup and biofilm susceptibility. *J Dairy Sci*, 94: 5926–5937.
- Middleton JR (2013). *Staphylococcus aureus* mastitis: have we learned anything in the last 50 years? Proceedings of the National Mastitis Council Regional Meeting, July 23-24, 2013, Portland, Maine, pp.1-8.
- Millemann Y (2009). Diagnosis of neonatal calf diarrhoea. *Revue de Médecine Veterinaire*, Toulouse, 160: 404-409.
- Molina LR, Gentilini MB, Carvalho AU, Facury EJ, Moreira GHFA, Moreira LPV & Gonçalves RL (2013). Utilização da vacina *Escherichia coli* j5 na imunização de vacas leiteiras contra mastites causadas por *E. coli*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33 (3): 291-298.
- Monken A & Ingalls W (2002). Milking system cleaning and sanitizing: troubleshooting milk bacteria counts. Proceedings of the National Mastitis Council Regional Meeting, pp. 55-60.
- Morin D (2009). Mammary gland health and disorders. In *Large animal internal medicine* (4th edition). ed. Smith BP, Mosby Elsevier, EUA, ISBN 978-0-323-04297-0, 1112-1143.

- Müller EE (2002). Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. Simpósio sobre sustentabilidade da pecuária leiteira na região sul do Brasil, Maringá, pp. 206-217.
- National Mastitis Council (2001). National Mastitis Council Recommended Mastitis Control Program. Disponível em <http://www.nmconline.org/docs/NMCchecklistInt.pdf>, acessado em 17/11/2014.
- Nickerson SC (2001). Choosing the best teat dip for mastitis control and milk quality. Proceedings of the NMC-PDPW Milk Quality Conference, Madison, Wisconsin, pp. 43-54.
- Nickerson SC (2014). Management strategies to reduce heat stress, prevent mastitis and improve milk quality in dairy cows and heifers. University of Georgia, Bulletin 1426. Disponível em <http://extension.uga.edu/publications/detail.cfm?number=B1426>, acessado em 26/11/2014.
- Nielsen C (2009). Economic impact of mastitis in dairy cows. Doctoral Thesis, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Animal Breeding and Genetics, Uppsala, pp. 16.
- Norman HD, Miller RH, Wright JR, Hutchison JL & Olson KM (2012). Factors associated with frequency of abortions recorded through dairy herd improvement test plans. J Dairy Sci, 95: 4074-4084.
- Nyman AN, Emanuelson U & Waller KP (2013). Diagnostics of intra-mammary bacterial infections – comparison between a pcr assay and culturing. Proceedings of the 29th NKVet Symposium: Mastitis – New Knowledge on Diagnostics and Control on Modern Dairy Farms, Reykjavik, Iceland, pp 10.
- O'Rourke D (2009). Nutrition and udder health in dairy cows: a review. Irish Veterinary Journal, 62: 15-20.
- Oetzel G (2013). An Update on Hypocalcemia on Dairy Farms. Proceedings of the 28th Annual Southwest Nutrition and Management Conference, February 21 & 22, 2013, Tempe, Arizona, pp. 117.
- Olmos G, Boyle L, Hanlon A, Patton J, Murphy JJ & Mee JF (2009). Hoof disorders, locomotion ability and lying times of cubicle-housed compared to pasture based dairy cows. Livestock Science, 125: 199–207.
- Özsoy SY, Özyıldız Z & Güzel M (2011). Clinical, pathological and immunohistochemical findings of bovine cutaneous papillomatosis. Veterinary Journal of Ankara University, 58: 161-165.
- Paradis ME, Bouchard E, Scholl DT, Miglior F & Roy JP (2010). Effect of nonclinical *Staphylococcus aureus* or coagulase-negative staphylococci intramammary infection during the first month of lactation on somatic cell count and milk yield in heifers. J Dairy Sci, 93: 2989-2997.
- Pereira MJ, Oliveira JB (2004). Balanço mineral das espécies pratenses na ilha de São Miguel. Revista de Ciências Agrárias, 23, (2/4): 170 - 184.

- Petersson-Wolfe CS, Mullarky IK & Jones GM (2010). *Staphylococcus aureus* mastitis: cause, detection, and control. College of Agriculture and Life Sciences, Virginia State University, 404-229. Disponível em http://pubs.ext.vt.edu/404/404-229/404-229_pdf.pdf, acessado em 17/09/2014.
- Petersson-Wolfe CS & Currin J (2011). *Escherichia coli*: a practical summary for controlling mastitis. College of Agriculture and Life Sciences, Virginia State University, 404-224. Disponível em https://pubs.ext.vt.edu/404/404-224/404-224_pdf.pdf, acessado em 3/10/2014.
- Petrovski KR, Trajcevb M & Buneskib G (2006). A review of the factors affecting the costs of bovine mastitis. *Journal of the South African Veterinary Association*, 77: 52-60.
- Phuektes P, Browning GF, Anderson G & Mansell PD (2003). Multiplex polymerase chain reaction as a mastitis screening test for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* in bulk milk samples. *J. Dairy Res.* 70:149–155.
- Piccinini R, Cesaris L, Dapra V, Borromeo V, Picozzi C, Secchi C & Zecconi A. (2009). The role of teat skin contamination in the epidemiology of *staphylococcus aureus* intramammary infections. *J. Dairy Res.* 76: 36–41.
- Piepers S, Schukken YH, Passchyn P & Vliegheer S (2013). The effect of intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in early lactating heifers on milk yield throughout first lactation revisited. *J Dairy Sci*, 96: 5095-5105.
- Piepers S. (2014). Vaccination against mastitis: an overview. Proceedings of the National Mastitis Council Regional Meeting, August 4-6, Ghent, Belgium.
- Piessens V, Coillie E, Verbist B, Supré K, Braem G, Nuffel A, Vuyst L, Heyndrickx M & Vliegheer S (2011). Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. *J Dairy Sci.*, 94: 2933–2944.
- Pinto CA (2010). Hematúria enzoótica bovina: contribuição para o seu estudo etiopatogénico. Tese de Doutoramento em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, pp. 8; 103.
- Potter T (2007). Calf pneumonia. *UK vet, Livestock*, 12: 24-28.
- Prenafeta A (2014). General aspects of biofilm development and implication in staphylococcal ruminant mastitis: a current literature review. Proceedings of the National Mastitis Council Regional Meeting, August 4-6, Ghent, Belgium.
- Prestes DS, Filappi A & Cecim M (2002). Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam - uma revisão. *Revista FZVA, Uruguaiana*, 9 (1), 118-132.
- Pugliese M, Mazzullo G, Niutta P & Passantino A (2014). Bovine ocular squamous cellular carcinoma: a report of cases from the Caltagirone area, Italy. *Veterinarski arhiv*, 84: 449-457.

- Pursley SR & Bello NM (2007). Ovulation synchronization strategies in dairy cattle using PGF_{2α} and GnRH. In: Current therapy in large animal theriogenology. (2nd edition). ed. Youngquist RS & Threlfall WR, Saunders Elsevier, EUA, ISBN 10: 0-7216-9323-7, pp. 286-293.
- Pyörälä S (2003). Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary Research*, 34: 565-578.
- Pyörälä S & Taponen S (2008). Coagulase-negative *staphylococci* – emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*, doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.015.
- Qu Y, Fadden AN, Traber MG & Bobe G (2014). Potential risk indicators of retained placenta and other diseases in multiparous cows. *J Dairy Sci*, 97: 4151–4165.
- Quesnell RR, Klaessig S, Watts JL, Schukken YH (2012). Bovine intramammary *Escherichia coli* challenge infections in late gestation demonstrate a dominant antiinflammatory immunological response. *J Dairy Sci.*, 95: 117–126.
- Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, FitzPatrick ES, Fannig S & Hartigan PJ (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. (2nd edition), WileyBlackwell, EUA, ISBN : 978-1-118-25116-4, pp. 469-2250.
- Quinn JC, Kessell A & Weston LA (2014). Secondary Plant Products Causing Photosensitization in Grazing Herbivores: Their Structure, Activity and Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 15: 1441-1465.
- Quirk T, Fox LK, Hancock DD, Capper J, Wenz J & Park J (2012). Intramammary infections and teat canal colonization with coagulase-negative staphylococci after postmilking teat disinfection: species-specific responses. *J Dairy Sci.*, 95: 1906–1912.
- Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW & Constable PD (2007). *Veterinary medicine, a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. (10th edition), Saunders Elsevier, EUA, ISBN – 13: 978-0702027772.
- Rama JMR (2006). Risk factors of lameness in dairy cattle and its interaction with the grazing ecosystem of milk production. *Proceedings of the 14th International Symposium and 6th Conference on Lameness in Ruminants*, 8-11 Nov. 2006, Colonia, Uruguay, pp. 69-73.
- Reinemann DJ, Wolters GMVH, Billon P, Lind O & Rasmussen MD (2003). Review of practices for cleaning and sanitation of milking machines. *International Dairy Federation*, Brussels, Belgium. *Bulletin No. 381/2003*, pp. 4–48.
- Reksen O, Gröhn YT, Barlow JW & Schukken YT (2012). Transmission dynamics of intramammary infections with coagulase-negative staphylococci. *J Dairy Sci*, 95: 4899-4910.
- Retamal PM (2011). Nutritional management of the prepartum dairy cow. In *dairy production medicine*. ed. Risco CA & Melendez P, Willey-Blackwell, Reino Unido, ISBN-13: 978-0-8138-1539-8/2011, pp. 7-18.

- Ribeiro MG, Motta RG, Paes AC, Allendorf SD, Salerno T, Siqueira AK, Fernandes MC & Lara GHB (2008). Peracute bovine mastitis caused by *Klebsiella pneumoniae*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 60, 485-488.
- Riekerink RGMO, Barkema HW, Veenstra S, Poole DE, Dingwell RT & Keefe GP (2006a). Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. Can Vet J, 47: 567-572.
- Riekerink RGMO, Barkema HW, Kelton DF, Keefe GP & Scholl DT (2006b). Risk factors for herd-level infection of contagious mastitis pathogens on canadian dairy farms. Proceedings of the 11th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics, Cairns, Australia, pp. 598.
- Riekerink RGO, Barkema HW, Scholl DT, Poole DE & Kelton DF (2010). Management practices associated with the bulk-milk prevalence of *Staphylococcus aureus* in Canadian dairy farms. Preventive Veterinary Medicine 97: 20–28.
- Ruegg PL (2003). Investigation of Mastitis Problems on Farms. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 19, 47-73.
- Ruegg PL (2004). Managing for milk quality. University of Wisconsin, Madison. Disponível em http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2011/09/managing-for-milk-quality_english.pdf, acessado em 15/10/2014.
- Ruegg P (2010). Making better treatment decisions for clinical mastitis. Proceedings of the National Mastitis Council Regional Meeting, September 8-9, Grand Rapids, Michigan, pp. 15-25.
- Ruegg P (2011). Managing mastitis and producing quality milk. In dairy production medicine, ed. Risco CA, Melendez P, Willey-Blackwell, Reino Unido, ISBN-13: 978-0-8138-1539-8/2011, pp. 207-232.
- Rupp R, Beaudeau F & Boichard, D. (2000) Relationship Between Milk Somatic-Cell Counts in the First Lactation and Clinical Mastitis Occurrence in the Second Lactation of French Holstein Cows. Preventive Veterinary Medicine, 46: 99-111.
- Ryn MV (2009). Relationship of copper, zinc and selenium status with udder health and mastitis incidence in the cal poly holstein herd. Dairy Science Department, College of Agriculture, Food and Environmental Sciences, California Polytechnic State University. Disponível em <http://digitalcommons.calpoly.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1001&context=dscisp>, acessado em 4/4/2015.
- Salgado-Hernández EG, Aparicio-Cecilio A, Velásquez-Forero FH, Castilla-Mata DA & Bouda J (2014). Effect of the first and second postpartum partial milking on blood serum calcium concentration in dairy cows. Czech Journal of Animal Science. 59: 128–133
- Salib FA & Farghali HA (2011). Clinical, epidemiological and therapeutic studies on bovine Papillomatosis in Northern Oases, Egypt. Veterinary World, 4: 53-59.

- Sansano C (2012). Literature Review: bovine mastitis caused by coagulase-negative *Staphylococci*. *Startvac*® Library. Disponível em http://www.dugganvet.ie/productsvet/wp-content/uploads/2013/07/Startvac_Library3EN_vaccine_mamitis.pdf, acessado em 30/09/2014.
- Santos JEP, Galvão KN, Cerri RLA, Chebel R & Juchem SO (2003). Controlled breeding programs for reproductive management. *Advances in Dairy Technology*, 15: 49-68.
- Schreiner DA & Ruegg PL (2003). Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. *J Dairy Sci.*, 86: 3460-3465.
- Schroeder JW (2012). *Bovine Mastitis and Milking Management*. North Dakota State University, Fargo, North Dakota. Disponível em <http://www.ag.ndsu.edu/pubs/ansci/dairy/as1129.pdf>, acessado em 5/10/2014.
- Schukken YH, Wilson DJ, Welcome F, Garrison-Tikofsky L, Gonzalez RN (2003). Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Veterinary Research*, 34: 579-596.
- Schukken YH, Günther J, Fitzpatrick J, Fontaine, MC, Goetze L, Holst O, Leigh J, Petzl W, Schuberth HJ, Sipka A, Smith DG, Quesnell R, Watts J, Yancey R, Zerbe H, Gurjar A, Zadoks RN & Seyfert HM; members of the Pfizer mastitis research consortium. (2011). Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 144: 270–289.
- Schukken YH, Bronzo V, Locatelli C, Pollera C, Rota N, Casula A, Testa F, Scaccabarozzi L, March R, Zalduendo D, Guix R & Moroni P (2014). Efficacy of vaccination on *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds. *J Dairy Sci*, 97: 5250–5264.
- SDASM (Serviços de Desenvolvimento Agrário de São Miguel) (2014). Governo dos Açores. URL: <http://www.azores.gov.pt/>
- Seixas J, Pinto C & Peixoto P (2007). Fotossensibilidade em ruminantes em Portugal. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 102: (563-564) 377-399.
- Sharma N, Pandey V, Sudhan NA (2010). Comparison of some indirect screening tests for detection of subclinical mastitis in dairy cows. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 3: 98–103.
- Sharma N, Rho GJ, Hong YH, Kang TY, Lee HK, Hur TY & Jeong DK (2012). Bovine mastitis: an asian perspective. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7 (6): 454-476.
- Smith KL & Hogan JS (2008). Environmental mastitis: know your opponent. *Proceedings of the National Mastitis Council Regional Meeting*, Green Bay, Wisconsin, 1-7.
- Sousa R (2007). *Clínica de Espécies Pecuárias. Relatório Final de Estágio, Licenciatura em Medicina Veterinária*, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, pp. 40.
- SRAA (Secretaria Regional do Ambiente e do Mar) (2015). Disponível em <http://portal-sraa.azores.gov.pt/> , acessado em 3/04/2015

- SREA (Serviço Regional de Estatística dos Açores) (2015). Entrega de leite na fábrica. Disponível em: <http://estatistica.azores.gov.pt/>, acedido em 03/04/2015.
- Suojala L, Kaartinen L & Pyörälä S (2013). Treatment for bovine *Escherichia coli* mastitis - an evidence-based approach. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 6: 521-531.
- Supré K, Haesebrouck F, Zadoks RN, Vaneechoutte M, Piepers S & De Vliegher S (2011). Some coagulase-negative *staphylococcus* species affect udder health more than others. *J Dairy Sci.*, 94: 2329–2340.
- Taponen S & Pyörälä S (2008). Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis— not so different from *Staphylococcus aureus*? *Veterinary Microbiology*, doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.011
- Taponen S, Salmikivi L, Simojoki H, Koskinen MT & Pyörälä S (2009). Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *J Dairy Sci*, 92: 2610–2617.
- Teixeira P, Ribeiro C & Simões J (2008). Prevenção de Mamites em Explorações de Bovinos Leiteiros. Da teoria à prática. Disponível em: <http://www.veterinaria.com.pt/>, acedido em 27/09/14.
- Thatcher WW, Bilby TR, Bartolome JA, Silvestre F, Staples CR & Santos JE (2006). Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology*: 65, 30-34.
- Tiwari J, Babra C, Tiwari HK, Williams V, Wet S, Gibson J, Paxman A, Morgan E, Costantino P, Sunagar R, Isloor S & Mukkur T (2013). Trends in therapeutic and prevention strategies for management of bovine mastitis: an overview. *Journal of Vaccines & Vaccination*, 4: 176. doi:10.4172/2157-7560.1000176.
- Tsujita H & Plummer CE (2010). Bovine Ocular Squamous Cell Carcinoma. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 26: 511-529.
- Vidal J (2013). Fotossensibilidade ou doença da pele. *Revista Ruminantes*, 10: 60-62.
- Viguier C, Arora S, Gilmartin N, Welbeck K & O’Kennedy R (2009). Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends in Biotechnology*, 27: 486-493.
- Waller KP (2013). Microbiological diagnostics of udder infections. *Proceedings of the 29th NKVet Symposium: Mastitis – New Knowledge on Diagnostics and Control on Modern Dairy Farms, 13-14th May 2013, Reykjavik, Iceland*, pp 7.
- Weaver AD, Jean GS & Steiner A (2005). Head and neck surgery. In *Bovine Surgery and Lameness*, 2nd edition, Weaver, A. D., Jean, G.S., Steiner, A (Eds), Blackwell publishing, 54-74.
- Wenz JR (2004). Practical monitoring of clinical mastitis treatment programs. *Proceedings of the 43rd Annual Meeting of the National Mastitis Council, Charlotte, NC*, pp.41-46.

- Westwood CT & Lean IJ (2001). Nutrition and lameness in pasture-fed dairy cattle. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production, 61: 128-134.
- Wilson DJ, Mallard BA, Burton JL, Schukken YH & Grohn YT (2007). Milk and serum J5-specific antibody responses, milk production change, and clinical effects following intramammary *Escherichia coli* challenge for J5 vaccinate and control cows. Clin. Vaccine Immunol. 14: 693–699.
- Wilson W, East N, Rowe J & Cortese V (2009). Use of biologics in the prevention of infectious diseases. In large animal internal medicine. (4th edition). ed. Smith BP, Mosby Elsevier, EUA, ISBN 978-0-323-04297-0, pp. 602-607.
- Woolums AR, Ames TR & Baker JC (2009). The bronchopneumonias (respiratory disease complex of cattle, sheep and goats). In Large Animal Internal Medicine. (4th edition). ed. Smith BP, Mosby Elsevier, EUA, ISBN 978-0-323-04297-0, pp. 1112-1143
- Yeiser EE, Leslie KE, McGilliard ML & Petersson-Wolfe CS (2012). The effects of experimentally induced *Escherichia coli* mastitis and flunixin meglumine administration on activity measures, feed intake, and milk parameters. J Dairy Sci., 95: 4939–4949.
- Zadoks RN, Allore HG, Barkema HW, Sampimon OC, Wellenberg GJ, Grohn YT & Schukken YH (2001). Cow- and quarter-level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. J Dairy Sci, 84: 2649–2663.
- Zecconi A (2006). Can we eradicate *staphylococcus aureus* mastitis? Proceedings of the 24th World Buiatrics Congress, Nice, France, pp. 225-236.

ANEXO I: Inquérito de recolha de informação na exploração

Inquérito de Recolha de Informação

Explorações Leiteiras de São Miguel

Nome: _____

Endereço: _____

Contato: _____

1. **Exploração**

1.1 Nº animais em lactação: Vacas _____ Novilhas _____

1.2 Nº vacas secas _____

1.3 Produção diária total _____

1.4 Última CCS em tanque: **A** - ≤ 150.000 / **B** - $> 150.000 \leq 250.000$ /
C - $> 250.000 \leq 400.000$ / **D** - > 400.000

1.5 Contagem de Microrganismos Totais no Leite: _____

2. **Alojamento**

A - Pastagem

B - Estabulação

C - Semi-Estabulação

Se estabuladas:

3. **Instalações**

3.1 Cubículos: Sim/Não

3.2 Tipo de Cama: **A** - Palha **B** - Areia **C** - Serradura **D** - Tapetes

3.3 Limpeza Regiões Posteriores dos Cubículos: **A** - 1x **B** - 2x **C** - 3x/dia

3.4 Substituição das Camas: **A** - 3x/semana/ **B** - 2x/semana/ **C** - Semanal/ **D** - Outros

3.5 Ventilação: **A** - Boa **B** - Suficiente **C** - Insuficiente

3.6 Higiene Bebedouros: **A** - Limpos **B** - Sujos

3.7 Nº bebedouros: **A** - Suficiente **B** - Insuficiente

4. **Maneio e higiene da ordenha**

4.1 Frequência da ordenha: **A** - 2x/dia **B** - 3x/dia

4.2 Quem realiza a ordenha? **A** - Produtor **B** - Empregado **C** - Ambos

4.3 O ordenhador utiliza luvas? Sim /Não

4.4 Higiene da ordenha: **A** - Elevada **B** - Média **C** - Baixa

4.5 Higiene dos animais (Elevada; Média; Baixa): Úbere/Tetos _____ Caudas _____

4.6 Realiza-se pré-*dipping*? Sim/Não

4.7 Faz-se secagem dos tetos/úbere antes da colocação das tetinas? Sim / Não

4.10.1 Com quê? **A** - Pano Comum / **B** - Pano Individual / **C** - Papel / **D** - Outro

4.8 É feita a eliminação dos primeiros jatos de leite antes da ordenha? Sim/Não

4.9 Realiza-se higiene das tetinas entre vacas? Sim/Não

4.10 Realiza-se pós-*dipping*, em todas as vacas? Sim/Não

4.11 Ordem da ordenha: Vacas com mastite e/ou tratamentos em último? Sim/Não

5. **Máquina de ordenha**

5.1 Tipo de máquina: **A** - Fixa **B** - Móvel

5.2 Lavagem logo após a ordenha? Sim/Não

5.3 É utilizada água quente? Sim/Não

6. **Sistema de armazenamento e refrigeração do leite**

6.1 Tipo de Tanque: **A** - Frio **B** - Móvel **C** - Ambos

6.2 Limpeza: **A** - Automática **B** - Manual **C** - Ambas

6.3 Limpeza do tanque: **A** - Satisfatória **B** - Insatisfatória

6.4 Periodicidade da recolha de leite na exploração/entrega de leite no posto?

A - 2x/dia **B** - Diária **C** - 2 em 2 dias

7. **Secagem**

7.1 Duração média do período de secagem _____ dias

7.2 Método: **A** - Gradual **B** - Abrupta

7.3 É efetuado algum tratamento de secagem? Sim/Não Qual? _____

7.4 Todas as vacas recebem tratamento de secagem? Sim/Não

7.5 Tratamento realizado em função de ATB? Sim/Não

7.6 São utilizados selantes internos à secagem? Sim/Não

7.7 As vacas secas são separadas das vacas em lactação? Sim/Não

8. **Mastites – diagnóstico e tratamento**

8.1 Como é realizada a deteção de mastites? Realiza-se TCM? Sim/Não

Realiza-se contraste leiteiro: Sim/Não

8.2 Com que frequência se realizam TCM? **A** - Diária/ **B** - Semanal/ **C** - Mensal/

D - Apenas se suspeita de mastite **E** - Nunca

8.3 Procedimento após deteção de vacas com mastite: Faz-se tratamento: Sim/Não

Recolhe-se amostra para ATB antes de tratamento: Sim/Não

Solicita assistência veterinária: Sim/Não

8.4 Vacinação de prevenção de mastites? Sim/Não

8.5 Registo de tratamentos: Sim/Não

9. **Maneio do vitelo**

9.1 Os vitelos mamam na mãe? Sim/Não

9.2 Se sim, quanto tempo permanece com a vaca? _____

9.3 Se não, é feita a administração de colostro? Sim/Não Quantidade? _____

9.4 Qual o alojamento das vitelas até ao desmame: **A** - Pastagem

B - Estabulação individual

C - Estabulação em grupo

- 9.5** Como é feita a alimentação dos vitelos até ao desmame?
- A** - Leite rejeitado da ordenha de vacas com mastite
 - B** - Leite rejeitado da ordenha de vacas em tratamento com AB
 - C** - Leite em pó
- 9.6** Substituição do efetivo: Animais nascidos na exploração: Sim/ Não

10. Outras doenças frequentes na exploração:

- A** - RMF
- B** - Hipocalcémias
- C** - Pneumonias nas Vacas
- D** - Pneumonias nos Bezerros
- E** - Diarreias nas Vacas
- F** - Diarreias nos Bezerros
- G** - DA
- H** - Abortos
- I** - Outros Problemas Reprodutivos
- J** - Cetose
- L** - Problemas Podais
- M** - Fotossensibilidade
- N** - Outros