

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Mastite na Vaca Leiteira em sistema de pastoreio: microrganismos patogénicos e a sua sensibilidade aos antibióticos

Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária

Marília de Jesus do Canto Branco

Orientador: Professor Doutor João Carlos Caetano Simões

Co-orientador: Dr^a Joana Cristina Pereira Andrade



Vila Real, 2019

Marília de Jesus do Canto Branco

Mastite na Vaca Leiteira em sistema de pastoreio:
microrganismos patogénicos e a sua sensibilidade
aos antibióticos



2019

Mastite na Vaca Leiteira em sistema de pastoreio: microrganismos patogénicos e a sua sensibilidade aos antibióticos

Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária

Marília de Jesus do Canto Branco

Orientador: Professor Doutor João Carlos Caetano Simões

Co-orientador: Dr^a Joana Cristina Pereira Andrade

Composição do Júri:

Presidente: Professora Doutora Maria da Conceição Castro Fontes

Arguente: Professora Doutora Maria José Saavedra

Arguente: Professor Doutor Filipe da Costa Silva

Orientador: Professor Doutor João Carlos Simões

Vila Real, 2019

“As doutrinas apresentadas nesta dissertação
são da exclusiva responsabilidade do autor”

Dedicatórias e agradecimentos

Agradeço à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, a todos os professores, técnicos, auxiliares e funcionários, o meu muito obrigado.

Ao meu orientador, Doutor João Simões por ter aceitado desde logo orientar esta dissertação, pela ajuda, motivação, disponibilidade, paciência e prontidão que teve durante a realização deste trabalho.

Quero deixar um especial agradecimento à Dr^a Joana pelos ensinamentos que me transmitiu durante os seis meses de estágio, por toda a ajuda e disponibilidade, pelos bons momentos passados, e pela amizade. O meu sincero “obrigado”.

A toda a equipa da Associação de Jovens Agricultores Micaelenses, que tão bem me acolheram durante os seis meses de estágio. Ao Renato Sardinha, pela disponibilidade dos dados e pela ajuda nas questões técnicas.

Aos meus amigos que me acompanharam ao longo desta jornada, principalmente à Olga e a Daniela, obrigada pela vossa amizade.

Agradeço de forma sentida, aos meus pais, por me acompanharem nesta caminhada, por sempre me apoiarem e darem força nos momentos mais difíceis, pela paciência e carinho, é a vós que devo tudo aquilo que sou hoje. Sempre foram e serão sempre os meus pilares e sem vocês este sonho não seria possível. À minha irmã pelo apoio e amizade ao longo destes anos. Ao meu afilhado, por ser tão especial para a sua “Mê”.

Ao meu marido, por sempre acreditar em mim e me apoiar ao longo destes anos, pelo carinho e companheirismo. Não poderia ter escolhido melhor companheiro para a vida. Obrigada por todos os sonhos que me proporcionaste, ao teu lado este percurso foi mais bonito e fácil de percorrer.

Queria agradecer, em jeito de dedicatória aos meus avós que já não estão presentes fisicamente, mas que tenho a certeza que estão felizes e orgulhosos da sua neta. Principalmente ao avô Joaquim, pois sei o quanto orgulho tinha na minha escolha, será sempre o meu herói.

Resumo

A mastite é uma doença de grande importância e frequência, constituindo uma das principais causas de perdas económicas nas explorações de bovinos leiteiros. O tratamento tem por base a utilização de antibioterapia, com prévia identificação dos agentes etiológicos que lhe dão origem, bem como a determinação da sensibilidade aos antibióticos “*in vitro*” para que o tratamento seja mais efetivo. No presente trabalho foi determinada a prevalência de agentes bacterianos a partir de amostras de leite mamático, bem como a sua sensibilidade a agentes antimicrobianos a partir de explorações de bovinos leiteiros de São Miguel, Açores. Num primeiro estudo retrospectivo, entre o período de Março de 2015 e Junho de 2016, os agentes mais frequentemente isolados foram *Escherichia coli*, 42,4% (n=708), *Streptococcus uberis*, 24,5% (n=409), *Enterococcus* spp., 17,2% (n=288), *Staphylococcus* coagulase negativo, 11,3% (n=188), *Streptococcus* spp., 11% (n=184). No segundo estudo prospetivo (2018), observou-se que as proporções de sensibilidade alta, intermédia e resistência considerando todos os discos testados (n=725), foram de 52,0% (n=377), 42,2% (n=306) e 5,8% (n=42), respetivamente. As maiores proporções de atividade antimicrobiana foram observadas em discos de danofloxacina (75,3%), seguidas por amoxicilina-ácido clavulânico (59,5%), cefalexina (55,6%), ampicilina (55,3%) e cefquinoma (53,6%). Inversamente, a menor atividade antimicrobiana foi observada em cefazolina e trimetropim-sulfametoxazol (25% cada). Uma alta proporção de resistência foi observada para trimetropim-sulfametoxazol (25,0%) e espiramicina (24,5%). A danofloxacina foi o antimicrobiano eleito para *Escherichia coli* (87,5%), demonstrando também alta atividade (> 50%) para *Streptococcus uberis* e *Staphylococcus* coagulase negativo. Conclui-se que os isolados bacterianos obtidos a partir de leite mamático de vacas leiteiras micaelenses apresentam elevada proporção de resistência às classes de sulfonamidas e de macrólidos, e inversamente, elevada sensibilidade a fluoroquinolonas.

Palavras-chave: bovinos leiteiros, mastite, agentes etiológicos, sensibilidade, resistência a antimicrobianos.

Abstract

Mastitis is a disease of great importance and frequency and is one of the main causes of economic losses in dairy cattle farms. The treatment is based on the use of antibiotic therapy, hence the importance of identifying the etiological agents that give rise to it, as well as the sensitivity to antibiotics so that the treatment is more effective. In the present work, the prevalence of bacterial agents from milk samples with mastitis was determined, as well as their sensitivity to antimicrobial agents from dairy cattle farms of São Miguel, Azores. In a first retrospective study, between March 2015 and June 2016, the most frequently isolated agents were *Escherichia coli*, 42,4% (n=708), *Streptococcus uberis*, 24,5% (n=409) *Enterococcus* spp., 17,2% (n=288), coagulase negative *Staphylococcus*, 11,3% (n=188), *Streptococcus* spp., 11% (n=184). In the second study (2018), it was observed that the proportions of sensitivity, intermediate and resistance considering all discs tested (n=725) were 52,0% (n = 377), 42,2% (n = 306) and 5,8% (n=42), respectively. The highest proportions of antimicrobial activity were observed on danofloxacin disks (75,3%), followed by amoxicillin-clavulanic acid (59,5%), cephalexin (55,6%), ampicillin (55,3%) and cefquinome (53,6%). Conversely, the lowest antimicrobial activity was observed in cefazolin and trimethoprim-sulfamethoxazole (25% each). A high proportion of resistance was observed for trimethoprim-sulfamethoxazole (25,0%) and spiramycin (24,5%). The danofloxacin was the antimicrobial agent chosen for *Escherichia coli* (87,5%), also showing high activity (> 50%) for *Streptococcus uberis* and coagulase negative *Staphylococcus*. It is concluded that the bacterial isolates obtained from milk samples with mastitis from dairy cows presented a similar resistance to the classes of sulfonamides and macrolides, and conversely, a high sensitivity to fluoroquinolones.

Key words: dairy cattle, mastitis, etiological agents, sensitivity, antimicrobial resistance.

Índice Geral

| | |
|--|----------|
| Dedicatórias e agradecimentos | I |
| Resumo | II |
| Abstract | III |
| Índice de tabelas | VI |
| Índice de figuras | VI |
| Índice de gráficos | VI |
| Abreviaturas, siglas, símbolos e acrónimos | VII |
| I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 1 |
| 1. A Mastite | 1 |
| 1.1. Importância económica das mastites | 2 |
| 2. Agentes etiológicos de mastites..... | 3 |
| 2.1. Classificação dos agentes etiológicos/ Classificação epidemiológica | 3 |
| 2.2. Principais agentes etiológicos de mastites | 6 |
| 2.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> | 6 |
| 2.2.2. <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo | 9 |
| 2.2.3. <i>Streptococcus agalactiae</i> | 11 |
| 2.2.4. <i>Streptococcus uberis</i> | 12 |
| 2.2.5. <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | 14 |
| 2.2.6. <i>Corynebacterium bovis</i> | 15 |
| 2.2.7. Coliformes..... | 16 |
| 2.2.7.1. <i>E.coli</i> | 18 |
| 2.2.7.2. <i>Klebsiela</i> | 19 |
| 2.2.8. <i>Enterococcus</i> spp..... | 20 |
| 2.2.9. <i>Bacillus</i> | 20 |
| 2.2.10. <i>Mycoplasma bovis</i> | 21 |
| 2.3. Fases de infeção da glândula mamária | 21 |
| 2.3.1. Invasão | 21 |
| 2.3.2. Infeção..... | 22 |
| 2.3.3 Inflamação..... | 22 |
| 2.4. Classificação clínica das mastites | 22 |
| 2.4.1. Mastite clínica | 23 |
| 2.4.2. Mastite subclínica..... | 24 |

| | |
|--|----|
| 3. Detecção e diagnóstico de mastites | 25 |
| 3.1. Recolha de amostras de leite mamítico | 25 |
| 3.2. Cultura e isolamento de microrganismos provenientes de leite mamítico..... | 26 |
| 3.3. Antibiograma..... | 28 |
| 4. Tratamento | 29 |
| 4.1. Antibioterapia..... | 30 |
| 4.1.1. Antibióticos mais utilizados no controlo de mastites..... | 33 |
| 4.2. Tratamento no período seco | 37 |
| 4.3. Tratamento de novilhas | 38 |
| 4.4. Tratamento de suporte..... | 38 |
| 5. Resistência aos agentes antimicrobianos | 40 |
| 6. Controlo das mastites bovinas | 43 |
| II. ESTUDO LABORATORIAL | 47 |
| 1. Objetivos | 47 |
| 2. Material e métodos | 47 |
| 2.1. Amostras de leite | 47 |
| 2.2. Cultura bacteriana | 48 |
| 2.3. Antibiograma..... | 49 |
| 3. Resultados e discussão | 51 |
| 3.1. Estudo 1 | 51 |
| 3.1.1. Proporção de microrganismos observados entre Março de 2015 e Junho de 2017..... | 51 |
| 3.2. Estudo 2..... | 54 |
| 4. Conclusão | 60 |
| 5. Bibliografia..... | 61 |

Índice de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Agentes bacterianos causadores de mastite: microrganismos contagiosos e ambientais..... | 4 |
| Tabela 2 - Principais agentes etiológicos, a sua forma de contágio e reservatório | 6 |
| Tabela 3 - Classificação da mastite clínica | 24 |
| Tabela 4 - Número de infeções intramamárias em 7 explorações durante 20 meses..... | 27 |
| Tabela 5 - Agentes antimicrobianos e via de administração mais apropriada para cada agente..... | 36 |
| Tabela 6 - Proporção de microrganismos em mastites observados entre Março de 2015 e Junho de 2017..... | 51 |
| Tabela 7 - Prevalências e frequências de agentes patogénicos causadores de mastites em diferentes estudos | 53 |
| Tabela 8 - Perfil de sensibilidade de <i>E. coli</i> , <i>Strep. uberis</i> e <i>Streptococcus coagulase negativo</i> (CNS) | 56 |
| Tabela 9 - Perfis de multirresistência a antibióticos de isolados de mastite bovina clínica e subclínica na ilha de São Miguel, Açores..... | 57 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Aspeto macroscópico de mastite por coliformes (AJAM). Foi isolado no laboratório da AJAM (<i>E. coli</i>)..... | 17 |
| Figura 2 - Mastite por <i>E. coli</i> (confirmação laboratorial). O animal já apresentava sinais de toxemia, tendo vindo a falecer | 19 |
| Figura 3 - Representação esquemática da prevalência de mastite clínica e subclínica num rebanho de bovinos de leite..... | 23 |
| Figura 4 - placa de Petri com 3 amostras diferentes, após período de incubação, apresentando crescimento bacteriano (AJAM/ CJA) | 48 |
| Figura 5 - Resultado de antibiograma após incubação das placas (AJAM/ CJA)..... | 50 |

Índice de gráficos

| | |
|--|----|
| Gráfico 1 - Proporção relativa de microrganismos patogénicos em mastites observados entre Março de 2015 e Junho de 2017..... | 52 |
| Gráfico 2 - Percentagem de sensibilidade alta, intermédia e resistência, de acordo com cada antimicrobiano..... | 55 |

Abreviaturas, siglas, símbolos e acrónimos

® - marca registada
µg - microgramas
µl - microlitro
µm - micrómetro
AINEs - anti-inflamatórios não esteroides
B. - *Bacillus*
C. - *Corynebacterium*
°C - graus Celsius
CCS/SCC - contagem de células somáticas
CMB - concentração mínima bactericida
CMI - concentração mínima inibitória
E. - *Enterococcus*
E. coli - *Escherichia coli*
EUA - Estados Unidos da América
EV – endovenosa
Gram + - Gram positivo
IM - intramuscular
IS - intervalo de segurança
K. - *Klebsiella*
Kg - quilogramas
MAR – multirresistência a antibióticos
mg - miligramas
ml - mililitros
mm - milímetros
PCR - “polimerase chain reaction”
PMN - células polimorfonucleadas
SCN/ SNC - *Staphylococcus* coagulase negativos
Strep./ Str. - *Streptococcus*
St./ S. - *Staphylococcus*
TCM - Teste Californiano de Mamites
TSA – teste de sensibilidade a antimicrobianos
UFC – unidades formadoras de colónias
UI – Unidades Internacionais

I. Revisão bibliográfica

1. A Mastite

A mastite é a inflamação da glândula mamária que se caracteriza por apresentar alterações patológicas no tecido glandular e uma série de modificações físico-químicas no leite. As mais comumente observadas são alteração de coloração, aparecimento de coágulos de leite e presença de grande número de leucócitos (Radostits, 2000). Entre as diversas doenças que afetam o rebanho leiteiro, esta enfermidade destaca-se pela sua frequência e perdas económicas como o descarte do leite, a queda da produção leiteira, os gastos com antibióticos e, eventualmente, o refugo do animal (Smith, 2006).

A etiologia desta doença pode ser ter origem tóxica, traumática, alérgica, metabólica ou infecciosa. No entanto, as principais causas são as de origem infecciosas destacando-se as bactérias pela maior frequência, além de fungos, algas e vírus (Radostits, 2000). De facto, a mastite bovina é uma doença de grande importância, sendo normalmente causada por uma infeção bacteriana ascendente (Kubota *et al.*, 2007). Os agentes bacterianos podem ainda ser classificados em dois grupos epidemiológicos: contagiosos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis* e *Mycoplasma bovis*, entre outros) e ambientais (*E. coli* e o *Streptococcus uberis*, entre outros), consoante o seu modo de transmissão e fonte de infeção (Radostits *et al.*, 2002; Smith, 2009). São habitualmente estes agentes os que maiores entraves colocam aos produtores e aos veterinários no controlo de mamites (Teixeira *et al.*, 2008).

Para fazer uma correta abordagem à mastite, implementando programas de prevenção e protocolos de tratamento adequados, é necessário um correto diagnóstico. Existem vários métodos de deteção de mastites, sendo a cultura bacteriológica, no entanto, o meio diagnóstico *gold standard* (Smith, 2009; Malek dos Reis *et al.*, 2011). A partir deste método é possível fazer a identificação dos agentes causadores de mastite e, posteriormente, antibiogramas para implementação de protocolos de tratamento e prevenção adequados. Sendo a mastite uma doença maioritariamente causada por bactérias, o seu tratamento baseia-se, essencialmente, no uso de agentes antimicrobianos. A sua utilização deve ser comedida, cabendo ao Médico Veterinário passar essa informação aos produtores (Quinn *et al.*, 2011).

Existe uma grande variedade de antibióticos utilizados no tratamento de mastite, cuja escolha é realizada em função do agente envolvido. Esta baseia-se nos resultados do antibiograma e teste de sensibilidade *in vitro*, os quais nos indicam qual o fármaco

antimicrobiano mais adequado. No entanto, numa primeira fase, a escolha pode ancorar-se no historial do rebanho e nos sinais clínicos (Quinn *et al.*, 2011). As preocupações relativas ao impacto da utilização de antimicrobianos em explorações pecuárias, e neste caso concreto, da produção de leite, devido às emergentes resistências, são cada vez maiores (Call *et al.*, 2008). No entanto, a relação entre a utilização de antimicrobianos e o desenvolvimento de resistências pode não ser totalmente claro (Call *et al.*, 2008; Saini *et al.*, 2012). O facto da utilização de antimicrobianos ser um fator que sempre contribuirá para o desenvolvimento de resistências (Call *et al.*, 2008) leva a implementar programas de qualidade de leite para que estes sejam aplicados de forma correta. Desta forma, interessa saber a situação atual da distribuição de agentes bacterianos presentes no leite e respetivas resistências em vacas com mastites.

1.1. Importância económica das mastites

A mastite é a doença com maior importância económica na exploração leiteira (Bexiga *et al.*, 2005). Segundo Ribeiro *et al.* (2003) as perdas resultam tanto de mastites clínicas como de mastites subclínicas. No entanto, a maioria dos produtores não se apercebe das grandes perdas dado que esta doença raramente causa mortalidade (Ravaomanana *et al.*, 2004).

As perdas resultantes das mastites têm a ver com custos que se encontram, direta ou indiretamente, relacionados com a circulação da doença na exploração. Nas perdas diretas estão incluídas a perda da produção leiteira, gastos com tratamentos médico-veterinários e fármacos. Enquanto, os custos que se geram indiretamente correspondem à diminuição da produção leiteira durante a restante lactação, por lesões na glândula, penalizações por aumento no número de células somáticas e alteração dos parâmetros quantitativos (proteína e gordura), necessidade de aumento de mão-de-obra para tratamentos e cuidados adicionais, maiores percentagens de refugo e reposição, vacas de refugo com menor peso da carcaça, maior intervalo entre partos (menos nascimentos), bem como, redução do potencial genético e mortes (Blowey *et al.*, 1999).

Vários estudos foram realizados em diversos países devido aos avultados prejuízos provocados pelas mastites. Estudos recentes demonstram que, por exemplo, em Espanha o custo de uma mastite equivaleria a uma perda de 190 a 200 euros por vaca ano (Baucells, 2015). Noutro estudo efetuado em 2001, em França, o prejuízo por vaca acometida por mastite clínica rondou os 78 euros (Seeders *et al.*, 2003).

A grande maioria dos produtores não tem consciência de que se trata apenas da ponta do iceberg e de uma pequena parte do custo real da doença (Baucells, 2015). Por cada caso de mastite clínica, há 15 a 40 casos de mastite subclínica que, de forma lenta, oculta e latente, causam o maior impacto económico devido a uma perda na produção (Baucells, 2015).

A contagem de células somáticas é o parâmetro de avaliação leiteira mais diretamente relacionado com a incidência de mamites numa exploração, pois estas refletem a resposta imunitária do animal à infeção (Teixeira *et al.*, 2008). As perdas são diretamente proporcionais à percentagem de quartos infetados com mamite tendo em consideração o efetivo animal em produção (Teixeira *et al.*, 2008).

2. Agentes etiológicos de Mastites

2.1. Classificação dos agentes etiológicos/ Classificação epidemiológica

A mastite é uma doença com agentes etiológicos bem identificados, que resulta da interação de três fatores: agente etiológico, meio ambiente e animal (Radostitis, 2000). Embora possam ter origem em causas físicas, químicas, fisiológicas ou microbiológicas (Teixeira *et al.*, 2008) a etiologia das mamites é complexa e multifatorial (Anaya-Lopez *et al.*, 2006).

Embora existam fungos, algas e vírus que possam provocar mamites, os microrganismos predominantes são de origem bacteriana existindo mais de 200 diferentes microrganismos deste tipo (Teixeira *et al.*, 2008).

Os agentes etiológicos podem ser classificados, classicamente, segundo a sua patogenia em agentes “maiores” e “menores”. Os agentes maiores são aqueles que estão geralmente associados a mastites clínicas, tais como o *Str. agalactiae*, *St. aureus*, *Str. uberis*, *Str. dysgalactiae*, coliformes (como por exemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. e *Citrobacter* spp.) e *Pseudomonas* spp. Micoplasma, prototecas e leveduras, são também considerados agentes “maiores”. Em suma, os agentes “maiores” são os que provocam um impacto considerável na saúde da vaca, na qualidade do leite e na produtividade (Zadoks and Fitzpatrick, 2009).

Os agentes “menores” são aqueles que se encontram normalmente na pele do úbere e que podem ser considerados como fazendo parte da flora bacteriana do úbere. Estes microrganismos apresentam uma interação muito complexa com o úbere e podem estar associados a elevadas CCS. Neste grupo estão incluídas as bactérias *Staphylococcus*

coagulase negativo (SCN) e *Corynebacterium bovis*. Estas bactérias produzem substâncias anti-bacterianas que podem proteger a glândula mamária de infecções por agentes maiores e exercer efeitos de inibição por competitividade (Biggs, 2009).

Os SCN têm assumido mais recentemente um papel importante na ocorrência de mastites em vacas leiteiras.

De modo geral, e tendo em consideração a fonte proveniente da infecção, a mastite pode-se subdividir em duas grandes categorias (Tabela 1): mastite contagiosa e mastite ambiental (Radostitis *et al.*, 2000; Smith, 2002). É importante referir, que esta divisão envolve a epidemiologia dos agentes considerando principalmente as superfícies/locais onde os agentes etiológicos podem ser isolados e a forma como estes se transmitem de vaca para vaca ou o modo como infetam o animal. Deste modo, facilmente se compreende que a profilaxia das mastites está relacionada com estes aspetos.

Tabela 1 - Agentes bacterianos causadores de mastite: microrganismos contagiosos e ambientais (Teixeira *et al.*, 2008).

| Microrganismos contagiosos | Microrganismos ambientais |
|--|--|
| <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Corynebacterium bovis</i> <i>Mycoplasma</i> spp. | <i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Citrobacter</i> spp. <i>Enterobacter</i> spp. <i>Klebsiella</i> spp. <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Pasteurella</i> spp. <i>Streptococcus faecalis</i> <i>Fungi</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. (<i>excepto Str. agalactiae</i>) |

A mastite ambiental surge quando o reservatório de agentes bacterianos não se encontra na glândula mamária, mas sim no ambiente que rodeia o animal. Neste tipo de mastite não é necessário haver um animal com a glândula mamária infetada para perpetuar a

doença dentro da exploração. A cama, a água contaminada, a matéria fecal ou fomites servem de reservatório aos microrganismos capazes de originar a doença se penetrarem na glândula mamária (Smith, 2002). As bactérias coliformes Gram negativas são as mais prevalentes desta categoria de mastites, e incluem: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp., e ainda outras com significado clínico, tais como, o gênero *Pseudomonas*, *Serratia* e *Proteus* (Radostits *et al*, 2000; Smith, 2002). Diferentes espécies de Estreptococos ambientais podem também estar envolvidos nesta categoria, sendo *Str. uberis* o agente isolado e identificado com maior frequência.

A mastite contagiosa surge quando os microrganismos contagiosos se disseminam a partir de quartos infetados para os outros quartos ou para outras vacas. O principal habitat das bactérias causadoras de mastites contagiosas é o próprio úbere ou lesões do teto. Estes tipos de agentes estão mais associados a mastites crônicas ou subclínicas e a transmissão é feita através de fomites com leite contaminado, uso de panos comuns, mãos do ordenhador e pela máquina da ordenha. Os principais agentes patogênicos causadores de mastites contagiosas são *Strep. agalactiae*, *St. aureus* e *Mycoplasmas* (Biggs, 2009), classificados deste modo devido ao seu elevado grau de contágio e às grandes alterações que podem provocar na glândula mamária. Estes agentes são reconhecidos por provocar surtos nos quais um grande número de animais fica infetado num curto espaço de tempo (Britten, 2006). Uma redução da prevalência destes microrganismos pode ocorrer através de um melhor conhecimento da forma como estes agentes contagiosos estão associados a práticas de ordenha e manejo das explorações (Lombard *et al*, 2008).

Apesar desta classificação dividir os agentes etiológicos em contagiosos e ambientais, existem bactérias como *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae* que podem provocar mastites ambientais e/ou contagiosas (Smith, 2002).

Dos microrganismos referidos na tabela 1, os mais frequentes, quando se aborda o problema das mamites na prática da medicina de produção de vacas leiteiras são: *St. aureus*, *Strep. agalactiae*, *Strep. dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis* e *Mycoplasma bovis* (agentes contagiosos), e *E. coli* e *Strep. uberis* (agentes ambientais). São habitualmente estes agentes os que maiores entraves colocam aos produtores e aos veterinários no combate às mamites.

Há determinadas características de cada um dos agentes etiológicos com importância na abordagem terapêutica e profilática das mastites que é importante ter em conta, tais como a forma de contágio e os reservatórios e que estão referidas na Tabela 2.

Tabela 2 - Principais agentes etiológicos, a sua forma de contágio e reservatório (Teixeira *et al.*, 2008).

| Agente etiológico | Reservatório | Forma de contágio |
|------------------------------|------------------------|---|
| <i>St. aureus</i> | Úbere infetado | Ordenha |
| <i>Strep. agalactiae</i> | Úbere infetado | Ordenha |
| <i>Strep. dysgalactiae</i> | Úbere infetado e camas | Ordenha, superfícies de repouso e amamentação |
| <i>Corynebacterium bovis</i> | Úbere infetado | Ordenha (má desinfecção) |
| <i>Mycoplasma bovis</i> | Úbere infetado | Ordenha |
| <i>E. coli</i> | Camas e meio ambiente | Ordenha e Repouso |
| <i>Strep. uberis</i> | Camas | Ordenha e Repouso |

2.2. Principais agentes etiológicos de mastites

2.2.1. *Staphylococcus aureus*

St. aureus é uma bactéria Gram+, hemolítica, coagulase positiva, anaeróbia facultativa e catalase positiva (Teixeira *et al.*, 2008). *S. aureus* é a bactéria mais vezes detetada efetivos (Taponen *et al.*, 2009), sendo o agente que mais frequentemente origina mastites contagiosas nas vacas de leite. A sua prevalência não parece estar relacionada com o tamanho da exploração ou região onde se localiza (Lombard *et al.*, 2008). A prevalência deste tipo de mastites tem diminuído nas vacarias que adotam programas de controlo de mastites (Radostitis *et al.*, 2000). Este agente patogénico é considerado o mais temido pela sua resistência aos antibióticos e à sua habilidade em persistir no efetivo sob a forma de mastites subclínicas (Zhen *et al.*, 2009). *St. aureus* é aquele que causa infeções mais resistentes e de mais difícil tratamento (Teixeira *et al.*, 2008).

Do ponto de vista fenotípico, são microrganismos esféricos de 0,5 a 1,2 µm de diâmetro, e podem estar agrupados ou isolados, não esporulados, geralmente sem cápsula, anaeróbios facultativos, não móveis e com metabolismo fermentativo. Crescem em placas de agar sangue ou ainda numa meio seletivo como Baird Parker, em colónias de 3-4 mm de cor amarelada e geralmente hemolíticas, cocos Gram- positivos, e catalase e coagulase positivos (Biggs, 2009).

As mastites causadas por *St. aureus* são, na sua maioria, de carácter crónico e de natureza subclínica, apresentando também forma clínica intermitente (Biggs, 2009).

Coloniza a pele bem como o canal do teto, aderindo-se à parede. É transmitida de quarto para quarto e de vaca para vaca através das tetinas, dos panos de ordenha e mãos do

ordenhador durante as ordenhas (Teixeira *et al.*, 2008). Esta bactéria não é um habitante permanente da glândula mamária (Rebhun, 1999). O reservatório principal é o quarto infetado e o sistema de ordenha (Teixeira *et al.*, 2008; Taponen *et al.*, 2009). *St. aureus* já foi isolado em diversos locais com localização extra-mamária, colonizando frequentemente diversas zonas corporais de vitelos e novilhas (Taponen *et al.*, 2009). As moscas são um veículo importante de transmissão de *S. aureus* para as novilhas durante o pré-parto (Radostits *et al.*, 2000). Em algumas explorações, este agente pode ser introduzido a partir de novilhas recentemente adquiridas (Biggs, 2009). *St. aureus* possui diversos fatores de virulência: hemolisinas, leucocidinas, enterotoxinas, toxinas relativas ao choque tóxico, formação de biofilme, entre outras, o que leva muitas vezes a necrose do tecido mamário com o consequente desprendimento deste (Taponen *et al.*, 2009). Estes microrganismos produzem 3 hemolisinas (α , β , δ), sendo apenas a α e a β verdadeiras toxinas. A maioria dos isolados de *S. aureus* em vacas produz toxinas β ou uma combinação entre toxinas α e β . A toxina β causa lesões nas células epiteliais da glândula mamária, aumenta os danos causados pela toxina α e aumenta a aderência do *St. aureus* às células epiteliais da glândula mamária e a sua proliferação. A maioria das estirpes produz coagulase que converte fibrinogénio em fibrina, o que favorece a invasão dos tecidos (Radostits *et al.*, 2000). A existência deste tecido cicatricial permite que a bactéria se “esconda”, o que faz com que o medicamento/antibiótico usado no seu tratamento não se distribua por todo o quarto afetado e consequentemente reduza a eficiência do tratamento. A possibilidade do microrganismo também poder penetrar nos macrófagos e outras células polimorfonucleadas (PMN) e aí permanecer faz com que, consequentemente, este agente se encontre “protegido” da acção dos antibióticos que por norma simplesmente permanecem em circulação e não entram nestas células. Por outro lado, este microrganismo é produtor de penicilinases, o que faz com que seja resistente a antibióticos beta-lactâmicos, inibindo a sua acção (Teixeira *et al.*, 2008). Também a leucocidina produzida por *S. aureus* pode inactivar os neutrófilos (Radostits *et al.*, 2000). De qualquer maneira, é importante salientar que existem estirpes de *St. aureus* que são mais resistentes à fagocitose e à morte, do que outros (Aslantas *et al.*, 2007).

Esta bactéria pode ser considerada uma ameaça de potencial biológico, porque pode ser produzida em grandes quantidades, as suas toxinas são relativamente estáveis à inativação química e física, e pequenas quantidades de toxinas (<1mg) poderem desencadear sintomas de choque tóxico (Srinivasan *et al.*, 2006).

Podem ser considerados fatores de risco para o desenvolvimento desta infecção: a inadequada desinfecção pós-ordenha, má higiene dos tetos, transmissão através das tetinas, desenho e funcionamento inadequado da sala de ordenha, más condições de limpeza da sala de ordenha, introdução de vacas infetadas na exploração, inadequado diagnóstico e tratamento dos casos clínicos, inadequado tratamento das vacas secas e má política de refugo (Biggs, 2009).

Em situações agudas, o animal pode apresentar, sinais de toxémia, para além dos quartos quentes e inchados. Em situações crónicas, o tecido pode encontrar-se gangrenoso e frio devido à supressão de circulação sanguínea provocada pela necrose dos tecidos. Uma vaca com mamite bastante exuberante e persistente deverá ser refugada (Teixeira *et al.*, 2008).

Este microrganismo danifica o sistema de ductos, originando infeções pustulosas profundas no tecido glandular, seguidas de formação de abscessos. Numa primeira fase da infeção os danos glandulares são mínimos e reversíveis, no entanto, os abscessos podem libertar *S. aureus* que iniciam o processo de infeção noutras zonas da glândula mamária com formação de mais abscessos e alterações irreversíveis nos tecidos glandulares, que podem, por sua vez, ser detetados por palpação do úbere ou por observação visual (Biggs, 2009). Para além das alterações no tecido glandular origina também elevadas quebras na produção de leite podendo atingir a ordem dos 50% (Lévesque, 2004).

Segundo Smith (2002), a maior parte das infeções são crónicas, subclínicas com episódios esporádicos de exacerbação, havendo fibrose e formação de abscessos. A situação hiperaguda surge frequentemente no início da lactação apresentando gangrena no úbere. Na fase mais tardia de lactação ou no período seco surgem situações crónicas ou agudas sem envolvimento sistémico (Blood *et al.*, 1991). O estadio inicial é sempre agudo, havendo proliferação de bactérias nos ductos colectores e também nos alvéolos. Na forma aguda os pequenos ductos são bloqueados por fibrina afetando toda a área obstruída (Blood *et al.*, 1991). A forma crónica é mais branda. Existem menos focos de inflamação, restringindo-se ao epitélio dos ductos que é substituído posteriormente por tecido conjuntivo, conduzindo à consequente atrofia (Blood *et al.*, 1991) detetada por palpação (Rebhun, 1999). As infeções subclínicas são caracterizadas por sinais in específicos tais como leite anormal com coágulos que se podem observar no teste californiano de mamites e na placa de fundo escuro (Rebhun, 1999). O leite pode tornar-se numa secreção semelhante a pús (Smith, 2002) que com o decorrer da doença se pode tornar espesso (Rebhun, 1999; Smith, 2002). Nas exacerbações da doença a vaca encontra-se febril com o úbere quente e doloroso (Rebhun, 1999). Em vacas no

período pós-parto é comum a mamite gangrenosa (Rebhun, 1999). Esta forma tem origem nas alfa-toxinas produzidas por este agente patogénico (Smith, 2002), sendo altamente fatal (Blood *et al.*, 1991). Os sinais de toxemia agravam-se quando surge a gangrena (Rebhun, 1999), acompanhada de febre elevada (41°C/ 42°C), taquicardia, anorexia, depressão profunda e atonia ruminal (Blood *et al.*, 1991). O quarto afetado está duro e a coloração rosácea é substituída por vermelho e posteriormente azul. Neste estadio, torna-se evidente a separação do tecido afetado e do tecido são, bem como, a presença de líquido sanguinolento na secreção láctea e, por vezes, pode surgir gás em algumas glândulas (Rebhun, 1999). A contagem de células somáticas no leite aumenta por um longo período de tempo (Taponen *et al.*, 2009).

A excreção intermitente de *St. aureus* ocorre porque esta bactéria pode resistir à fagocitose dos neutrófilos, permanecendo no interior das células epiteliais até que ocorra a sua morte. Isto tem um grande impacto na sensibilidade de culturas bacteriológicas, uma vez que nos casos subclínicos é bastante frequente existirem falsos negativos. Para se aumentar a sensibilidade na deteção de *St. aureus* é aconselhável fazer uma pré-cultura e repetir a amostragem (Biggs, 2009).

Normalmente a gravidade da infeção relaciona-se com a fase da lactação em que as vacas se encontram quando são infetadas. Os casos crónicos resultam de infeções no período seco ou no fim da lactação, enquanto nos casos mais graves, em que há reações sistémicas e morte, a infeção ocorre no início da lactação (Archbald, 1999). Existe uma taxa relativamente alta de vacas que após estarem infetadas com *St. aureus* não recuperam das mamites tornando-se estas crónicas e incuráveis. *St. aureus* é o microrganismo mais comumente isolado em vacas no período de secagem (Teixeira *et al.*, 2008).

É muito difícil conseguir a erradicação deste agente etiológico, mas pode reduzir-se o seu aparecimento através de medidas de controlo, tais como: uma boa desinfeção dos tetos, tratamento das vacas secas, adequado diagnóstico e tratamento, bem como refugio das vacas infetadas.

2.2.2. *Staphylococcus coagulase negativo*

O papel dos SCN como agente etiológico de mastites não está completamente esclarecido segundo Piepers *et al.* (2009), no entanto, para uma parte significativa dos autores os SCN são uma importante causa de mastites (Almeida *et al.*, 2001; Taponen *et al.*, 2009).

Apesar das divergências dos vários autores, este grupo de microrganismos possui um papel importante na génese das mamites bovinas (Vliegheer, 2009).

Segundo Taponen *et al.* (2009) e Pyörälä *et al.*, (2009), foram já isolados mais de 10 espécies, sendo as mais frequentemente encontradas *St. chromogenes* e *St. simulans*, e ocasionalmente *St. epidermicus* e *St. hyicus* (Pyörälä *et al.*, 2009). São agentes comensais, normalmente encontram-se na pele dos tetos e do úbere, sendo que algumas espécies têm a capacidade de colonizar o canal teto.

Tal como *St. aureus*, estes agentes podem estar localizados em zonas extra-mamárias (Taponen *et al.*, 2009). Ao contrário de *St. aureus*, os SCN originam normalmente mamites subclínicas ou clínicas moderadas (Pyörälä *et al.*, 2009; Taponen *et al.*, 2009).

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

Os sinais clínicos incluem ligeiro aumento da glândula mamária, algumas alterações no aspeto do leite e a contagem de células somáticas é geralmente baixa (Taponen *et al.*, 2009; Zadoks *et al.*, 2009). A elevação da temperatura e as mamites tóxicas são sinais pouco comuns (Taponen *et al.*, 2009).

Segundo Vlieger (2009), os SCN são a causa primária de infeções intramamárias em vacas primíparas. A prevalência das mamites por SCN é mais frequente nas primíparas do que nas múltíparas (Pyörälä *et al.*, 2009), no entanto, parece existir afinidade dos agentes para uma faixa etária específica. *S. chromogenes* é a espécie mais encontrada em vacas primíparas e a infeção ocorre no início da lactação, enquanto *S. simulans* é a espécie mais comumente isolada em animais com várias lactações e a infeção acontece usualmente numa fase tardia da lactação (Pyörälä *et al.*, 2009). É a bactéria mais prevalente em vacarias de alta produção, em que já se instaurou um plano de controlo com agentes maiores (Lévesque, 2004).

A prevalência deste agente etiológico de mastites é muito variado, num estudo norueguês a prevalência foi de 16%, o valor aumentou para 50% noutra estudo na Finlândia (Pyörälä *et al.*, 2009).

A prevenção deste tipo de mastite passa por uma correta desinfecção dos tetos após a ordenha e antibioterapia das vacas secas. Deve ainda existir prevenção ambiental, pois pode constituir reservatório para os SCN (Pyörälä *et al.*, 2009).

2.2.3. *Streptococcus agalactiae*

Strep. agalactiae é o agente etiológico que maiores perdas provoca na produção de leite das vacas afetadas. É uma bactéria Gram +, não hemolítica, catalase negativa (Teixeira *et al.*, 2008).

Características fenotípicas: crescimento em placas de agar sangue e agar Edwards; colônias com 1-2mm, lisas, translúcidas e convexas; beta-hemolíticos, cocos Gram-positivos e catalase negativos, e pertencentes ao grupo B Lancefield (Biggs, 2009).

Strep. agalactiae é uma bactéria obrigatória da glândula mamária e é extremamente contagioso, tal que, uma simples infecção de uma vaca pode contagiar metade do efetivo (Lévesque, 2004).

Este microrganismo, como o próprio nome indica, provoca a diminuição da produção de leite. O seu único reservatório é o leite dos quartos afetados. No entanto, podemos encontrá-lo em superfícies que tiveram contacto recente com o leite, tais como tetinas, panos de ordenha e mãos do ordenhador (Teixeira *et al.*, 2008). Estes agentes infetam a cisterna e sistema de ductos da glândula mamária, onde causam inflamação. Inicialmente há uma rápida multiplicação de *Strep. agalactiae* nos ductos galactóforos, seguida da passagem da bactéria para os vasos linfáticos e linfonodos supramamários. Nesta fase vários neutrófilos migram para os ductos da glândula mamária e a acumulação de detritos bacterianos intensifica a resposta inflamatória, o que resulta na destruição do tecido glandular e conseqüentemente diminui a produção de leite, podendo levar mesmo à agalaxia (Radostits *et al.*, 2000).

A virulência das diferentes estirpes de *Strep. agalactiae* deve-se à sua capacidade de aderirem ao tecido da glândula mamária, e o mecanismo usado para penetrar o canal do teto é mais influenciado pelo diâmetro do que pela extensão do canal (Radostits *et al.*, 2000).

Normalmente causam mastites subclínicas com surtos de mastites clínicas periódicas (Lévesque, 2004).

A taxa de disseminação deste microrganismo é extremamente elevada. Estas bactérias apresentam-se em grande número no leite infetado e, uma só vaca infetada pode elevar a CCS no tanque em mais de 100.000 bactérias por ml. A dificuldade no combate a este agente não está particularmente na sua resistência e capacidade de se “esconder” aos antibióticos (é sensível a uma grande variedade de antibióticos), mas sim na dificuldade no controlo da sua rápida disseminação. As infeções que sejam incorretamente tratadas poderão desenvolver cronicidade o que acrescentará uma dificuldade no seu combate (Teixeira *et al.*, 2008).

Strep. agalactiae é o agente menos frequentemente isolado quando se cumprem todas as boas práticas de ordenha (Lombard *et al.*, 2008), uma vez que a sua sobrevivência no ambiente é rara. A transmissão ocorre principalmente através das tetinas contaminadas, das mãos dos ordenhadores ou dos panos de limpeza dos tetos (Biggs, 2009).

Strep. agalactiae raramente causa mastites severas, no entanto, a longo prazo pode ocorrer fibrose no quarto afetado e este deixar de ser produtivo nas lactações seguintes (Archbald, 1999). De qualquer maneira, uma ordenha incompleta ou a não utilização de *pós-dipping* após a ordenha pode aumentar a severidade de mastites causadas por este agente (Radostits *et al.*, 2000). Normalmente apenas é afetado um quarto, mas não é raro aparecerem vários quartos afetados numa vaca, principalmente se *Strep. agalactiae* for endêmico na vacaria há vários anos (Biggs, 2009).

A maioria das vacas infetadas não apresenta sinais clínicos característicos, mas é comum observarem-se elevadas CCS e uma diminuição na produção de leite nas mastites subclínicas (Lévesque, 2004). Em alguns casos as mastites subclínicas evoluem para mastites clínicas e aí há uma grande subida na CCS, sendo característico destas infeções a excreção intermitente do agente (Biggs, 2009).

Este é o agente contra o qual os antibióticos apresentam maior eficácia durante a lactação (80- 90%) e durante o período seco. Geralmente são muito sensíveis à penicilina. Quando a infeção se encontra estabelecida há algum tempo, a taxa de cura é mais baixa. De qualquer forma este é um agente que se consegue erradicar completamente de uma vacaria, principalmente se o tratamento de secagem for feito por rotina, tendo-se tornado cada vez menos comum (Lévesque, 2004). No entanto, deve ter-se em atenção ao facto da infeção se espalhar muito rapidamente, e se apenas se tratarem as vacas no período seco, irá ocorrer reinfeção durante a lactação na sala de ordenha. Por isso, existem várias abordagens possíveis a este problema: por um lado, podem tratar-se todas as vacas (em lactação e secas) e todos os quartos simultaneamente com antibióticos, podem-se identificar e tratar apenas as vacas infetadas ou então confiar totalmente nas boas práticas de manejo para controlar e, eventualmente, erradicar *Strep. agalactiae* (Biggs, 2009).

2.2.4. *Streptococcus uberis*

Strep. uberis é uma bactéria Gram+ é um agente ambiental muito associado às camas dos animais e à sua má higiene e desinfeção. Pode ser isolado em vários locais do animal, no entanto, em situações normais, poucas vezes atinge a glândula mamária. Foi sugerido que este

microrganismo, não constitui uma única entidade, mas sim um conjunto de microrganismos que deverá ser sujeito a nova classificação. Esta diferenciação teve em conta os vários graus de resistência que estes organismos apresentam à fagocitose por parte das células do sistema imunitário (Teixeira *et al.*, 2008).

Características fenotípicas: crescimento em agar sangue, agar Edwards e meio de McConkey; colónias de 1-2 mm, lisas, translúcidas e convexas; normalmente são não hemolíticas ou parcialmente alfa-hemolíticas; cocos Gram-positivos e catalase-negativos (Biggs, 2009).

Este microrganismo é bastante resistente a baixas temperaturas e, para além de ser encontrado nas camas, também tem sido isolado no solo, boca, vulva, tetos, pele do abdómen e fezes das vacas (Tyler & Cullor, 2008). Algumas vacas estão permanentemente colonizadas com *Strep. uberis* e eliminam um grande número de microrganismos pelas fezes, o que pode estar associado à grande quantidade existente nas camas de palha onde este tipo de mastites existe (Radostits *et al.*, 2000). O número de microrganismos existentes nas camas varia muito com o tipo de material orgânico usado, sendo muito menor nas camas de serradura do que nas camas de palha. O facto das maternidades usarem na sua maioria camas de palha pode ser um fator de risco para as mastites no início da lactação (Radostits *et al.*, 2000).

Atualmente, *Strep. uberis* é o agente mais comum de infeções intra-mamárias que ocorrem no período seco, verificando-se os casos clínicos no início da lactação (Radostits *et al.*, 2000). No entanto, este agente pode causar mastites clínicas ou subclínicas com aumento na CCS (Pullinger *et al.*, 2006).

As mastites causadas por *Strep. uberis* dão origem a quartos edemaciados, quentes e rígidos. O animal pode apresentar temperatura elevada durante 24 horas (Blowey, 1999). No entanto, as mamites provocadas por este agente não são tão exuberantes como as provocadas por *E. coli* (Teixeira *et al.*, 2008). Segundo Radostits *et al.* (2000), alguns serótipos de *Strep. uberis* são capazes de resistir à fagocitose dos neutrófilos.

A capacidade de uma estirpe de *Strep. uberis* catabolizar proteínas, como a caseína, para libertar aminoácidos para a sua nutrição, permite uma grande vantagem na sua sobrevivência, de tal forma que se multiplica exponencialmente e é mais dificilmente eliminado apenas com a ordenha (Biggs, 2009).

Quando várias vacas de uma vacaria são infetadas por diferentes estirpes significa que a infeção tem um carácter ambiental, enquanto nas vacarias onde só é encontrada uma estirpe

de *Strep. uberis* significa que este tem um carácter contagioso (Zadock & Schukken, 2003). As estirpes ambientais afetam sobretudo as vacas no período seco ou novilhas, enquanto as estirpes contagiosas afetam sobretudo as vacas em lactação (Biggs, 2009).

Os fatores de virulência utilizados por esta espécie de *Streptococcus* incluem as proteínas de matriz extracelular e uma nova proteína designada de SUAM (*Streptococcus uberis* *adhesion molecule*) que permite a ligação do mesmo à lactoferrina (proteína existente no leite) (Oliver *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2007). A existência de cápsula não está relacionada com a patogenicidade da estirpe (Pullinger *et al.*, 2006).

A maioria dos casos responde bem à antibioterapia com penicilina, no entanto tem havido um aumento recente de casos crónicos, em que o tratamento é ineficaz (Biggs, 2009).

A implementação de pré-dipping, pós-dipping, tratamento de vacas secas e tratamento ou refugo de vacas infetadas é normalmente eficaz no controlo de mastites contagiosas e previne surtos das mesmas (Zadoks & Schukken, 2003).

2.2.5. *Streptococcus dysgalactiae*

Strep. dysgalactiae é uma bactéria Gram+, hemolítica e catalase negativa. Em muitos aspetos é semelhante a *St. aureus* e *Strep. agalactiae*. No entanto, tem algumas particularidades como a característica de sobreviver perfeitamente tanto na glândula mamária como no ambiente do estábulo classificando-se, muitas vezes, como agente simultaneamente ambiental e contagioso.

Caraterísticas fenotípicas: são esféricos ou ovóides de 0,8 a 1 µm de diâmetro, anaeróbios facultativos, imóveis e alguns com cápsulas. Crescem em agar sangue e em agar Edwards, formando colónias com 1 a 2 mm, regulares, translúcidas e convexas. Estas colónias são duras, não viscosas e empurram-se através do agar. Regra geral, são alfa-hemolíticas, catalase negativos, Gram-positivos e pertencentes ao grupo C de Lancefield (Biggs, 2009).

Esta bactéria é encontrada no ambiente e pode permanecer nele durante um longo período (Tyler & Cullor, 2002), tendo sido isolada da boca, das amígdalas e vagina das vacas (Radostits *et al.*, 2000). É um microrganismo estando presente nas amígdalas, faz que os animais ao lamberem os tetos os infetem. Por esta razão, talvez se explique o facto de ser uma causa comum de mamites em novilhas e vacas secas (Teixeira *et al.*, 2008).

Strep. dysgalactiae está associado a um mau estado de saúde dos tetos, sendo frequentemente isolado em tetos gretados ou com feridas (Biggs, 2009).

Este agente transmite-se majoritariamente pelo contato dos tetos com as fezes, solo ou camas contaminadas e quando a preparação dos tetos para a ordenha é deficiente (Biggs, 2009). Esta bactéria é encontrada no ambiente e aí se mantém por um longo período de tempo (Tyler *et al.*, 2008).

Como fatores de risco podem-se considerar: o mau funcionamento da máquina de ordenha que leva a danos nos tetos, más condições dos tetos, danos físicos nos tetos e tratamento inadequado no período seco (Biggs, 2009).

Existem diferentes serótipos e cada um tem diversos factores anti-fagocíticos, nos quais estão incluídos a proteína M-like, α 2-macroglobulinas, cápsula e fibronectina. Os factores de virulência incluem a hialuronidase e a fibrinolisinina (Radostits *et al.*, 2000).

Os casos clínicos de *Strep. dysgalactiae* tendem a ser esporádicos e relativamente fáceis de tratar. Normalmente é mais frequente no início da lactação, devido a infeção durante o período seco e tendem a durar menos de um mês (Lévesque, 2004). No entanto, algumas infeções podem tornar-se persistentes, o que resultará num aumento da CCS. Nestas infeções pode ocorrer a transmissão por contágio (Biggs, 2009). Clinicamente, caracteriza-se com uma evolução aguda, com anoréxia e piréxia, além de sinais locais, bem como, anomalias no leite (Blood *et al.*, 1991). *Strep. dysgalactiae* também pode ser isolado nos casos de mastites de Verão, juntamente com as outras bactérias que originam esta mastite (Biggs, 2009).

Segundo Lévesque (2004), apesar de em alguns casos ocorrer a cura espontânea é aconselhável o tratamento com antibióticos nos casos clínicos. O tratamento durante o período seco é normalmente eficaz e previne novas infeções no início da secagem.

2.2.6. *Corynebacterium bovis*

C. bovis pode ser um agente frequentemente isolado no leite, uma vez que vive no canal do teto (Biggs, 2009). A prevalência deste agente patogénico a nível mundial apresenta valores semelhantes, rondando os 20 a 30% (Huxley *et al.*, 2003). Este agente é contagioso, mas a gravidade da infeção é moderada, pelo que tem pouco impacto na CCS e na taxa de mastites clínicas (Lévesque, 2004). Surge normalmente associado a vacas que não foram alvo de uma correta terapia e prevenção durante o período de secagem (Teixeira *et al.*, 2008).

C. bovis é um bacilo Gram positivo, não formador de esporos que pode ser aeróbio ou anaeróbio facultativo. Esta bactéria é a mais frequentemente isolada na glândula mamária do seu género (Crespo *et al.*, 2005; Huxley *et al.*, 2003; Watts *et al.*, 2000).

Alguns estudos têm demonstrado que esta bactéria pode ter algum efeito de proteção contra os agentes “maiores”, provavelmente devido à inibição por competitividade, a efeitos antagonistas ou à produção de substâncias antimicrobianas (como bacteriocina) (Biggs, 2009).

Quando é isolado *C. bovis* no leite do tanque, deve ter-se em conta que pode ser indicativo da falta de desinfecção do teto ou ineficácia do produto (Tyler & Cullor, 2008). É um microrganismo muito lipofílico, o que significa que cresce bem na gordura encontrada no leite. É importante referir que as colónias em agar sangue são bastante pequenas (pulverulentas) e demoram cerca de 48 horas a crescer. Por isso, quando existe um crescimento significativo de outros agentes patogénicos na mesma placa, facilmente esta bactéria pode passar despercebida (Biggs, 2009).

Medidas preventivas, como uma eficiente desinfecção do teto e um correto tratamento das vacas no período seco, são normalmente suficientes para controlar esta infeção (Lévesque, 2004).

2.2.7. Coliformes

Os coliformes são microrganismos com impacto em mamites. São considerados agentes patogénicos ambientais e oportunistas (Smith, 2002). Os coliformes que causam mastites incluem *E. coli*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter* e *Citrobacter* (Blowey, 1999).

Normalmente, a infeção ocorre após o parto ou no início da lactação (Lévesque, 2004). A incidência de mamites por coliformes aumenta no período de Verão, uma vez que, o calor e humidade favorecem o seu desenvolvimento (Rebhun, 1999).

Características fenotípicas: estes agentes crescem em agar sangue ou em meios seletivos como McConkey, formam colónias cinzentas claras de 2-5mm, podem ser hemolíticos ou não, Gram negativos. Os fermentadores de lactose (*Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter aerogenes* e *Citrobacter*) dão origem a colónias cor-de-rosa em placas de meio McConkey (Biggs, 2009).

A infeção subclínica é comum, regra geral de curta duração. No caso de mastites clínicas, a maioria das vezes a gravidade é moderada a grave, existindo, no entanto, casos bastante graves (Lévesque, 2004).

As vacas que se encontram em vacarias com baixa incidência de infeções intramamárias por *Streptococcus* e *Staphylococcus*, bem como as vacas com baixas CCS estão mais predispostas a mastites por coliformes. Outro fator de risco para desenvolvimento de mastites por coliformes é o síndrome de vaca caída, devido à elevada contaminação a que o

úbere e os tetos estão sujeitos por contacto prolongado com as fezes e com o material da cama (Radostits *et al.* 2000). Ao contrário dos agentes patogénicos contagiosos, a transmissão de vaca para vaca tem pouca relevância (Smith, 2002).

As mastites clínicas são caracterizadas pelo aparecimento de leite aguado e amarelado (Figura 1). As bactérias produzem endotoxinas que rapidamente levam ao aparecimento de sinais de inflamação do úbere, acompanhado por febre e sinais sistémicos de toxémia. Frequentemente, o número de bactérias é bastante baixo ou mesmo ausente, quando ocorrem os sinais clínicos de mastite, pelo que pode haver ausência de crescimento de bactérias nas culturas microbiológicas (Lévesque, 2004).

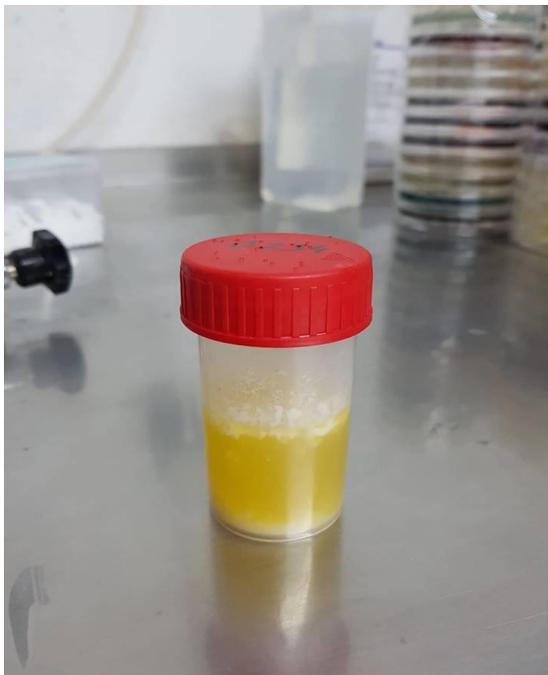


Figura 1 - Aspeto macroscópico de mastite por coliformes (AJAM). Foi isolado no laboratório da AJAM (*E. coli*).

Os coliformes podem levar à perda do quarto e à própria morte da vaca em apenas 6 a 8 horas após o aparecimento dos sinais clínicos. No entanto, na maioria das vezes, a vaca recupera em 24 a 48 horas. Em alguns casos, a infeção por estes microrganismos também se pode tornar crónica, com alguns períodos de expressão clínica (Lévesque, 2004).

Uma vez que pode ser a endotoxina que está a causar os sinais clínicos, os antibióticos podem ser pouco eficazes nestes casos (Lévesque, 2004).

É importante ter em conta que normalmente um elevado nível de coliformes no leite do tanque não é causado por mastites, mas sim por contaminação do leite com fezes ou chorume, devido a uma má higiene na ordenha (Lévesque, 2004).

Os procedimentos sanitários antes da ordenha são muito importantes para a prevenção deste tipo de mastites (Smith, 2002).

2.2.7.1. *Escherichia coli*

Este coliforme é uma bactéria Gram negativa que pode ser hemolítica, ou não, dependendo da estirpe (Teixeira *et al.*, 2008) e fermentadora da lactose (Zadoks *et al.*, 2009). *E. coli* é um dos principais agentes patogénicos em todo o mundo (Zadoks *et al.*, 2009). É o agente ambiental mais prevalente nas explorações e, por isso mesmo, o agente ambiental que mais provoca mastites (Biggs, 2009).

Encontra-se bastante disseminado no ambiente, em especial nas fezes, sobretudo em explorações onde os cuidados de higiene e limpeza não são os adequados. A humidade elevada contribui para o seu desenvolvimento e infeção durante o período seco (Teixeira *et al.*, 2008). Uma má ventilação e sobrelotação animal podem aumentar a prevalência deste agente, o que resultará numa incidência de novas mastites (Biggs, 2009).

E. coli penetra no canal do teto mas não se fixa às suas paredes e daí talvez se explique a raridade da cronicidade deste tipo de mastites devido à sua fácil eliminação no leite (Teixeira *et al.*, 2008).

Normalmente, as infeções por *E. coli* são consideradas infeções oportunistas e de curta duração. Os fatores de virulência associados aos diferentes serótipos de *E. coli* incluem as adesinas, as toxinas, a parede celular, a cápsula e a resistência ao sistema imunitário (Güler and Gündüz, 2007).

Na maioria das vezes, a reação inflamatória é local e restringe-se ao quarto ou quartos afetados com aumento local de temperatura, rubor e uma produção de leite com um aspeto aquoso. No entanto, por vezes, a reação inflamatória pode dar origem a um quadro generalizado provocando uma toxémia através da libertação para a circulação sanguínea de uma endotoxina por lise bacteriana que poderá, em casos hiperagudos e sem tratamento, provocar a morte do animal em poucas horas (Teixeira *et al.*, 2008).



Figura 2 - Mastite por *E. coli* (confirmação laboratorial). O animal já apresentava sinais de toxemia, tendo vindo a falecer.

Nos casos de mastites moderadas por *E. coli*, a infecção é normalmente auto-limitante e, muitos destes casos, nem necessitam de tratamento antimicrobiano (Biggs, 2009). Enquanto umas vacas desenvolvem mastites clínicas, outras apenas apresentam uma pequena resposta inflamatória, com um aumento transitório na CCS (Biggs, 2009).

Têm sido reportados alguns casos de mastite crónica (Schukken *et al.*, 2004), em que as vacas se encontram contaminadas por *E. coli* e eliminam a bactéria sem que haja sinais clínicos aparentes (Biggs, 2009).

As mastites provocadas por *E. coli* podem ocorrer em mais do que um quarto, mas por ser um agente ambiental, é mais frequente afetar os quartos posteriores. O sucesso do tratamento depende da gravidade dos sintomas, da resistência da vaca e da prontidão do tratamento (Biggs, 2009).

2.2.7.2. Klebsiella

Identificada há já bastante tempo como agente de mastites, esta bactéria pertence à família das *Enterobacteriaceae*. Tem sido causa de surtos de mastites, em diferentes países (Ribeiro *et al.*, 2008). As espécies identificadas no leite são *Klebsiella pneumoniae* e *K. oxytoca* (Zadoks and Munoz, 2007).

Em muitos países, *K. pneumoniae* tem sido reportada como causa de mastites clínicas, principalmente nas primeiras duas semanas de lactação, sofrendo a glândula mamária, alterações semelhantes aquelas provocadas por *E. coli* (Ribeiro *et al.*, 2008).

A prevalência deste agente encontra-se, regra geral, associado a camas de serradura, essencialmente quando esta se encontra armazenada em locais húmidos e quentes (Blowey, 1999). No entanto, também se encontra presente na comida, na água e até mesmo nas pernas das vacas e na pele dos tetos (Zadoks *et al.*, 2008). Em alguns surtos tem havido transmissão por contágio (Biggs, 2009).

Segundo um estudo efetuado por Ribeiro *et al.* (2008) no caso de mastites clínicas por *Klebsiella*, a vaca apresenta sinais sistémicos como pirexia (41°C), anorexia, polipneia, estase ruminal, depressão, taquicardia, tremores. Os quartos infetados apresentam-se edemaciados, quentes, dolorosos, com a extremidade dos tetos fria e descorada, e os linfonodos mamários aumentados. Estas mastites hiperagudas ocorrem devido à absorção de endotoxina, levando a sinais graves de toxémia (Henton, 2004).

2.2.8. *Enterococcus* spp.

Estes agentes etiológicos pertencem à flora gastrointestinal normal das vacas, mas podem ser agentes ambientais oportunistas que causam mastites (Metzger, 2008).

As três espécies mais comumente isoladas são *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* e *E. casseliflavus*. Segundo Metzger (2008), o *E. faecium* foi o agente mais isolado na glândula mamária e no material das camas. Para além destas espécies, também já foi isolado *E. gallinarium* no úbere das vacas (Hillerton & Berry, 2003).

Várias espécies são resistentes a vários agentes antimicrobianos (Metzger, 2008), daí a necessidade de manter uma boa higiene nas vacarias, de modo a controlar o aparecimento de mastites por este agente.

2.2.9. *Bacillus* spp.

Este agente é semelhante a bastonetes, são Gram-positivos que podem ser aeróbios estritos ou facultativos (Biggs, 2009). As espécies mais importantes são *Bacillus cereus*, *B. subtilis* e *B. licheniformis* (Blowey, 1999), sendo pouco frequentes. As espécies do género *Bacillus* spp. produzem endósporos que possuem a capacidade de ficar latentes por longos períodos (Biggs, 2009).

Estes agentes contaminam o ambiente e são encontrados no solo, água, pó, ar, fezes, vegetação, feridas e abscessos (Biggs, 2009). Segundo o mesmo autor a infecção ocorre devido ao tratamento intramamário usando cânulas contaminadas ou fazendo uma incorreta desinfecção do teto durante o tratamento (Biggs, 2009).

As mastites clínicas por *B. cereus* causam mastites gangrenosas muito graves, que podem vir a ser fatais (Biggs, 2009). *B. licheniformis* causa mastites moderadas com espessamento crônico do quarto afetado e pode ascender à vagina vindo a provocar endometrite e diminuição da fertilidade (Blowey, 1999).

2.2.10. *Mycoplasma bovis*

Estes micoplasmas não possuem parede celular e têm um tamanho intermédio entre os vírus e as bactérias. São microrganismos de crescimento fastidioso, o método de cultura microbiológica habitual para os outros agentes não é suficiente para isolar este agente.

Uma vaca que apresente sinais recorrentes de mamite subclínica e que os seus resultados de cultura a partir de amostras de leite sejam repetidamente negativos, deverá ser suspeita e sujeita a exame microbiológico para isolamento de micoplasma. São agentes com um grande grau de disseminação e de difícil (ou mesmo impossível) tratamento (Teixeira *et al.*, 2008).

2.3. Fases de infecção da glândula mamária

O desenvolvimento de uma mastite pode ser dividido em três fases: invasão, infecção, inflamação (Teixeira *et al.*, 2008).

2.3.1. Invasão

A fase de invasão corresponde à entrada do microrganismo no canal do teto, que pode ocorrer na ordenha, ou entre ordenhas. Esta fase está assim relacionada com a higiene na ordenha. Este estágio influencia o grau de lesão e o tónus muscular dos esfíncteres, a manutenção da máquina de ordenha e a utilização de substâncias antimicrobianas (Blowey *et al.*, 1999; Teixeira *et al.*, 2008).

2.3.2. Infecção

Durante a fase de infecção o agente multiplica-se no canal ou cisterna do teto, ou na cisterna do úbere. O crescimento da bactéria pode continuar a diferentes ritmos, até atingir os alvéolos galactóforos.

O tipo de bactérias envolvidas determina a capacidade de replicação no leite e a aderência ao epitélio mamário. O número de leucócitos e a presença de substâncias de caráter imunológico são influentes nesta fase (Blowey *et al.*, 1999; Teixeira *et al.*, 2008).

2.3.3. Inflamação

Estádio no qual se manifesta a mamite clínica e se torna evidente o aumento na contagem leucocitária no leite (Piepers *et al.*, 2009).

Nesta fase o organismo inicia uma resposta mais vigorosa, o sistema imunitário comanda esta resposta com a passagem de leucócitos da corrente sanguínea para os alvéolos na tentativa de combater e neutralizar as bactérias invasoras. Os leucócitos aliados ao tecido danificado, proteínas e bactérias começam a formar “farrapos”/grumos por aglomeração entre si. O animal apresenta, nesta altura, sinais de mamite clínica. Os grumos podem bloquear os ductos de leite, provocando uma diminuição ou mesmo cessação total da produção leiteira. O úbere encontra-se inflamado, quente, rígido e doloroso. Toda esta cascata de acontecimentos fisiopatológicos corresponde à fase de inflamação de uma mamite clínica (Teixeira *et al.*, 2008).

As principais alterações no leite provocadas pelas mamites refletem-se na sua cor, varia entre alterações mínimas, imperceptíveis, até leite de coloração sanguinolenta ou amarelada, na presença de grumos (“farrapos”), no aumento de número de leucócitos e no aumento do número de células somáticas que daí provêm (Teixeira *et al.*, 2008).

Das três fases referidas, a prevenção da fase de invasão é aquela que oferece maior potencial para redução da recidiva de mamite, através de um bom manejo e cuidados de higiene (Blowey *et al.*, 1999; Teixeira *et al.*, 2008).

2.4. Classificação clínica das mamites

De acordo com a forma de manifestação da infecção, as mastites podem ser classificadas como sendo clínicas ou subclínicas (Smith, 2002; McDougall *et al.*, 2009).

Sendo esta última, a forma mais prevalente (Figura 3) e que causa maiores perdas económicas, representando de 5% a 25% da produção leiteira (Santos *et al.*, 2007).

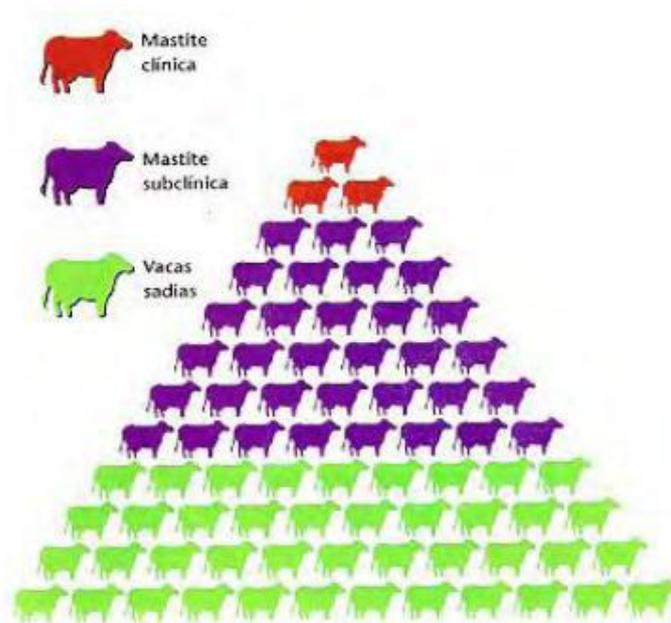


Figura 3 - Representação esquemática da prevalência de mastite clínica e subclínica num rebanho de bovinos de leite (Santos *et al.*, 2007).

2.4.1. Mastite clínica

Na mastite clínica observa-se a presença de sinais evidentes de inflamação, tais como edema, aumento de temperatura, endurecimento e dor da glândula mamária (Ribeiro *et al.*, 2003; McDougall *et al.*, 2009).

Existem diferentes graus de mastites clínicas. Nas mastites subagudas o leite apresenta-se com alterações macroscópicas, observando-se a presença de “farrapos”, continuando o úbere com uma aparência normal. Os “farrapos” não passam de aglomerados de detritos celulares, leucócitos, fibrina e outras proteínas.

Nos casos moderados o úbere apresenta-se visivelmente inflamado (vermelho, duro, aumentado, quente e doloroso). Nas mastites agudas, o leite pode aparecer sanguinolento, aquoso ou seroso e a sua produção diminui bruscamente. Podem estar presentes sinais sistémicos que incluem febre, anorexia, estase ruminal, aumento da pulsação, desidratação e depressão do estado geral do animal. Como a infeção pode provocar uma diminuição dos níveis de cálcio no sangue, a vaca pode apresentar sintomas de hipocalcemia (Lévesque, 2004).

Para o diagnóstico deste tipo de mamites é apenas necessária uma caneca no fundo preto, onde é possível visualizar as alterações macroscópicas do leite (Ribeiro *et al.*, 2003).

Segundo Smith a mamite clínica pode ser aguda, aguda gangrenosa e crónica (Tabela 3) (Smith, 2002).

Tabela 3 - Classificação da mastite clínica (Smith, 2002).

| Classificação clínica | Características |
|-----------------------|--|
| Aguda | Sinais clínicos surgem de repente. Dor, úbere edemaciado por vezes endurecido. Sinais sistémicos podem ser ligeiros ou graves: anorexia, depressão, febre. A secreção láctea pode apresentar flocos, coágulos e aspeto seroso, aquoso, ou purulento. |
| Aguda gangrenosa | Raro. Os sinais clínicos mais comuns são: anorexia, desidratação, depressão, febre, e sinais de toxémia. No estágio inicial da doença glândula mamária apresenta-se vermelha, volumosa e quente. Posteriormente, em poucas horas o úbere fica frio com secreção aquosa e sanguinolenta e apresenta áreas azuladas bem delimitadas. |
| Crónica | Não há exibição de sinais clínicos num longo período de tempo. Periodicamente a secreção láctea contém flocos, coágulos ou fibrina. O úbere pode apresentar formações endurecidas à palpação. |

2.4.2. Mastite subclínica

A mastite subclínica é responsável pelo maior prejuízo económico na exploração leiteira, sem alterações visíveis no úbere ou leite, no entanto, com alterações na composição do leite e presença de organismos patogénicos (Bexiga *et al.*, 2005).

Existe uma pequena inflamação da glândula mamária não observável visualmente, mantendo-se o leite e o quarto afetado com uma aparência normal. No entanto, é possível demonstrar a presença de microrganismos no leite através da cultura microbiológica. As alterações inflamatórias na glândula mamária podem ser detetadas pelo aumento das células somáticas que se verifica devido ao influxo de leucócitos. As mastites subclínicas podem evoluir rapidamente ou lentamente para mastites clínicas, ou podem resolver-se espontaneamente (Lévesque, 2004). Dependendo do tipo de agente, as mastites subclínicas são cerca de 15 a 40 vezes mais frequentes do que as mastites clínicas (Biggs, 2009).

Os agentes patogénicos mais associados com a mamite subclínica são os estafilococos coagulase positivos e negativos, coliformes e estreptococos ambientais (Fox, 2009).

A mamite subclínica pode ser detetada através de exames microbiológicos, métodos químicos indiretos e contagem de células somáticas dos quartos mamários individuais ou do efetivo. O Teste Californiano de Mamites é muito útil para o diagnóstico de mamites subclínicas pois é de rápida execução e pode ser utilizado no campo (Brito *et al.*, 1997)

3. Detecção e diagnóstico de mastites

A deteção e diagnóstico de mastite é importante para acompanhar o desempenho da saúde do úbere (Lam *et al.*, 2009).

O conhecimento dos agentes responsáveis pelas mastites, contagiosos ou ambientais, é fundamental para desenvolver protocolos de tratamentos e para o desenvolvimento de programas de controlo e prevenção.

O diagnóstico precoce de mastites é extremamente importante. Porque as vacas infetadas devem ser ordenhadas em último lugar ou então com tetinas diferentes, de modo a diminuir o risco de contágio. Por outro lado, um tratamento precoce aumenta a probabilidade de cura e também diminui o risco de transmissão da infeção a outros animais. Por último, o leite dos animais infetados deve ser rejeitado, para não contaminar todo o tanque com bactérias, o que poderá trazer um grande prejuízo para os produtores (Blowey, 1999).

3.1. Recolha de amostras de leite mamítico

Frequentemente é necessário identificar os microrganismos que provocam mastite para definir soluções. A colheita de leite pode ser feita nos quatro quartos em conjunto, mas é preferível fazê-la de quartos individuais, embora as amostras individuais possuam um custo mais elevado. Os resultados dessa cultura são importantes para identificar os agentes etiológicos presentes no grupo de animais afetado, recomendar tratamentos e decidir o refugio de vacas individuais (Philpot & Nickerson, 2000).

A colheita também pode ser feita no tanque, onde as bactérias presentes no leite podem ter origem nas glândulas mamárias infetadas, nas superfícies dos tetos e dos úberes e em outras fontes do ambiente. A colheita de leite do tanque faz-se principalmente quando queremos identificar agentes contagiosos na exploração, como *St. aureus* e *Strep. agalactiae*.

O número de microrganismos encontrados varia com o número de vacas infetadas, com a produção de leite e com a gravidade da infecção. Estes testes têm uma sensibilidade baixa, mas uma especificidade elevada (Radostits et al., 2007).

A colheita de amostras pode também ser feita para realização de antibiograma, permitindo averiguar qual o agente antimicrobiano mais indicado ao tratamento (Philpot & Nickerson, 2000).

A colheita das amostras deve ser realizada de modo a reduzir ao máximo a contaminação exterior. Quando se colhem amostras dos quartos afetados, deverão descartar-se os primeiros jatos de leite e a ponta do teto deve ser limpa com algodão e álcool a 70%, o tubo de colheita deve ser estéril e deve ser imediatamente refrigerada. A amostra pode ser refrigerada até 24 horas ou congelada até um mês antes da cultura (Philpot & Nickerson, 2000). Deve realizar-se a recolha com o maior cuidado e com assepsia, de forma a não contaminar a amostra recolhida (Teixeira *et al.*, 2008).

É importante identificar cada frasco em concordância com a vaca a que corresponde (Teixeira *et al.*, 2008).

As amostras deverão ser enviadas ao laboratório o mais rapidamente possível, com as indicações da exploração, requerente e testes/culturas a serem efetuados (identificação dos agentes, CCS e antibiograma). No entanto, e caso não seja possível enviar as amostras no mesmo dia para o laboratório, estas poderão/deverão ser congeladas para posterior envio. Esta possibilidade é particularmente útil, no sentido que permite ao produtor, após ter recebido formação adequada, realizar a recolha das amostras daqueles animais que no momento da recolha geral não se encontravam em lactação por estarem secos e, que de acordo com o parto, se vão juntando ao efetivo em lactação, sendo necessário também o conhecimento do seu estado de infecção em relação às mamites (Teixeira *et al.*, 2008).

3.2. Cultura e isolamento de microrganismos provenientes de leite mamítico

A cultura bacteriana é comumente usada como diagnóstico para resolver problemas de mastites, uma vez que o conhecimento do agente causador da infecção pode ser muito útil na prevenção da transmissão destas infeções (Lam *et al.*, 2009), bem como facilitar o tratamento da mesma. Para além de ser um recurso importante para a caracterização epidemiológica da exploração.

Num estudo elaborado por Lam *et al.* (2009) verificou-se que aproximadamente 40% das infecções intramamárias nunca expressaram sinais clínicos, dependendo essencialmente do agente causador de mastite.

Tabela 4 - Número de infecções intramamárias em 7 explorações durante 20 meses (Lam *et al.*, 2009).

| | Nº de infecções intramamárias | Nº de infecções intra-mamárias com sinais clínicos | % de infecções intramamárias com sinais clínicos |
|------------------------------------|-------------------------------|--|--|
| <i>E. coli</i> | 105 | 99 | 94% |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 171 | 62 | 36% |
| <i>Streptococcus. dysgalactiae</i> | 80 | 52 | 65% |
| <i>Streptococcus uberis</i> | 79 | 49 | 62% |

Este método é recomendado quando se compra uma vaca, antes do tratamento de uma mastite clínica, quando existem mastites subclínicas, rotineiramente nas vacas recém-paridas e para resolver problemas particulares numa vacaria (Lévesque, 2004).

As amostras de leite são posteriormente encaminhadas para o laboratório submetidas a exames microbiológicos, sendo semeadas em agar MacConkey e agar Sangue (sangue de carneiro 5%) e incubadas a 37°C por 24 - 48 horas. As colónias são submetidas a provas bioquímicas e de diferenciação bacteriana quando em crescimento no ágar MacConkey. As leituras das placas são realizadas às 24 e 48 horas com a descrição da macromorfologia. A micromorfologia é executada através de esfregaço em lâmina e corada pela Técnica de Gram. A identificação microbiológica é realizada com base nas características morfológicas, bioquímicas e tintoriais de acordo com Quinn *et al.* (2005).

É necessário ter em atenção que podem surgir culturas falsas positivas e culturas falsas negativas. As falsas positivas ocorrem essencialmente quando há contaminação do leite por uma má higiene da ordenha. As falsas negativas podem ocorrer devido a um mau acondicionamento da amostra, à presença de leucócitos e/ou os antibióticos no leite que podem destruir ou inibir o crescimento dos agentes patogénicos e, alguns microrganismos, como *Mycoplasma*, requerem meios especiais de cultura, enquanto outros, como é o caso de *E. coli*, podem já não se encontrar no leite quando é colhida a amostra (Lévesque, 2004).

Como raramente coexistem mais de três microrganismos na mesma infeção, quando são isolados mais de 3 agentes está convencionado que a amostra é considerada contaminada (Biggs, 2009). As amostras que apresentaram menos de 5 colónias diferentes ou ausência total de colónias foram classificadas como sendo sem crescimento (Pantoja *et al.*, 2009).

Ao longo de vários anos, têm sido testados vários métodos para aumentar a taxa de identificação de microrganismos patogênicos, entre os quais estão incluídos a incubação de uma pré-cultura, congelamento da pré-cultura, aumento dos volumes de inoculação de uma placa e PCR (Lam *et al.*, 2009).

A cultura bacteriana tem como objetivo a identificação do agente etiológico e posterior prova de sensibilidade a antibióticos (antibiograma).

3.3. Antibiograma

Técnica destinada à determinação da sensibilidade bacteriana *in vitro* frente a agentes antimicrobianos, também conhecido por Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA).

Sempre que não se conhece a sensibilidade de um microrganismo que contribui para um processo infeccioso, devem ser realizados testes, especialmente quando se trata de espécies capazes de desenvolver resistência aos agentes antimicrobianos normalmente usados (Pereira, 2011).

Alguns microrganismos são reconhecidamente suscetíveis a certos agentes antimicrobianos e o tratamento empírico é largamente utilizado (Teixeira *et al.*, 2008). Detetar resistência é mais importante do ponto de vista clínico, porque pode saber-se assim a probabilidade de êxito terapêutico (Brito, 2009). Para tal, o antibiograma é um teste que oferece resultados padrões de resistência ou sensibilidade de um agente bacteriano a vários antimicrobianos, e é também muito solicitado no diagnóstico da mastite para auxiliar na escolha do melhor tratamento (Teixeira *et al.*, 2008).

Existem seis métodos que permitem determinar a suscetibilidade dos agentes microbianos a determinados antibióticos: diluição em caldo, diluição em leite, diluição em agar, determinação da concentração mínima bactericida (CMB), determinação da cinética de morte e método de difusão em disco. Os primeiros cinco métodos são quantitativos, enquanto a difusão em disco é um método qualitativo (Constable & Morin, 2003).

O método mais utilizado é por difusão em disco, onde se utilizam discos de papel contendo quantidades conhecidas de antibióticos e que são aplicados em placas inoculadas com o microrganismo testado. O antibiograma realizado desta forma é relativamente barato, tecnicamente direto e confiável se corretamente padronizado (Collins *et al.*, 2004).

A suscetibilidade antimicrobiana pode ser definida qualitativamente de três formas, sendo Sensível (S), que indica que a dose padrão do antibiótico deve ser apropriada para tratar

a infecção pela estirpe bacteriana isolada; Resistente (R), que indica que a infecção causada pela estirpe bacteriana testada não deverá responder ao agente antimicrobiano; e Intermediário (I), onde as estirpes bacterianas são moderadamente suscetíveis ou moderadamente resistentes e indica que a estirpe pode ser inibida por altas doses do antibiótico ou em locais onde o agente antimicrobiano se concentra, como no leite, por exemplo (Collins *et al.*, 2004).

A medição do diâmetro dos halos é normalmente realizada utilizando uma régua milimétrica. Aparentemente trivial, esta tarefa apresenta diversos desafios como sobreposição de halos, formação não homogênea da circunferência, parcial atuação do antimicrobiano, formação de segundo halo e problemas na sementeação do microrganismo, que são interpretados de acordo com a experiência do profissional (Costa, 2014). Este teste realizado previamente ao tratamento, aumenta as possibilidades de recuperação, principalmente em casos que não apresentam melhoria e sugerem problemas de resistência ao antimicrobiano administrado (Teixeira *et al.*, 2008). A automação do antibiograma também permite a avaliação da concentração inibitória mínima (MIC), traduzida como a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento do microrganismo *in vitro*.

4. Tratamento

A primeira abordagem no tratamento da mastite é a aplicação de formas farmacêuticas por via intramamária, contendo um ou mais antimicrobianos, e por vezes eventualmente associados a corticosteroides. A aplicação sistêmica de fármacos justifica-se nos casos de infecções graves, em situações de infecções subclínicas presentes nos outros quartos ou pela melhor difusão do fármaco na presença de coágulos ou micro-abcessos que impeçam a progressão do medicamento por via intramamária (Nunes *et al.*, 2007).

No tratamento de mamites contagiosas (ex., *St. aureus*), o uso de uma associação de antibioterapia por via intramamária com a via parentérica permite a obtenção de bons resultados na cura da vaca. No entanto, os tratamentos devem cingir-se a 3 dias, pois o prolongamento do tratamento ou aplicação tratamentos sucessivos com diferentes princípios ativos, pode desencadear complicações, como infecções por leveduras e outros fungos, de difícil combate. A administração de um fármaco com ação anti-tóxica e anti-inflamatória (ex., flunixin meglumina) pode ser um bom adjuvante no tratamento deste tipo de mamites. As vacas que apresentem recidivas após este tratamento devem ser particularmente analisadas e são candidatas ao refugio (Teixeira *et al.*, 2008).

Quando se trata de uma mamite aguda ambiental a prioridade é a diminuição da inflamação provocada pelos agentes e suas toxinas responsáveis pela destruição do parênquima glandular. O uso de analgésicos com ação anti-inflamatória e antitóxica (ex. flunixin meglumina), a ordenha completa e auxiliada com o recurso fármacos que aumentem a ejeção de leite (ocitocina) e a utilização de pomadas tópicas mamárias de uso dérmico que diminuam a inflamação (substâncias demulcentes) constituem, atualmente, um protocolo e eficaz no combate contra este tipo de mamites. No entanto, nos casos onde há sinais de toxemia é necessário recorrer a antibioterapia. Independentemente de se tratar de uma mamite de origem contagiosa ou ambiental, pode também recorrer-se a fluidoterapia endovenosa com soluções hipertônicas de modo a restabelecer o equilíbrio hídrico, assim como doses elevadas de fármacos com atividade anti-endotóxica, de modo a neutralizar a ação das toxinas (Teixeira *et al.*, 2008).

4.1. Antibioterapia

A escolha do antibiótico deve ter como objetivo a eficácia terapêutica e os benefícios económicos, do ponto de vista da recuperação da produção de leite e eliminação de fontes de infeção (Costa, 2006). Esta escolha deve ser sempre feita pelo veterinário assistente da exploração, que terá em conta os problemas que se encontram na mesma (Blowey, 1999).

O antibiótico ideal seria aquele que permitisse controlar todos os processos infecciosos do úbere e não deixasse resíduos no leite (Costa, 2006). Como não existe, para a escolha do antibiótico deve-se ter em consideração vários fatores como: o espectro de ação do antimicrobiano, a sua capacidade em alcançar e manter a concentração terapêutica efetiva no local de infeção (leite, glândula mamária e sangue), ter um tempo apropriado de tratamento, não provocar efeitos adversos locais ou sistémicos e que não mantenha resíduos durante muito tempo (Constable & Morin, 2003).

Segundo Teixeira *et al.* (2008) os antibióticos mais indicados para o tratamento de mastites são: penicilina, cloxacilina, ampicilina, penetamato de penicilina, gentamicina, nafcilina, cefazolina, cefoperazona e cefquinoma.

Na maioria das vezes, os resultados da cultura bacteriana não chegam em tempo oportuno para a escolha dos antimicrobianos, o seu uso pode ser limitado às mastites por Gam- positivos, consoante as características da infeção (Roberson, 2003).

Streptococcus spp. são normalmente sensíveis à penicilina. No entanto, algumas estirpes que produzem penicilases não são sensíveis à penicilina, pelo que se deve usar penicilinas sintéticas (ex: cloxacilina), combinações de antibióticos (ex: amoxicilina e ácido-clavulânico) ou antibióticos resistentes às penicilases (ex: eritromicina e novobiocina). *E. coli*, *Pseudomonas* e *Klebsiella* são resistentes à penicilina, daí que, para combatê-las, se privilegie o uso de tetraciclina, cefalosporinas, amoxicilinas (Blowey, 1999) e quinolonas (Costa, 2006). É importante cada exploração ter apenas um, ou no máximo dois, protocolos de rotina (Blowey, 1999).

Segundo Biggs (2009), as vantagens da utilização de antibioterapia em casos de mastites são: aumento das hipóteses de sucesso no tratamento, particularmente nas infeções por Gram positivos; diminuição da excreção bacteriana no leite, o que reduz o contágio na vacaria e o aumento na CCS no leite do tanque, bem como os seus impactos económicos; resolução mais rápida dos sinais clínicos e, por isso, retorno mais rápido na produção de leite; melhoria da qualidade de gordura em relação à lactose e caseína; e redução da possibilidade de recidivas. No que toca a desvantagens, o mesmo autor considera: os custos do tratamento e perda de tempo por parte do ordenhador; custos das descargas presentes no leite, o que pode ser particularmente relevante nas vacas de alta produção; risco de contaminação no leite do tanque; teoricamente, risco de aumento das resistências aos antibióticos; ausência de métodos de controlo por parte dos produtores que passam a achar que o antibiótico resolve todos os problemas; e possibilidade de não afetar significativamente infeções especialmente por Gram negativos.

A facilidade com que o fármaco penetra no úbere, a concentração alcançada no seu interior e a persistência do fármaco no tecido mamário, após a administração, são fatores que afetam a ação dos antibióticos (Blowey, 1999).

De um modo geral, os antibióticos devem atuar inicialmente ao nível do tecido mamário e só posteriormente serem absorvidos para a circulação (Teixeira *et al.*, 2008).

Quando a vaca se encontra na fase de lactação é desejável que o fármaco tenha uma persistência curta na glândula, de modo a reduzir a presença de resíduos no leite após o tratamento. Por isso, recomenda-se o uso de um antimicrobiano em veículo aquoso, que permite uma maior difusão no leite. Os tratamentos realizados durante a lactação, sob o ponto de vista custo-benefício, não devem ultrapassar os 5 dias, uma vez que é no intervalo de 3 a 5 dias que ocorrem os maiores índices de cura clínica (Costa, 2006). Para além disso, o prolongamento ou a aplicação de vários tratamentos sucessivos com diferentes

antimicrobianos pode levar ao aparecimento de infecções por leveduras ou fungos, que são de mais difícil combate (Teixeira *et al.*, 2008).

A administração de antimicrobianos por via intramamária deve ter em consideração algumas características consoante a fase de lactação em que se encontra a vaca. Nas vacas em lactação, o fármaco deve ser pouco irritante, ter uma baixa CMI, ter um baixo grau de ligação às proteínas, um baixo grau de ionização no úbere, uma libertação rápida e uma baixa persistência. Nas vacas no período seco, este deve ter uma ação bactericida, não ser irritante, ter alto grau de ligação às proteínas e ser estável (Costa, 2006). No período seco pretende-se que o fármaco tenha uma longa persistência na glândula mamária, pelo que se associa óleo mineral com monoestearato de alumínio a 3% (Costa, 2006).

Segundo Costa (2006), os antimicrobianos com boa difusão quando aplicados por via intramamária são: o penetamato, a ampicilina, a amoxicilina, o novobiocina, a eritromicina e a tilosina. Com difusão moderada são a penicilina G, a cloxacilina e a tetraciclina. Por outro lado, a estreptomicina e a neomicina apresentam muito pouca difusão na glândula mamária.

Uma das principais vantagens do uso de antibioterapia intramamária é a alta concentração que se pode verificar no leite quando se utiliza esta via. Segundo Pyörälä (2009), a concentração de penicilina G no leite é 100-1.000 vezes maior após a administração intramamária comparada com a administração parentérica. As bisnagas para a terapêutica intramamária deve ser introduzidas com bastante cuidado higiénico, de modo a que não haja introdução de bactérias, leveduras ou fungos na glândula mamária. As cânulas utilizadas devem ser curtas, de modo a que penetrem só até ao esfíncter externo para reduzir o risco de entrada de agentes patogénicos (Radostits *et al.*, 2000).

Frequentemente, o tratamento com antibióticos locais é coadjuvado com antibióticos parentéricos, principalmente nos casos de surtos de mastites (Teixeira *et al.*, 2008). O tratamento sistémico deve ser utilizado sempre que há mastites clínicas com sinais sistémicos. O que permite evitar que ocorra bacteriémia e septicémia (Radostits *et al.*, 2000), verificando-se mais rapidamente a normalização da temperatura e da produção de leite (Cuteri *et al.*, 2008). Os antimicrobianos usados por esta via devem atingir facilmente as concentrações ótimas na glândula mamária, sem afetar outros sistemas, como o sistema gastro-intestinal. Para isso, estes fármacos devem ter uma alta lipossolubilidade, baixa percentagem de ligação às proteínas plasmáticas e serem uma base fraca quando se considera o pH ligeiramente ácido do leite normal. Em condições normais, apenas os macrólidos (eritromicina e tilosina), as

tetraciclina, o trimetoprim e as fluoroquinolonas apresentam boa distribuição na glândula mamária (Costa, 2006).

Existem vários fatores que interferem na eficácia de um tratamento com recurso à antibioterapia tais como:

- A presença de exsudado purulento e detritos que bloqueiam os ductos e alvéolos é uma das principais causas, o que faz com que o antibiótico seja incapaz de penetrar no local da infeção, é uma situação frequente nas mastites por *St. aureus*, embora possa ocorrer nas infeções por *Strep. agalactiae* e *Strep. dysgalactiae* (Blowey, 1999);
- Algumas estirpes de *Staphylococcus* e *Strep. uberis* conseguem sobreviver no interior de células, o que os protege contra a ação dos antibióticos (Blowey, 1999);
- As alterações anatomopatológicas que ocorrem em algumas mastites, como é o caso das provocadas por *Arcanobacterium pyogenes*, cuja reação tecidual é tão intensa que pode dificultar o acesso do antimicrobiano ao foco de infeção (Costa, 2006);
- Alguns agentes patogénicos como *Mycoplasma*, *Prototheca*, *Nocardia*, *Pseudomonas* e leveduras não respondem ou respondem pouco a tratamentos com antibióticos (Morin, 2004);
- No tratamento de *Strep. agalactiae* está recomendado fazer-se um protocolo terapêutico radical, denominado por “Blitz”. Este protocolo consiste no tratamento de todo o efetivo, através de antibioterapia intramamária em todos os quartos durante 4 a 5 ordenhas consecutivas, de preferência com penicilina. O impacto económico que este procedimento provoca, devido à não comercialização de leite durante cerca de uma semana (devido ao IS dos fármacos utilizados), faz com que o produtor seja normalmente muito reticente a esta opção (Teixeira *et al.*, 2008).

4.1.1. Antibióticos mais utilizados no controlo de mastites

▪ **Penicilinas:** as penicilinas não se distribuem bem na glândula mamária. A concentração bactericida mínima pode ser obtida com administração parenteral. Quando se usa a via intramamária, recomenda-se uma dose de 11.000 UI/Kg a cada 12 horas. No caso de vacas secas, a penicilina deve ter um veículo de monoestearato de alumínio, na dose de 100.000- 200.000 UI por quarto. O uso de penicilina com novobiocina apresenta excelentes resultados em alguns casos de mastite. A cloxacilina (penicilina sintética) tem sido cada vez mais utilizada, sendo recomendada a dose de 500 mg no período seco. A ampicilina, por sua

vez, apresenta alta difusão na glândula mamária, sendo a dose recomendada de 10 a 20 mg/Kg por via parentérica e 60 a 65 mg/quarto por via intramamária, aplicada 2 vezes ao dia, durante 3 a 5 dias. A ampicilina intramamária pode ser associada a uma penicilina por via parentérica, apresentando uma eficiência de 50% em mastites por *Staphylococcus* e por *Streptococcus* e 40% nas mastites por *Arcanobacterium pyogenes* (Costa, 2006). *Strep. uberis* tem demonstrado ser bastante sensível às penicilinas, apesar de existirem muitos microrganismos resistentes à penicilina G (Hillerton & Berry, 2003). A amoxicilina tem demonstrado ser bastante eficaz no tratamento de mastites por *Strep. agalactiae*, por SCN e por *Streptococcus* spp. (Wilson *et al.*, 1999). Segundo Pyörälä (2009) o penetamato, por ser mais lipofílico que a penicilina G, apresenta uma melhor difusão no leite.

- **Cefalosporinas:** a cefoperazona e o cefalonio, cefalosporinas de 1ª geração, têm uma boa atividade contra bactérias Gram-positivas, mas pouca atividade contra as Gram-negativas, enquanto os fármacos de 3ª geração têm uma moderada atividade contra bactérias Gram-positivas, e uma boa atividade contra as Gram-negativas (Moroni *et al.*, 2006). A cefoperazona, na dose de 250 mg/quarto, apresenta uma eficácia de cerca de 80% nos principais agentes de mastites. Não é irritante e persiste no úbere, em concentrações adequadas, durante 48 horas após a administração por via intramamária. A associação de cefoxazol e penicilina tem apresentado bons resultados, assim como a cefapiridina (dose 500 mg/quarto), o cefacetil e a cefquinona (uma cefalosporina de 4ª geração) (Costa, 2006). Num estudo realizado por Roy *et al.* (2008), a cefapirina demonstrou ser eficaz no tratamento de vacas infetadas por *St. aureus*. A cefquinona tem uma ótima distribuição nos tecidos e uma baixa CMI para as bactérias Gram-negativas, assim como o ceftiofur (cefalosporina de 3ª geração) tem uma excelente atividade contra agentes Gram-negativos (Erskine *et al.*, 2003). Num estudo realizado por Hallberg (2006), a administração de 500 mg de ceftiofur por via intramamária na última ordenha da lactação, foi eficaz na eliminação de infecções intramamárias presentes durante a lactação e na prevenção de novas infecções.

- **Tetraciclinas:** atingem uma boa concentração na glândula mamária quando administrados por via parental. A oxitetraciclina é recomendada como primeira escolha no tratamento de mastites por *Mannheimia haemolytica* e *Aerobacter aerogenes*. As tetraciclinas de longa ação, na dose de 20 mg/Kg, são capazes de manter a concentração ótima durante 72 horas, com um IS de 96 horas. Devido ao seu IS longo, não é recomendado o seu uso durante

a lactação. A doxiciclina tem sido indicada como bastante eficiente nas mastites por *Nocardia* spp. e *Chlamydia*. *Mycoplasma* spp., apesar de apresentar sensibilidade à doxiciclina *in vitro*, na prática esta não se tem apresentado muito eficaz *in vivo* (Costa, 2006).

- **Macrólidos e lincosaminas:** dois grupos de fármacos que apresentam um comportamento farmacocinético semelhante. Estes antibióticos têm uma concentração ótima, equivalente a 3 a 5 vezes à concentração do plasma, ultrapassando por isso os valores de CMI para a maioria dos microrganismos Gram-positivos, alguns anaeróbios e *Nocardia asteroides*. A eritromicina pode ser aplicada por via parentérica ou intramamária. No entanto, quando o pH da glândula mamária aumenta, poderá ser diminuído o aporte por via parenteral. A tilosina tem-se demonstrado efetiva no combate de *Mycoplasma* spp., e quando associada à tetraciclina é usada no tratamento de *Pasteurella* spp. Os valores de CMI da tilosina são relativamente baixos para *Streptococcus* beta-hemolíticos, *St. aureus* e *Corynebacterium* spp., apresentando bons resultados na prática. A pirlimicina tem sido recomendada nas mastites causadas por Gram-positivas e no combate aos microrganismos que resistem à fagocitose, como é o caso de *St. aureus* e *St. epidermidis* (Costa, 2006), sendo capaz de manter a concentração efetiva apenas com a administração de uma dose por dia, mesmo que se efetue a ordenha 3 vezes por dia (Erskine *et al.*, 2003).

- **Polimixinas:** os derivados da polimixina B e colistina podem ser úteis no tratamento de mastites por Gram-negativos, como *E. coli*, *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Pasteurella* spp. e *Proteus* spp. Estes fármacos são considerados de excelência no tratamento de mastites por *E. coli*, não só porque têm uma grande atividade contra este microrganismo, como também porque diminuem os efeitos sistêmicos da endotoxina. A dose recomendada é de 7 mg/Kg por via parenteral e de 200 mg/quarto por via intramamária (Costa, 2006).

Tabela 5 - Agentes antimicrobianos e via de administração mais apropriada para cada agente. Adaptado de Constable *et al.* (2008) e George *et al.* (2008).

| Agente | Antimicrobianos | Via de administração |
|--|--|---------------------------|
| <i>Streptococcus</i> spp. | Penicilina G, cloxacilina, ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas | Intramamária |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | Amoxicilina, penicilina G, cloxacilina, cefalosporina | Intramamária |
| <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | Penicilina G, cloxacilina e cefalosporinas | Intramamária |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Penicilina G, cefalosporinas, cloxacilina, pirlimicina | Intramamária |
| <i>Staphylococcus coagulase</i> negativo | Penicilina G, amoxicilina, cefalosporinas, pirlimicina | Intramamária |
| <i>Streptococcus uberis</i> | Penicilina G, ampicilina, cloxacilina | Intramamária e Parenteral |
| Coliformes | Sulfonamidas, aminoglicosídeos, amoxicilina, tetraciclina, cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, polimixina B, quinolonas | Parenteral |
| <i>Mycoplasma bovis</i> | Tilosina, quinolonas | Parenteral |
| <i>Corynebacterium</i> spp. | Penicilinas | Intramamária |

- **Aminoglicosídeos:** a estreptomicina, a neomicina e a gentamicina têm sido usados isoladamente ou associados a outros antibióticos no tratamento de mastites. Estes fármacos apenas são utilizados por via intramamária; no entanto, o leite reduz a atividade dos aminoglicosídeos, especialmente da neomicina (Costa, 2006). Para além disso, os Aminoglicosídeos apresentam um intervalo de segurança grande, pelo que não devem ser uma escolha frequente (Pyörälä, 2009).

- **Sulfonamidas:** têm um bom espectro de atividade contra os principais agentes patogénicos de mastites, principalmente quando associadas ao trimetoprim (Costa, 2006).

- **Quinolonas:** as fluoroquinolonas são as quinolonas mais frequentemente utilizadas nas mastites, sendo usadas nos casos de mastites clínicas durante a lactação ou subclínicas,

durante o período seco (Costa, 2006). São também úteis nas mastites por coliformes, quando administrados por via parenteral.

4.2. Tratamento no período seco

O tratamento durante o período seco apresenta muitas vantagens: promove a eliminação de infecções presentes no úbere no final da lactação (entre 70 a 90% de eficácia) e reduz a incidência de novas infecções, em cerca de 50 a 75%, particularmente no que diz respeito a *Streptococcus* ambientais (Lévesque, 2004); permite que não haja desperdício de leite; a resposta é muito mais eficaz, uma vez que as doses de antibióticos administradas são normalmente maiores (não há a preocupação da presença de resíduos no leite); podem utilizar-se antibióticos com um tempo de atuação muito maior; permite aumentar a proteção contra “mastites de Verão” e reduz a incidência de mastites clínicas na altura do parto (Biggs, 2009).

É essencial ter cuidados durante esta fase, pois a probabilidade de ocorrerem novas infecções intramamárias durante os primeiros 21 dias do período seco é 6 vezes maior do que a verificada durante a lactação (Hallberg *et al.*, 2006);

O tratamento de secagem deve ser evitado durante as duas últimas semanas antes do parto, devido ao risco de provocar a contaminação do leite com antibióticos. É importante também referir que a resposta dos animais ao tratamento de mastites durante o início do período seco decresce com a idade (Teixeira *et al.*, 2008).

Certos autores têm aconselhado o uso de tratamento a todas as vacas e a todos os quartos afetados, uma vez que existem sempre vacas que funcionam como reservatório de agentes infecciosos, sem que apresentem sinais clínicos (Blowey, 1999; Lévesque, 2004). Por outro lado, outros autores consideram que se deve tratar apenas as vacas infetadas. Uma vez que, se reduzem os custos em tratamentos, a eliminação dos agentes considerados “menores” pode tornar a vaca mais suscetível aos agentes ambientais e, por fim, previne-se a possível emergência de novas resistências bacterianas (Pyörälä, 2002; Radostits *et al.*, 2000).

Nas vacas com mastites por SCN, o tratamento no período seco consegue eliminar entre 80% a 100% das infecções, enquanto apenas 73% podem curar espontaneamente (Sears & McCarthy, 2003).

No caso do *St. aureus* tem-se verificado um grande sucesso no tratamento durante o período seco, para além de também prevenir o aparecimento de novas infecções. O protocolo terapêutico usado nestes casos deve ser efetuado durante 6 a 8 dias, de modo a que se

mantenham os níveis terapêuticos de antibiótico (Sears & McCarthy, 2003). Zafalon *et al.* (2007) realizaram um estudo onde se obteve uma taxa de cura de cerca de 80% no tratamento durante o período seco de vacas com *St. aureus*. Sendo este considerado o agente mais difícil de eliminar, particularmente quando as infecções já são crônicas (Lévesque, 2004).

4.3. Tratamento de novilhas

Uma vez que é durante a primeira lactação que ocorre um maior desenvolvimento do tecido da glândula mamária (Davidson & Staberfeldt, 2007), uma infecção na altura do parto pode ter efeitos adversos no futuro da glândula mamária (Nickerson *et al.*, 1995).

Um estudo efetuado por Borm *et al.* (2006), na América do Norte, demonstrou que 63% das novilhas e 34% dos seus quartos tinham infecções intramamárias no primeiro parto.

Em termos de prevenção, o manejo e a higiene a que as novilhas estão sujeitas são os pontos mais importantes. O uso de antibioterapia intramamária em novilhas antes do parto tem sido sugerido como uma estratégia para redução das mastites ao parto. No entanto, como é considerada uma tarefa complicada e pouco prática, a administração parentérica de tilosina demonstrou ter algum efeito na redução de infecções intramamárias nesta altura (Contreras & Sears, 2008).

Foram efetuados vários estudos: Erskine *et al.* (2003), considera que as infusões intramamárias com antibióticos beta-lactâmicos, 7 a 14 dias antes da data prevista do parto, reduzem a taxa de mastites nestes animais após o parto, enquanto Nickerson *et al.* (1995) consideram que a antibioterapia intramamária realizada mais de 45 dias antes do parto é a que apresenta maior redução do número de mastites ao parto. Por sua vez, Radostits *et al.* (2000) referem que o tratamento de novilhas com cefapirina, 10 a 12 semanas antes do parto, elimina 90% das infecções intramamárias de *St. aureus*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e coliformes.

4.4. Tratamento de suporte

Terapia de suporte, incluindo administração parenteral de fluidos isotónicos, principalmente aqueles que contem glucose, está indicada em casos de lesões extensivas e toxémia grave. Um método que tem sido avaliado como forma de fornecer terapia de fluidos em vacas com mastite grave, especialmente mastite coliforme hiperaguda, tem como base a

administração de soro salino hipertônico seguido do acesso imediato ao bebedouro (Radostitis et al., 2000).

- **Fluidoterapia:** nas mastites agudas, as vacas podem apresentar-se com sinais bastante graves, desenvolvendo choque tóxico, que muitas vezes é acompanhado de diarreia. Nestes casos, os animais apresentam-se desidratados e torna-se fundamental recorrer à fluidoterapia para repor o equilíbrio hidro-electrolítico. Podem ser utilizados soros isotônicos ou hipertônicos (Biggs, 2009). O mais frequente é o uso de 1 a 3 litros de soro salino hipertônico para encorajar a vaca a beber água (Lévesque, 2004).

- **Anti-inflamatórios não esteróides (AINEs):** são fármacos com grandes capacidades anti-inflamatórias, anti-endotóxicas e antipiréticas. Os AINEs têm ainda propriedades analgésicas, que são muitas vezes subestimadas (Biggs, 2009). Para além da sua grande importância na redução dos efeitos da endotoxina nos casos de mastites por *E. coli* ou outros coliformes, ainda favorece a ação de alguns agentes antimicrobianos. O mais utilizado é a flunixin meglumina, na dose de 1,1 mg/Kg, via intramuscular (IM) ou endovenosa (EV). O cetoprofeno (dose de 2 mg/dia por via IM) também tem demonstrado ser útil no tratamento de mastites agudas (Costa, 2006).

- **Corticosteróides:** podem ser utilizados nos estádios iniciais de inflamação, mas não têm grandes efeitos quando a inflamação já está instalada (Biggs, 2009). Têm propriedades anti-inflamatórias, mas podem ter um impacto negativo no sistema imunitário (no caso de uso prolongado), pelo que pode ser contraproducente a sua utilização, para além de poderem provocar o aborto em vacas gestantes (Costa, 2006). Alguns antibióticos de administração intramamária contêm corticosteróides, com o objetivo de reduzirem o efeito irritante do antibiótico ou servirem de anti-inflamatório (Biggs, 2009).

- **Ocitocina:** usada como tratamento adjuvante para a remoção do leite infetado do quarto. Em mastites muito severas, em que o úbere se encontra muito doloroso devido ao bloqueio dos alvéolos e ductos pelo leite, o seu uso apenas poderia exacerbar esse efeito nas células mioepiteliais. No entanto, o uso de altas doses de ocitocina tem demonstrado que alarga as junções entre as células secretoras, o que permite a passagem de mediadores

inflamatórios do sangue para o lúmen da glândula mamária, onde se encontra a maioria das bactérias (Biggs, 2009).

- **Remoção do leite:** a remoção regular do leite infetado do quarto permite a recuperação mais rápida, uma vez que se vai eliminando parte dos agentes microbianos encontrados na glândula mamária (Biggs, 2009), assim como os metabolitos produzidos na decorrência do processo inflamatório e os seus mediadores de inflamação (Costa, 2006). A remoção do leite é fundamental nas mastites por coliformes (Biggs, 2009). Num estudo realizado por Almeida et al. (2005) verificou-se que a utilização de ordenhas múltiplas foi capaz de eliminar a infeção por *Staphylococcus aureus* em metade dos animais infetados. No entanto, este estudo foi realizado a uma pequena amostra de animais.

- **Ungentos ou pomadas tópicos:** o uso de massagem local permite que haja uma chamada de sangue ao local e encoraja os processos de defesa natural, o que poderá ainda ser mais facilitado com a ajuda das pomadas. A sua capacidade irritante provoca a dilatação dos capilares superficiais e aumenta o fluxo de sangue para a pele do úbere (Biggs, 2009).

- **Cálcio:** algumas vacas com mastites tóxicas apresentam hipocalcémia; no entanto, tem sido difícil determinar a sua causa e qual a associação entre mastites e hipocalcemias (Biggs, 2009).

5. Resistência aos agentes antimicrobianos

As preocupações relativas ao impacto da utilização de antimicrobianos em explorações pecuárias são cada vez maiores devido às emergentes resistências (Call *et al.*, 2008).

A antibioterapia não deve ser usada no lugar de outros métodos de controlo e prevenção de doença. Fatores como nutrição, ambiente, higiene, manejo e vacinação devem sempre ser levados em conta (Jackson & Cockcroft, 2007). A diminuição do uso de antibióticos, facilita a obtenção de produtos de origem animal livres de resíduos de antibióticos, bactérias zoonóticas resistentes e bactérias resistentes que possam transferir essa resistência a bactérias do ser humano (Jackson & Cockcroft, 2007).

Questões de saúde pública, nomeadamente a emergência de resistências bacterianas aos antibióticos, determinaram recomendações para a redução e para o uso racional de antibióticos em medicina veterinária (Apifarma, 2004). Os animais de produção podem servir como um reservatório de bactérias resistentes que mais tarde podem vir a afetar o ser humano (Gentilini *et al.*, 2002). Por este motivo, têm sido desenvolvidos sistemas de monitorização de resistências a antimicrobianos em alguns países, como o NARMS (*National Antimicrobial Resistance Monitoring System*) nos EUA (White *et al.*, 2006).

Em certas explorações, as decisões terapêuticas são geralmente empíricas e baseiam-se, infelizmente e na maioria dos casos, nas experiências anteriores de sucesso de tratamentos. Questões de saúde pública, em especial as relacionadas com a presença de resíduos e a disseminação de resistências bacterianas aos antimicrobianos determinaram recomendações no sentido de diminuir gradualmente a utilização destas substâncias ativas em medicina veterinária (WHO, 2001). Assim, a identificação dos agentes etiológicos de infeção e a avaliação do seu perfil de suscetibilidade a antimicrobianos é fundamental para a escolha adequada da terapêutica a instituir.

Sempre que possível, o tratamento com agentes antimicrobianos deve ser selecionado tendo em conta os resultados dos antibiogramas, que consistem em testes que determinam a sensibilidade dos agentes microbianos aos diferentes antibióticos. Este é um aspeto essencial, uma vez que o problema das resistências tem vindo a acentuar-se cada vez mais, devido ao uso indiscriminado e inadequado dos antibióticos (Costa, 2006). O método mais frequentemente utilizado é o da difusão em disco, devido ao seu baixo custo e rapidez. No entanto, este método apresenta algumas limitações (Erskine *et al.*, 2003), uma vez que se trata de um método qualitativo (os resultados são apresentados em: sensível, intermédio e resistente) e mudanças subtis na suscetibilidade podem não ser aparentes (Makovec & Ruegg, 2003). Sabe-se que alguns microrganismos resistentes a determinadas concentrações de antibióticos tornam-se sensíveis quando se aumenta a concentração da dose, normalmente duas a cinco vezes a CMI. No entanto, deve-se ter em atenção o risco de aparecimento de efeitos tóxicos (Costa, 2006).

As resistências antimicrobianas podem ser classificadas como naturais, como é o caso de *St. aureus* às penicilinas, ou adquiridas (Costa, 2006). No caso das resistências adquiridas, estas desenvolvem-se por meio de mutações cromossómicas, embora também os plasmídeos a possam transmitir, pois podem conter genes de resistência e têm a capacidade de se mover

entre bactérias, podendo assim disseminar a resistência entre agentes. (Makovec & Ruegg, 2003).

A resistência aos fármacos beta-lactâmicos inclui a produção de betalactamases e produção de proteínas que têm uma baixa afinidade de ligação às penicilinas, designadas PBP2a (Gentilini *et al.*, 2002).

No caso das tetraciclinas e aminoglicosídeos, devido ao seu largo espectro, estes têm sido usados frequentemente para tratar doenças respiratórias e outras doenças dos bovinos, pelo que se tem vindo a verificar um aumento das resistências a estes fármacos (Moroni *et al.*, 2006).

Streptococcus spp. demonstraram ser suscetíveis à penicilina, ampicilina e cefalosporinas, enquanto *St. aureus* é muitas vezes resistente a antibióticos que podem ser inativados pelas β -lactamases. Por sua vez, os microrganismos Gram-negativos são naturalmente resistentes a vários agentes antimicrobianos, exceto às quinolonas, aos aminoglicosídeos, às sulfamidas e às cefalosporinas (Erskine *et al.* 2003),

Os coliformes são resistentes aos macrólidos em geral, à pirlimicina e à penicilina (Morin, 2004).

Segundo Hillerton & Berry, (2003) tem-se verificado uma grande resistência de *Strep. uberis* à cloxacilina, e enquanto em certos países, a resistência de *St. aureus* às penicilinas têm aumentado, noutros tem vindo a diminuir (Barkema *et al.*, 2006). Um estudo realizado por Leemput e Zadoks (2006) demonstrou que *Strep. uberis* apresenta 21% de resistência à eritromicina.

Segundo um estudo realizado por Corrêa *et al.* (2005), várias espécies de *Staphylococcus* coagulase positivo apresentaram mais frequentemente resistência às sulfonamidas, ampicilinas, penicilinas e lincomicinas. Além disso, praticamente todos os isolados apresentaram resistência a dois ou mais antimicrobianos.

Segundo Sears & McCarthy (2003), a maioria dos SCN são resistentes às sulfamidas-trimetoprim, ampicilina e eritromicina.

As enterobacteriaceas do género *Serratia* são resistentes aos derivados da polimixina B e colistina (Costa, 2006).

Segundo Costa (2006), os agentes microbianos isolados nos casos de mastites têm apresentado poucas resistências às cefalosporinas. Por outro lado, num estudo realizado pelo mesmo em várias regiões de São Paulo e Minas Gerais no Brasil, verificou-se uma grande resistência às sulfonamidas por parte dos agentes patogénicos.

Fármacos de gerações mais recentes, com um maior espectro de ação, surgem como uma alternativa fácil, associada a uma maior probabilidade de sucesso terapêutico. No entanto, a adaptação das estirpes microbianas aos novos fármacos ocorre de uma forma muito rápida; por isso, para evitar que se desenvolvam resistências a estes fármacos, estes nunca deverão ser a primeira escolha terapêutica (Nunes *et al.*, 2007).

A primeira escolha terapêutica deve sempre incluir um antibiótico de largo espectro, como a penicilina G, e só se este não se revelar eficaz é que se deve usar uma cefalosporina de 3ª ou 4ª geração, para combater o aumento das resistências aos antimicrobianos (Pyörälä, 2009).

6. Controlo e prevenção das mastites bovinas

Um programa de controlo e prevenção de mamites deve ser, metódico, criterioso e dinâmico. É importante que seja contínuo no tempo (Teixeira *et al.*, 2008).

O conhecimento técnico-científico aliado ao trabalho de entidades habilitadas e competentes (laboratórios de referências) permite que o veterinário, elo de ligação à realidade de cada exploração, aumente a taxa de sucesso em cada programa. Bons métodos de diagnóstico, uma avaliação global mas ao mesmo tempo particular da exploração leiteira e de todas as atividades e logísticas inerentes a esta, deverão ser pontos comuns em qualquer programa de controlo e prevenção de mamites (Teixeira *et al.*, 2008).

Segundo Philpot e Nickerson (2000) os pontos-chave no controlo e prevenção de mastites são a higiene, a máquina de ordenha, a selagem dos tetos, o tratamento de mastites clínicas e o refugo dos animais irrecuperáveis.

Um programa de controlo e prevenção de mamites de uma exploração, deve iniciar-se sempre pelos mesmos denominadores comuns, os quais o veterinário deverá procurar aceder e efetuar os respetivos registos:

Conhecimento real e objetivo do estado sanitário da exploração;

- ✓ Percentagem de animais infetados e agentes etiológicos presentes;
- ✓ Rotina de ordenha e manejo animal;
- ✓ Hábitos (manejo) gerais da exploração Leiteira. (Teixeira *et al.*, 2008)

Segundo o NIRD (*National Institute for Research in Dairying*), o programa de controlo de mastites deve ser desenvolvido tendo em conta 10 pontos (Radostits *et al.*, 2000):

- 1 – métodos adequados de higiene do úbere e gestão da ordenha;
- 2 – correta instalação, funcionamento e manutenção do equipamento da ordenha;
- 3 – gestão e tratamento das vacas secas;
- 4 – tratamento adequado de mastites durante a lactação;
- 5 – abate das vacas com infeções crónicas;
- 6 – manutenção de um ambiente adequado;
- 7 – manutenção de bons registos;
- 8 – monitorização do estado de saúde do úbere;
- 9 – revisão periódica da gestão da saúde do úbere;
- 10– estabelecimento de metas para o estado de saúde do úbere.

De acordo com Teixeira *et al.* (2008), de uma forma geral, um programa de controlo deve ter como base:

1- Redução da duração da infeção:

- ✓ Tratamento de todos os quartos de todas as vacas com mamites subclínicas imediatamente antes do período seco;
- ✓ Tratamento dos casos clínicos quando ocorrem;
- ✓ Refugo vacas com infeções crónicas.

2- Redução da taxa de disseminação dos microrganismos:

- ✓ Mergulho dos tetos em solução desinfetante antes e após a ordenha (*pré-dipping e pós-dipping*);
- ✓ Verificação do correto funcionamento da máquina de ordenha;
- ✓ Ordenha das vacas infetadas após as restantes.

O refugo de animais com afeções crónicas e incuráveis, uma correta terapia dos animais, da prática de ordenha, da manutenção da máquina de ordenha aliada a uma recria controlada e compra de animais comprovadamente isentos de agentes de mamite, a uma alimentação adequada em quantidade e qualidade de acordo com as necessidades dos animais entre outros fatores, são pontos essenciais no caminho a percorrer (Teixeira *et al.*, 2008).

Cerca de 20% a 30% das infeções da glândula mamária são eliminadas espontaneamente pelo sistema imunitário do animal, tornando-se essencial tomar boas medidas de manejo, alimentação adequada e ausência de stress para reduzir o número de

infecções (Tozzetti *et al.*, 2008), maximizando os mecanismos de defesa natural dos tetos e do úbere (Blowey, 1999).

Um procedimento que tem demonstrado ser de extrema importância no período seco é a selagem dos tetos, após a última ordenha e após a administração dos antibióticos intramamários, é normalmente realizada através da administração do selante que fecha o canal do teto à entrada de novos agentes. Este método é particularmente eficaz durante as primeiras três semanas após a instilação, o que coincide com o período mais suscetível a novas infecções (Teixeira *et al.*, 2008), reduzindo a incidência de novas infecções durante o período seco e reduzindo a CCS e os casos de mastites clínicas na lactação subsequente (Leslie, 2004; Seegers *et al.*, 2008). Uma vez que este método não elimina nenhuma infecção, só deve ser utilizado nos animais que comprovadamente não estão infetados (Hillerton & Berry, 2005).

Existem vacinas contra os agentes responsáveis por mastites, mas esta questão tem-se revelado problemática. Um dos problemas é o elevado número de agentes patogénicos e a sua heterogeneidade e outro é o facto de as imunoglobulinas em circulação só entrarem no úbere depois de se desenvolver uma mastite (Pyörälä, 2002). Contudo, na ausência de um programa de controlo de mastites e na presença de grandes resistências aos agentes antimicrobianos, a vacinação contra alguns dos agentes patogénicos parece ser a melhor escolha para reduzir as perdas causadas pelas mastites (Yousaf *et al.*, 2009).

As vacinas contra os coliformes não reduzem o número de infecções, mas reduzem a severidade dos sinais clínicos. Segundo Lévesque (2004), o uso de vacinas contra coliformes é economicamente compensador quando a incidência de mastites por este agente é superior a 2%.

A maioria das vacinas contra *Staphylococcus* foram direcionadas para a redução de novas infecções intramamárias em novilhas, através do uso de bacterinas associadas ou não a toxóide, de modo a dar uma boa proteção cruzada. Tanto os adjuvantes como as toxinas contribuem para melhorar a resposta imunitária e reduzir a severidade das infecções (Sears & McCarthy, 2003), verificando-se efetivamente uma diminuição na prevalência e incidência de mastites por *St. aureus* (Yousaf *et al.*, 2009). No entanto, nas vacarias com grandes problemas com *Staphylococcus* spp., o uso de vacinas de rebanho pode ser recomendado (Haynes, 2001).

Das tradicionais explorações leiteiras até às modernas “empresas de produção de leite”, onde se pretendem implementar os mais recentes projetos de HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point*), o combate às mamites e a sua erradicação serão sempre alvo de

destaque quer pelas suas implicações na saúde pública quer pelas suas implicações económicas (Teixeira *et al.*, 2008).

A presença de registos numa exploração constitui uma peça importante, tanto para o seu funcionamento diário, como para a tomada de decisões de uma forma fundamentada sobre a situação da exploração, face a objetivos definidos. Existem diversos programas informáticos de gestão de explorações, mas exigem tempo e dedicação por parte do produtor para manter os dados sempre atualizados. Ao contrário dos registos manuais que são fáceis de implementar e utilizar. Num programa de qualidade de leite, um bom sistema de registos é aquele que, para cada caso de mastite clínica, identifica a vaca afetada, a data de ocorrência, os dias de lactação, os quartos afetados, os dias de tratamento e qual o protocolo efetuado, os dias em que não se aproveitou o leite devido ao intervalo de segurança, a quantidade de leite descartado e a o agente responsável pelo episódio de mastite (Radostits, 2007).

II. Estudo laboratorial

1. Objetivos

O presente trabalho teve como principais objetivos (1) a determinação da prevalência dos agentes etiológicos (bacterianos) em mastites bovinas por um período alargado de tempo e (2) as proporções relativas de sensibilidade aos antimicrobianos testados de explorações leiteiras da ilha de S. Miguel (Açores).

2. Material e métodos

O presente estudo foi realizado utilizando dados correspondentes ao período entre Março de 2015 e Junho de 2017 (estudo retrospectivo), e entre Janeiro e Março de 2018 (estudo prospetivo) provenientes de 73 explorações da ilha de São Miguel na área de influência da AJAM/CJA. As amostras eram colhidas pelo veterinário assistente ou pelo produtor e entregues no laboratório da associação. A colheita teve procedência de um ou mais quartos de vacas afetadas por mamite clínica ou subclínica.

2.1. Amostras de leite

As amostras de leite provenientes de vacas com mastite clínica ou subclínica (teste californiano para mastite positivo) foram colhidas em frascos esterilizados individuais, de acordo com os procedimentos recomendados pelo National Mastitis Council (1987). Os frascos (até 50 ml) contendo as amostras foram encaminhados o mais rapidamente possível (normalmente até 24 h após colheita), sob refrigeração, ao laboratório onde eram processados até às 24 horas seguintes.

A colheita de leite foi realizada em um ou mais tetos, apesar de as recomendações apontarem no sentido de recolher amostras individuais de cada teto permitindo assim identificar quais os tetos afetados. No entanto, e por questões económicas (as amostras individuais têm um custo mais elevado), optou-se pela colheita em conjunto (Reyher e Dohoo, 2011), uma vez que considerámos no presente estudo o úbere/animal como unidade e não cada quarto.

A colheita das amostras de leite foi feita de modo a reduzir ao máximo a contaminação exterior, utilizando frascos estéreis. A ponta dos tetos foi previamente limpa com uma compressa de álcool a 70%, após a limpeza normal a que todos os tetos são submetidos antes da ordenha. Os primeiros 2 ou 3 jatos de leite foram descartados, uma vez que as células e bactérias que apresentam apenas refletem a contaminação do canal do teto, e não do leite da cisterna do teto e/ou úbere (Radostits *et al.*, 2007).

As amostras de leite foram colhidas no campo pelo produtor ou pelo Médico veterinário ao detetarem animais com suspeita de mamite subclínica ou clínica, ou foram entregues ao técnico do laboratório da AJAM/CJA após a sua colheita. O leite é sempre colhido para frascos estéreis e devidamente identificados com o nome do produtor, nº da marca auricular e data. Foram entregues o mais rápido possível no laboratório. Quando não é possível, os frascos foram refrigerados (4°C) até que fosse possível a entrega no laboratório.

2.2. Cultura bacteriana

De cada amostra retirou-se 10 µl de leite, com uma ansa de repicagem calibrada e esterilizada, semeados logo de seguida em agar Columbia +5% de sangue de carneiro (placa COS) de acordo com as instruções do fabricante (BioMérieux SA®, France). Na placa de Petri faz-se a identificação onde se coloca o nome do proprietário, identificação do animal e a data em que foi realizada a amostra. As placas foram divididas em 3 partes, ou seja são feitos isolamentos de 3 amostras diferentes na mesma placa, por motivos económicos (Figura 4).



Figura 4 - placa de Petri com 3 amostras diferentes, após período de incubação, apresentando crescimento bacteriano (AJAM/ CJA).

Após inocular os microrganismos, as placas foram incubadas na temperatura adequada para o procedimento, 37 °C, com leituras efetuadas às 24 e 48h.

Após a incubação procedia-se à contagem do número de colónias desenvolvidas. Quando existiam 4 ou mais colónias diferentes, a amostra era considerada como contaminada. Quando não se observava crescimento de colónias ou menos de 5 colónias no meio de Columbia + 5% de sangue de carneiro (BioMérieux SA ®), o resultado era considerado negativo (sem crescimento) (CLSI, 2008).

Considerou-se o agente prevalente, aquele em que se observou maior n.º de unidades formadoras de colónias, sendo os restantes classificados como secundários.

A identificação das colónias foi feita com base na morfologia, tipo de hemólise, coloração de Gram. A caracterização bioquímica incluiu testes de catalase, coagulase, oxidase, CAMP, esculina e manitol. Meios de cultura seletivos como agar MacConkey (Gram negativos). As espécies bacterianas ou o género foram confirmados usando testes API® Biomérieux (Gp Mini API®, Gn Mini API®, API® Staph, API® rapid Strep).

2.3. Antibiograma

A avaliação da suscetibilidade dos isolados aos agentes antimicrobianos foi determinada pela técnica de difusão em placas de agar Mueller-Hinton.

De acordo com a metodologia descrita por Bauer *et al.* (1966), cinco colónias com morfologias semelhantes e identificadas pelas características morfotintoriais, foram colhidas com auxílio de uma ansa de inoculação e transferidas para um tubo de ensaio contendo 4 ml de solução fisiológica 9%, comparando com o tubo de 0,5 na escala de Mc Farland com concentração aproximada de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colónias (UFC)/mL. Dez minutos após o ajuste de suspensão bacteriana, foi introduzida uma ansa comprimida contra a parede do tubo a fim de retirar o excesso do inóculo, que foi semeado de forma homogénea em três direções diferentes por toda a superfície da placa de Petri em meio ágar Müller-Hinton.

Segundo a técnica de difusão em discos padronizada pelo NCCLS (2012a), foram testados os seguintes discos antimicrobianos: amoxicilina-ácido clavulânico (AMC) 20 µg + 10 µg (Thermo Scientific-Oxoid, England); ampicilina (AM/ AMP) 2 µg (Bio-Rad, France); cefquinoma (CEQ) 30 µg (Thermo Scientifi-Oxoid); cefoperazona (CFP) 75µg (Thermo Scientifi-Oxoid); cefalexina + canamicina (CFX) 15µg + 30µg (Ubro Red, Boehringer Ingelheim, UK); cefalexina (CN/ CXN) 30 µg (Bio-Rad); cefazolina (KZ/ CZN) 30 µg (Bio-Rad); danofloxacin (DFX) 5 µg (Mast Diagnost, France); lincomicina (LN) 15 µg (Bio-Rad);

penicilina (P/ PG) 6 µg (Bio-Rad); penicilina 10 IU + estreptomicina (MAM - Mamyzin L) Mast Diagnost; espiramicina (SP/ SPN) 100 µg (Bio-Rad), trimetropim-sulfametoxazol (TS/ STX) 1.25 µg + 23.75 µg (Bio-Rad), colocados equidistantes, e com o auxílio de uma pinça estéril pressionados levemente na superfície do ágar para uniformizar o contato.

As placas de Petri foram incubadas invertidas a 35°C por 18-24-36 horas, para o desenvolvimento da cultura (Figura 5). Por fim, realizaram-se três leituras de acordo com o diâmetro do halo de inibição, que foram medidos em milímetros com auxílio de uma régua na parte de trás da placa de Petri invertida, com base nas medidas estabelecidas pela NCCLS (2012b) e classificados como sensíveis, intermediários ou resistentes aos agentes antimicrobianos testados.



Figura 5 - Resultado de antibiograma após incubação das placas (AJAM/ CJA).

Para cada isolado foram utilizados quatro a oito discos antimicrobianos diferentes e as placas foram divididas em duas partes (foram realizados dois testes de sensibilidade a antimicrobianos na mesma placa). A seleção dos discos foi feita de acordo com o registo das explorações. Esse procedimento laboratorial foi realizado devido à minimização de custos e para maximizar a oportunidade de detetar os antimicrobianos com maior sensibilidade, permitindo o tratamento da mastite. Foram utilizados no total de 725 discos antimicrobianos.

No estudo retrospectivo, foram somente recolhidos os dados respeitantes aos isolamentos bacterianos. No estudo prospetivo, avaliou-se também a sensibilidade dos isolados aos antibióticos testados, sendo o registo da classificação sensível, intermédio e resistente (CLSI, 2008). Os isolados bacterianos foram classificados como multirresistentes aos antibióticos, quando se observou resistência a três ou mais classes de antibióticos.

3. Resultados e discussão

3.1. Estudo 1

3.1.1. Proporção de microrganismos observados entre Março de 2015 e Junho de 2017

Das 1669 amostras de leite mamático foram obtidos 2100 isolamentos de culturas, entre Março de 2015 e Junho de 2017. Na tabela 6 e Figura 7 encontram-se discriminadas as diferentes proporções relativas.

Tabela 6 - Proporção de microrganismos em mastites observados entre Março de 2015 e Junho de 2017

| Microrganismo | % | N | Upper 95% | Lower 95% | N.º de amostras só com o agente |
|--|----------|-----|-----------|-----------|---------------------------------|
| <i>E. coli</i> | 42,42061 | 708 | 44,7941 | 40,04712 | 441 |
| <i>Streptococcus uberis</i> | 24,50569 | 409 | 26,57134 | 22,44005 | 233 |
| <i>Enterococcus</i> | 17,25584 | 288 | 19,07053 | 15,44115 | 159 |
| <i>Staphylococcus coagulase negativo</i> | 11,26423 | 188 | 12,78256 | 9,7459 | 74 |
| <i>Streptococcus spp.</i> | 11,02457 | 184 | 12,52868 | 9,52045 | 117 |
| <i>Corynebacterium</i> | 4,43379 | 74 | 5,42236 | 3,44523 | 25 |
| <i>Staphylococcus spp.</i> | 3,89455 | 65 | 4,82366 | 2,96544 | 42 |
| <i>Enterobacter</i> | 3,83463 | 64 | 4,75686 | 2,91241 | 44 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 2,63631 | 44 | 3,40573 | 1,86689 | 34 |
| <i>Streptococcus dysgalactidae</i> | 1,4979 | 25 | 2,08125 | 0,91455 | 19 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | 1,37807 | 23 | 1,93794 | 0,8182 | 19 |
| <i>Micoplasma</i> | 0,65908 | 11 | 1,04767 | 0,27048 | 7 |
| <i>Bacillus spp.</i> | 0,47933 | 8 | 0,81102 | 0,14763 | 1 |
| <i>Alcaligenes</i> | 0,23966 | 4 | 0,47449 | 0 | 1 |
| <i>Klebsiella</i> | 0,17975 | 3 | 0,38317 | 0 | 2 |
| <i>Pseudomonas</i> | 0,11983 | 2 | 0,28598 | 0 | 2 |

No estudo 1, o agente mais frequentemente isolado foi *E. coli*, 42,4% (n=708), seguindo-se *Str. uberis*, 24,5% (n=409), *Enterococcus spp.*, 17,2% (n=288), SCN, 11,3% (n=188), *Streptococcus spp.*, 11% (n=184). Estes foram os agentes mais prevalentes apresentando uma percentagem significativa.

Os principais agentes contagiosos, *St. aureus*, *Strep. dysgalactiae* e *Strep. agalactiae*, apresentaram uma baixa proporção (2,6%, 1,5% e 1,4%, respetivamente) comparando com

outros estudos (Izak et al., 2007; Bexiga et al., 2005; Riekerink et al., 2008 e Albornoz et al. 2008).

O facto de *Strep. agalactiae* apresentar uma baixa proporção relativa pode ser um indício de que se cumprem boas práticas de ordenha, uma vez que este agente é um bactéria colonizadora obrigatória da glândula mamária e a sua sobrevivência no ambiente é rara. Segundo Zadoks e Fitzpatrick (2009) este agente encontra-se erradicado em vários países da Europa Ocidental que aplicam programas de controlo de mastites. No entanto, os resultados do nosso estudo não são compatíveis com o estudo realizado em Portugal (Bexiga et al., 2005), podendo os nossos resultados estarem mascarados por elevadas prevalências de microrganismos ambientais.



Gráfico 1 - Proporção relativa de microrganismos patogénicos em mastites observados entre Março de 2015 e Junho de 2017.

No presente estudo verificou-se discrepâncias em relação a outros estudos relativamente ao agente *E. coli*. Este microrganismo apenas foi isolado no estudo de Riekerink et al. (2008), enquanto noutros estudos não tem sido isolado (Albornoz et al.

(2008), Brechbuehl *et al.* (2008), Izak *et al.* (2007), Bexiga *et al.* (2005), Pitkälä *et al.* (2004), Lévesque (2004)), o que sugere uma elevada contaminação ambiental no nosso estudo. *E. coli* encontra-se bastante disseminada no ambiente, em especial nas fezes, sobretudo em explorações onde os cuidados de higiene e limpeza não são os adequados. A humidade elevada contribui para ao seu desenvolvimento e infeção durante o período seco (Teixeira *et al.*, 2008).

Tabela 7 - Prevalências e frequências de agentes patogénicos causadores de mastites em diferentes estudos.

| | Estudo atual (Açores) | Riekerink <i>et al.</i> (2008) Canadá | Albornoz <i>et al.</i> (2008) Uruguai | Brechbuehl <i>et al.</i> (2008) Suíça | Izak <i>et al.</i> (2007) Arg. | Bexiga <i>et al.</i> (2005) Portugal | Pitkälä <i>et al.</i> (2004) Filândia | Lévesque (2004) NY e Pensilv. |
|-----------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| <i>E. coli</i> | 34 * (42,4) # | 8,4 (17,6) | - | - | - | - | - | - |
| <i>Streptococcus uberis</i> | 19 (24,5) | 6,3 (13,3) | - | - | 4 (11,9) | 7,4 | 0,7 (1,9) | - |
| <i>Enterococcus spp.</i> | 14 (17,3) | 2,2 (4,7) | - | - | - | - | 0,4 (1,2) | - |
| SCN | 9 (11,3) | 5,1 (10,7) | 2 (3,9) | 27,5 | 9,7 (28,9) | 18,1 | 16,6 (49,6) | 27,5 |
| <i>Streptococcus spp.</i> | 9 (11) | 2,1 (4,4) | 15 (35,5) | 6 | - | 7,4 | 0,07 (0,2) | 6,0 |
| <i>Corynebacterium spp.</i> | 4 (4,4) | 0,2 (0,4) | - | 18,9 | 5 (15) | 12,4 | 11,5 (34,4) | 18,9 |
| <i>Staphylococcus spp.</i> | 3 (3,9) | 0,1 (0,3) | - | - | - | - | - | - |
| <i>Staph aureus</i> | 2 (2,6) | 10,3 (21,7) | 22 (52) | 1,6 | 8,2 (24,5) | 7,8 | 3,4 (10,2) | 1,6 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | 1 (1,4) | 0,1 (0,3) | 3 (6,6) | 0,2 | 1,6 (4,8) | 13,9 | 0,02 (0,07) | 0,2 |
| <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | 1 (1,5) | 4 (8,4) | - | - | 2 (6,0) | 2,8 | 0,05 (0,1) | - |
| <i>Coliformes</i> | | 5,5 (11,5) | - | 0,2 | 3 (9,0) | 7,9 | 0,1 (0,4) | 0,2 |
| <i>Bacillus spp.</i> | 0 (0,5) | 1,1 (2,2) | - | 0,9 | - | 17,2 | - | 0,9 |
| Culturas negativas | | 43,9 | 56,7 | 44,7 | 66,5 | 23,5 | 62,4 | 51,5 |

* valores correspondem à prevalência dos agentes # valores correspondem à frequência dos agentes
NY – New York; Pensilv. – Pensilvânia; Arg. – Argentina; SCN – *Staphylococcus coagulase negativo*

Quanto a *Corynebacterium* spp., a sua prevalência pode ser considerada normal, uma vez que coloniza no canal do teto (Biggs, 2009). O isolamento deste agente pode ser indicativo da falta de desinfecção do teto no pós-dipping ou ineficácia do produto usado (Tyler & Cullor, 2008). No entanto, no nosso estudo a sua prevalência não é muito significativa. *Strep. uberis* e *Streptococcus* spp. também são considerados agentes ambientais e apresentam maior prevalência em relação aos restantes estudos (Tabela 7), mais uma vez tornando evidente que a contaminação ambiental nos rebanhos leiteiros na ilha do Açores é o principal fator predisponente para o aparecimento de mastites, é necessário ter mais cuidados de higiene e implementar medidas preventivas.

Em relação aos SCN, o nosso estudo apresenta uma baixa prevalência em relação à maioria dos estudos apresentados (Tabela 7) (Brechtbuehl *et al.* 2008; Izak *et al.* 2007; Bexiga *et al.* 2005; Pitkälä *et al.*, 2004, Levésque, 2004) o que pode significar uma correta desinfecção dos tetos após a ordenha, (uma vez que são agentes comensais, capacidade de colonizar o canal teto) e antibioterapia das vacas secas (Pyörälä *et al.*, 2009).

3.2. Estudo 2

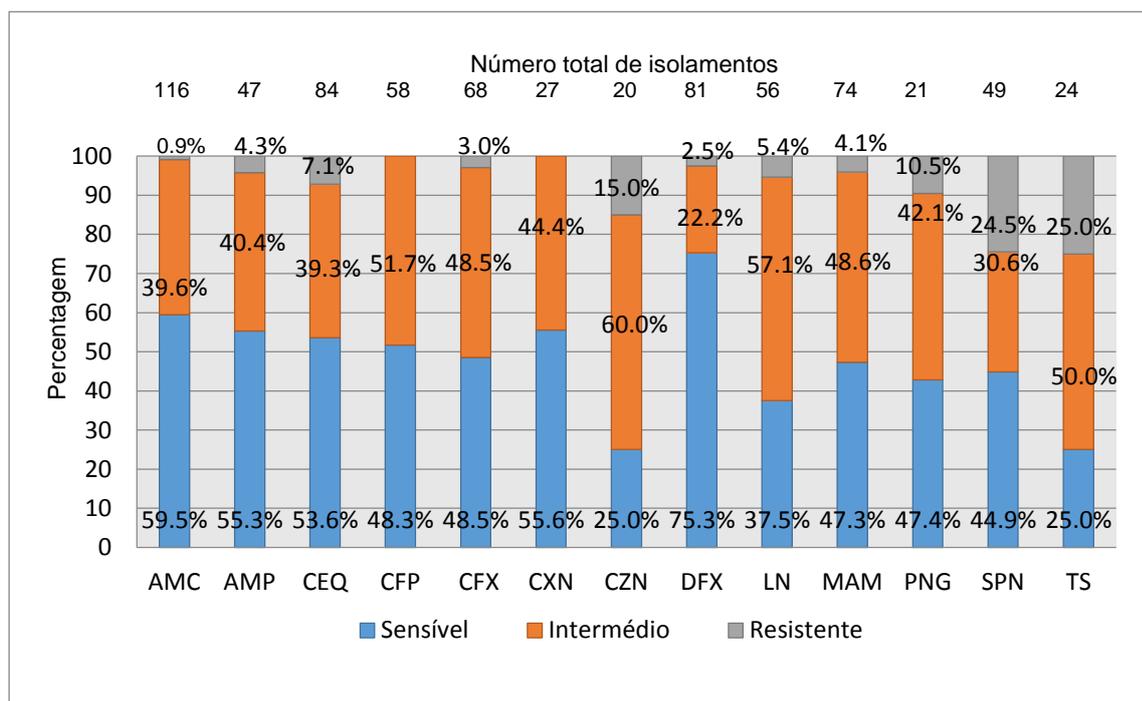
Resultados

As proporções relativas dos agentes patogénicos isolados nas amostras de leite são 38,9% (n=56) para *E. coli*, 20,1% (n=29) para *Strep. uberis*, 17,4% (n=25) para SCN, 6,2% (n=9) para *Streptococcus* spp., 6,2% (n=9) para *Enterococcus* spp., 3,5% (n=5) para *Staphylococcus* spp., 3,5% (n=5) para *Corynebacterium* spp., e 4,5% (n=6) para os restantes isolados (*Micrococcus* spp., n=2; *Bacillus* spp., n=1; *Klebsiella* spp., n=1; *S. aureus*, n=1; *Strep. dysgalactiae*, n=1).

Dos 144 isolados, 8,4% (n=12) foram sensíveis a todos os discos testados, 76,4% (n=110) apresentaram sensibilidade intermédia a pelo menos um disco e 15,3% (n=22) foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano. No geral as proporções de sensibilidade alta, sensibilidade intermédia e resistência, considerando todos os discos testados (n=725), foram de 52,0% (n = 377), 42,2% (n = 306) e 5,8% (n = 42), respetivamente.

As maiores proporções de atividade antimicrobiana foram observadas em discos de danofloxacina (DFX) (75,3%), seguidas por amoxicilina-ácido clavulânico (AMC) (59,5%),

cefalexina (CXN) (55,6%), ampicilina (AMP) (55,3%) e cefquinoma (CEQ) (53,6%). Inversamente, a menor atividade antimicrobiana foi observada em cefazolina (CZN) e trimetropim-sulfametoxazol (TS) (25% cada). Uma alta proporção de resistência foi observada para TS (25,0%) e espiramicina (SPN) (24,5%), seguida por CZN (15,0%) e penicilina (PNG) (10,5%). A proporção para cada antimicrobiano é relatada no Gráfico 2.



AMC: amoxicilina – ácido clavulânico; AMP: ampicilina; CEQ: cefquinoma; CFP: cefoperazona; CFX: cefalexina-canamicina; CXN: cefalexina; CZN: cefazolina; DFX: danofloxacina; LN: lincomicina; MAM: penicilina-estreptomicina; PNG: penicilina; SPN: espiramicina; TS: trimetropim-sulfametoxazol.

Gráfico 2 - Percentagem de sensibilidade alta, intermédia e resistência, de acordo com cada antimicrobiano.

O perfil de sensibilidade para os três principais agentes isolados, *E. coli*, *Strep. uberis* e SCN é relatada na Tabela 8. Para os isolados de *E. coli*, uma proporção moderada (> 50%) a alta (> 75%) de sensibilidade foi observada em 4 dos 13 antimicrobianos testados: DFX (87,5%), CXN (62,5%), CEQ (62,2%) e AMC (54,2%). Para os isolados de *Strep. uberis*, essa proporção foi observada em 5 dos 13 antimicrobianos testados: AMP (77,8%), DFX (66,7%), SPN (61,5%), penicilina-estreptomicina (MAM) (56,3%) e AMC (54,6%). Para o SCN, 7 dos 13 antimicrobianos testados demonstraram essa proporção: cefalexina-canamicina (CFX)

(80%), AMC (75%), SPN (72,7%), lincomicina (LN) (71,3%), DFX (66,7%), MAM (58,3%), CEQ (53,3%).

Tabela 8 - Perfil de sensibilidade de *E. coli*, *Strep. uberis* e *Streptococcus* coagulase negativo (SCN).

| Antimicrobiano | <i>E. coli</i> (56 isolados) | | | <i>Strep. uberis</i> (29 isolados) | | | SCN (25 isolados) | | |
|----------------|---------------------------------|-------------------|-----------------|---------------------------------------|------------------|-----------------|----------------------|------------------|----------------|
| | S % | I % | R % | S % | I % | R % | S % | I % | R % |
| AMC | 54,2 (26/48) | 45,8 (22/48) | 0 | 54,6 (12/22) | 40,9 (9/22) | 4,5 (1/22) | 75,0 (15/20) | 25,0 (5/20) | 0 |
| AMP | 46,7 (7/15) | 46,7 (7/15) | 6,6 (1/15) | 77,8 (8/9) | 11,1 (1/9) | 11,1 (1/9) | 45,5 (5/11) | 54,5 (6/11) | 0 |
| CEQ | 62,2 (23/37) | 35,1 (13/37) | 2,7 (1/37) | 25,0 (4/16) | 53,3 (9/16) | 18,7 (3/16) | 53,3 (8/15) | 40,0 (6/15) | 6,7 (1/15) |
| CFP | 42,9 (9/21) | 57,1 (12/21) | 0 | 50,0 (6/12) | 50,0 (6/12) | 0 | 50,0 (5/10) | 50,0 (5/10) | 0 |
| CFX | 35,0 (7/20) | 65,0 (13/20) | 0 | 42,1 (8/19) | 47,4 (9/19) | 10,5 (2/19) | 80,0 (12/15) | 20 (3/15) | 0 |
| CXN | 62,5 (5/8) | 37,5 (3/8) | 0 | 33,3 (1/3) | 66,7 (2/3) | 0 | 50,0 (2/4) | 50,0 (2/4) | 0 |
| CZN | 37,5 (3/8) | 62,5 (4/8) | 12,5 (1/8) | 50,0 (2/4) | 25,0 (1/4) | 25,0 (1/4) | 0 | 100,0 (4/4) | 0 |
| DFX | 87,5 (42/48) | 13,5 (6/48) | 0 | 66,7 (6/9) | 22,2 (2/9) | 11,1 (1/9) | 66,7 (6/9) | 33,3 (3/9) | 0 |
| LN | 42,3 (7/23) | 57,7 (13/23) | 13 (3/23) | 30,8 (4/13) | 69,2 (9/13) | 0 | 71,3 (5/7) | 9,1 (2/7) | 0 |
| MAM | 46,4 (13/28) | 53,6 (15/28) | 0 | 56,3 (9/16) | 31,2 (5/16) | 12,5 (2/16) | 58,3 (8/13) | 41,7 (5/13) | 0 |
| PNG | 50,0 (2/4) | 50,0 (2/4) | 0 | 50,0 (2/4) | 50,0 (2/4) | 0 | 0 | 100,0 (2/2) | 0 |
| SPN | 15,4 (2/13) | 23,1 (3/13) | 61,5 (8/13) | 61,5 (8/13) | 30,8 (4/13) | 7,7 (1/13) | 72,7 (8/11) | 9,1 (1/11) | 18,2 (2/11) |
| TS | 36,4 (4/11) | 45,5 (5/11) | 18,2 (2/11) | 0 | 66,7 (4/6) | 33,3 (2/6) | 50,0 (1/2) | 50,0 (1/2) | 0 |
| Total | 53,0 (150/284) | 41,6 (143/284) | 5,6 (16/284) | 47,3 (69/146) | 43,1 (63/146) | 9,6 (14/146) | 60,2 (74/123) | 37,4 (46/123) | 2,4 (3/123) |

S: sensível; I: intermédio; R: resistente

AMC: amoxicilina-ácido clavulânico; AMP: ampicilina; CEQ: cefquinoma; CFP: cefoperazona; CFX: cefalexina-canamicina; CXN: cefalexina; CZN: cefazolina; DFX: danofloxacina; LN: lincomicina; MAM: penicilina-estreptomicina; PGN: penicilina; SPN: espiramicina; TS: trimetopim-sulfametoxazol.

A multirresistência aos antibióticos foi observada em 3 isolados, obtidos de 2 explorações leiteiras (Tabela 9). As proporções relativas de multirresistência de cada tipo bacteriano foram 6,9% (2/29) *Strep. uberis* e 12,5% (1/8) *Enterococcus* spp.. Aproximadamente metade (47,9%; n=69) desses isolados foram classificados como intermédios a pelo menos três discos antimicrobianos.

Tabela 9 - Perfis de multirresistência a antibióticos de isolados de mastite bovina clínica e subclínica na ilha de São Miguel, Açores.

| Isolados | Fenótipo |
|--------------------------|-----------------------------------|
| <i>Strep. uberis</i> † | AMC – AMP – CEQ – CFX – DFX - MAM |
| <i>Strep. uberis</i> † | CEQ – CFX – MAM – TS |
| <i>Enterococcus</i> spp. | CEQ – CZN – DFX - PNG |

† Isolados obtidos a partir da mesma exploração

Discussão

A maior suscetibilidade antimicrobiana (75,3%) foi observada para os discos de danofloxacina. Como um derivado de quinolona de segunda geração, a danofloxacina é um antimicrobiano comumente usado em medicina veterinária, especialmente para o tratamento da doença respiratória bovina e mastite, especialmente se causada por *E. coli* (Taponen et al., 2017). De acordo com os resultados in vitro, a danofloxacina foi o antimicrobiano de escolha para *E. coli* (87,5%), demonstrando também alta atividade (> 50%) para o *Str. uberis* e SCN. No entanto, o uso deste antimicrobiano ou outras fluoroquinolonas (Grandemange et al., 2017) deve ser restrito para o tratamento da mastite. Além disso, a suscetibilidade antimicrobiana de diferentes espécies bacterianas, incluindo outros tecidos ou secreções (por exemplo, secreção brônquica durante a pneumonia) deve ser avaliada para manter este antimicrobiano com alta atividade, fornecendo informações para o uso racional de fluoroquinolonas.

Num estudo na Suíça, amoxicilina-ácido clavulânico (total: 96,5%; 3817/3954) e AMP (total: 70,0%; 2769/3954) mostraram alta proporção de suscetibilidade antimicrobiana a partir de isolados incluindo coliformes, *Str. uberis*, SNC e *Enterococcus* spp. (Rüegsegger et al., 2014). No presente estudo, a suscetibilidade geral a amoxicilina-ácido clavulânico foi 59,5% e para ampicilina 55,3%. No entanto, as suas proporções relativas de suscetibilidade variaram de acordo com as três principais espécies bacterianas.

Ruegg *et al.* (2015) sugeriram que a resistência aos antimicrobianos poderia estar ligada ao seu uso sistêmico. Este argumento não é suportado pelo presente estudo: vários antimicrobianos usados atualmente em tratamentos sistêmicos, por exemplo, danofloxacina e ampicilina, demonstram altas proporções de atividade, enquanto outros (por exemplo, trimetropim-sulfametoxazol e espiramicina) demonstram um nível de resistência alto. No

entanto, a cefazolina, uma cefalosporina de primeira geração, amplamente administrada por via intramamária (Cortinhas *et al.*, 2013) mostrou baixa proporção de atividade (25,0%). Por este motivo, o efeito da via de administração deve ser avaliado para cada formulação do fármaco. Por exemplo, o *St. aureus* tem mais probabilidade (*odds ratio* = 1,63) de ser resistente à penicilina quando administrado sistemicamente; e mais probabilidade (*odds ratio* = 2,07) de ser resistente à pirlimicina após administração intramamária (Saini *et al.*, 2012).

Num recente estudo europeu, incluindo isolados de mastite clínica bovina, foram observadas atividades de baixa resistência de *E. coli* a amoxicilina-ácido clavulânico (3,9%; n = 8) e cefalexina (4,8%; n=10) (de Jong *et al.*, 2018). No presente estudo, nenhuma resistência de *E. coli* a esses antimicrobianos foi detetada. Isto deve ser interpretado com cuidado, pois pode existir resistência, mas não ser detetada devido ao tamanho da amostra ser relativamente pequeno, por razões metodológicas ou outras. A sua ocorrência no campo e detecção em estudos futuros deve ser considerada muito provável. Curiosamente, no presente estudo, a atividade intermediária de *E. coli* com amoxicilina-ácido clavulânico e cefalexina foi observada em 45,8% e 37,5% dos isolados, respectivamente, muito superior aos observados em 3,4% e 10,6%, respectivamente, do estudo europeu. Essas altas proporções de sensibilidade intermediária devem ser confirmadas num estudo mais amplo e também monitorizadas.

As maiores proporções de resistência de *E. coli* foram observadas na espiramicina (61,5%) e trimetropim-sulfametoxazol (18,2%), em *Strep. uberis* a trimetropim-sulfametoxazol (33,3%) e cefazolina (25%), enquanto o SCN apresentou resistência predominantemente à espiramicina (18,2%). No estudo europeu acima mencionado, espiramicina e trimetropim-sulfametoxazol não foram testados. Como medicamentos baseados nas classes macrólidos e sulfonamidas são amplamente utilizados no tratamento da mastite e pneumonia bovina, a ocorrência de resistência deve ser monitorizada. Semelhante a outros estudos na Europa e Canadá, no presente estudo apenas uma baixa proporção de isolados exibiu resistência antimicrobiana múltipla (Hinthong *et al.*, 2017; de Jong *et al.*, 2018). Dos três isolados multirresistentes, os dois *Strep. uberis* foram obtidos na mesma exploração, sugerindo que a disseminação da multirresistência aos antibióticos ocorre, e que medidas preventivas a nível do rebanho devem ser consideradas. Isso destaca o papel dos agentes ambientais, que potencialmente espalham genes de resistência a antibióticos para o meio ambiente, populações animais e/ ou população humana (Hinthong *et al.*, 2017; Tark *et al.* 2017).

Concluimos que, em geral, uma alta proporção de isolados foi sensível à danofloxacina. A resistência foi observada principalmente para trimetropim-sulfametoxazol. A resistência antimicrobiana e multirresistência aos antibióticos parecem ocorrer em níveis baixos. A sensibilidade intermédia ocorreu numa grande proporção de isolados. Mais pesquisas sobre a sua importância para o tratamento da mastite bovina em rebanhos leiteiros açorianos são necessárias.

4. Conclusão

De acordo com os dados obtidos, no laboratório de microbiologia da Associação de Jovens Agricultores Micaelenses, o principal microrganismo isolado entre Março de 2015 e Junho de 2017 a partir de leite mamítico de vacas leiteiras foi *Escherichia coli*, o que provavelmente está associado a mamites por contaminação ambiental/fecal. A natureza do foco de origem das mamites, por contaminação ambiental, é reforçada pelo isolamento, em 2º lugar, de *Streptococcus uberis*. De facto, pelo menos metade das amostras de leite mamítico contém um destes microrganismos, o que está consonante com o sistema de produção em pastoreio. Estes dados indicam ser necessário, uma atenção específica no controlo de microrganismos de origem ambiental, assim como de possíveis infeções iatrogénicas.

No estudo dois foi observada uma alta proporção de atividade antimicrobiana para danofloxacina seguida de amoxicilina-ácido clavulânico e ampicilina com atividade moderada, ao contrário para cefazolina e trimetropim-sulfametoxazol, foram observadas altas proporções de atividade intermediária. A resistência foi observada principalmente para trimetropim-sulfametoxazol e espiramicina. A resistência antimicrobiana e multirresistência aos antibióticos parecem ocorrer em níveis baixos. No entanto, a sensibilidade intermédia ocorreu numa grande proporção de isolados. Mais pesquisas sobre a sua importância para o tratamento da mastite bovina em rebanhos leiteiros açorianos são necessárias.

Bibliografia

- Albornoz, L., Acuña, C.N., Pacheco, M. & Peña, S. (2008). Prevalence of subclinical mastitis in the region of Florida, Uruguay. *NMC 47th Annual Meeting Proceedings, New Orleans, Louisiana, 20-23 January 2008*. pp. 210-211.
- Almeida, B., Brito, M.A.V., Brito, J.R.F., Pires, M.F.A. & Benites, N.R. (2005). Tratamento de mastite clínica experimental por meio de ordenhas múltiplas em vacas leiteiras inoculadas com *Staphylococcus aureus*. *Arquivo do Instituto Biológico*. 72, 1-6.
- Almeida RA, Oliver SP. (2001). Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*, 31,205-212.
- Anaya-López JL, Guzmán OEC, Trejo AC, Aguirre VMB, Meza JEL, Alarcón JJV, Zarzosa AO. (2006). Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical mastitis. *Research in Veterinary Sciences*, 81,358-361.
- Apifarma (2004). Utilização prudente de antibióticos: princípios básicos globais. Documento de divulgação.
- Archbald, L.F. (1999). Reproductive disease: bovine mastitis. In J.L. Howard & R.A. Smith (Ed.). *Current veterinary therapy 4: food animal practice*. (pp. 563-617). Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Aslantas, O., Demir, C., Türütoglu, H., Cantekin, Z., Ergün, Y. & Dogruer, G. (2007). Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 31, 253-257.
- Bauer, A.W. et al. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 45, p. 493-496.
- Barkema, H.W., Schukken, H. & Zadoks, R.N. (2006). The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science*, 89, 1877-1895.
- Bexiga, R., Cavaco, L.M. & Vilela, C.L. (2005). Mastites subclínicas bovinas na zona do Ribatejo-Oeste. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 100:39-44.
- Biggs, A. (2009). *Mastitis in cattle*. Marlborough: The Crowood Press.
- Blood DC, Radostits OM. (1991). Mastite. *Clínica Veterinária*. 7ª ed. Rio de Janeiro, Brasil: Editora Guanabara Koogan, 423-470.
- Blowey R, Edmondson P. (1999). Mastitis: causas, epidemiología y control. In: Control de la Mamitis en Granjas de Vacuno de Leche. Zaragoza, España: Editorial Acribia. 33-54.

- Blowey, R.W. (1999). Mastitis and conditions of the teat and udder. In R.W. Blowey (Ed.). *A veterinary book for dairy farmers*. (3th ed.). (pp. 175-229). Ipswich: Old Pond Publishing.
- Borm, A.A., Fox, L.K., Leslie, K.E., Hogan, J.S., Andrew, S.M., Moyes, K.M., Oliver, S.P., Schukken, Y.H., Hancock, D.D., Gaskins, C.T., Owens, W.E. & Norman, C. (2006). Effects of prepartum intramammary antibiotic therapy on udder health, milk production, and reproductive performance in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, 89, 2090-2098.
- Brechbuehl, M., Stalder, S.M., Albin, S. & Kaufmann, T. (2008). Prevalence of mastitis pathogens in quarter milk samples of dairy cows in Switzerland. *Proceedings of the 25th World Buiatrics Congress, Budapest, Hungary*.
- Britten, A. (2006). Getting the jump on *Mycoplasma* outbreaks. *NMC 45th Annual Meeting Proceedings, Tampa, Florida, 22-25 January 2006*. pp. 212-216.
- Brito, F. (2009) Pagamento do leite por qualidade: Uma visão do produtor. In: Estratégias e conhecimentos para o fortalecimento do agronegócio do leite. Cap. I. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG. 280p.
- Call, D.R., Davis, M.A., Sawant, A.A. (2008) Antimicrobial resistance in beef and dairy cattle production. *Animal Health Research Reviews*, December, 9(2), p. 159-167
- Clinical Laboratory Standards Institute (2008). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved standard, 3rd Edn. CLSI document M31-A3. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA. PP: 13-23.
- Collins, C. H.; Lyne, P. M.; Grange, J. M.; Falkinham III, J. O. Collins & Lyne's. (2004). *Microbiological Methods*. 8. ed. London: Arnold, 456p.
- Constable, P.D. & Morin, D.E. (2003). Treatment of clinical mastitis using antimicrobial susceptibility profiles for treatment decisions. *The Veterinary Clinics Food Animal Practice*, 19, 139-155.
- Contreras, G.A. & Sears, P.M. (2008). Use of systemic antibiotic therapy in prepartum heifers to reduce the incidence of intramammary infections. *NMC 47th Annual Meeting Proceedings, New Orleans, Louisiana, 20-23 January 2008*. pp. 252-253.
- Corrêa, I., Corrêa, M.G. & Marin, J.M. (2005). Antimicrobial susceptibility of strains of coagulasepositive *Staphylococcus* isolated from mastitis bovine milk. *ARS Veterinaria*, 21, 69-76.

- Cortinhas CS1, Oliveira L, Hulland CA, Santos MV, Ruegg PL. (2013). Minimum inhibitory concentrations of cephalosporin compounds and their active metabolites for selected mastitis pathogens. *Am J Vet Res.* 74(5):683-90. doi: 10.2460/ajvr.74.5.683.
- Costa, E.O. (2006). Use de antimicrobianos na mastite. In H.S. Spinosa, S.L. Górnaiak & M.M. Bernardi (Ed). *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária* (4ªed.). (pp. 501-515). Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.
- Costa, L. F. R. Método automático para identificação da região de inibição e de rótulos alfanuméricos de antibióticos posicionados em antibiogramas por disco-difusão. Brasil, 2014.
- Crespo, DG, Navas J, Gradillas G, Juste RA. (2005). Technical Note: Molecular typing of *Corynebacterium bovis* isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *American Dairy Science Association.* 88:1705-1707.
- Davidson, A.P. & Staberfeldt, G.H. (2007). La glândula mamaria. In J.G. Cunningham & B.G. Klein (Eds). *Fisiología Veterinaria.* (4ª ed.). (pp. 501-514). Madrid: Elsevier.
- de Jong A, Garch FE, Simjee S, Moyaert H, Rose M, Youala M, Siegart E; VetPath Study Group. (2018). Monitoring of antimicrobial susceptibility of udder pathogens recovered from cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. *Vet Microbiol.* 213:73-81. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.11.021. Epub 2017 Nov 21.
- Erskine, R.J., Wagner, S. & DeGraves, F.J. (2003). Mastitis therapy and pharmacology. *The Veterinary Clinics Food Animal Practice,* 19, 109-138.
- Gentilini, E., Denamiel, G., Betancor, A., Rebuelto, M., Fermepin, M.R. & Torres, R.A. (2002). Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. *Journal of Dairy Science,* 85, 1913-1917.
- George, L.W., Divers, T.J., Ducharme, N. & Welcome, F.L. (2008). Diseases of the teats and udder. In T.J. Divers & S.F. Peek. *Rebhun's diseases of dairy cattle.* (2nd ed.). (pp. 327-394). St. Louis: Saunders Elsevier.
- Grandemange E., Perrin P-A, Schwab-Richards R., Woehrlé F. (2017). Efficacy of a single injection of marbofloxacin in the treatment of acute *E. coli* mastitis in lactating dairy cows. *Revue Méd. Vét.,* 2017, 168, 10-12, 219-228.
- 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.

- Hallberg, J.W., Wachowski, M., Moseley, W.M., Dame, K.J., Meyer, J. & Wood, S.L. (2006). Efficacy of intramammary infusion of ceftiofur hydrochloride at drying off for treatment and prevention of bovine mastitis during the nonlactating period. *Veterinary Therapeutics*, 7, 35-42.
- Haynes, N.B. (2001). Diseases caused by bacteria. In N.B. Haynes (Ed.). *Keeping livestock healthy*. (4th ed.). (pp. 141-210). North Adams: Storey Publishing.
- Hillerton, J.E. & Berry, E.A. (2003). The management and treatment of environmental streptococcal mastitis. *The Veterinary Clinics Food Animal Practice*, 19, 157-169.
- Hinthong, W., Pumipuntu, N., Santajit, S., Kulpeanprasit, S., Buranasinsup, S., Sookrung, N., Chaicumpa, W., Aiumurai, P., Indrawattana, N., (2017). Detection and drug resistance profile of *Escherichia coli* from subclinical mastitis cows and water supply in dairy farms in Saraburi Province, Thailand. *PeerJ*, 5:e3431.
- Huxley JN, Green MJ, Bradley AJ. (2003). *Corynebacterium bovis*-friend or foe? Proceeding of the British Mastitis Conference. 23-24.
- Idriss, Sh. E., V. Foltys, V. Tančin, K. Kirchnerová, K. Zaujec (2013): Mastitis pathogens in milk of dairy cows in Slovakia. *Slovak. J. Anim. Sci.* 46, 115-11
- Izak, E., Bonazza, J.C. & Perren, L.C. (2007). Prevalence and antimicrobial resistance of mastitis pathogens isolated from dairy herds in Argentina. *NMC 46th Annual Meeting Proceedings, San Antonio, 21-24 January 2007*. pp. 248-249.
- Kawai K1, Higuchi H, Iwano H, Iwakuma A, Onda K, Sato R, Hayashi T, Nagahata H, Oshida T. (2014). Antimicrobial susceptibilities of *Mycoplasma* isolated from bovine mastitis in Japan. *Anim Sci J.* 2014 Jan;85(1):96-9. doi: 10.1111/asj.12144.
- Krumperman PH. (1983). Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 46(1):165-170.
- Kubota, M., Hayashi, T., Iwasaki, K., Ohtsuka, H., Kohiruimak, M., Kawamura, S. et al. (2007) Rapid and effective method for separation of *Staphylococcus aureus* from somatic cells in mastitis milk. *J Dairy Sci*, 90, 4100-4107.
- Leemput, E.S.V. & Zadoks, R.N. (2006). Macrolide and lincosamide resistance in *Streptococcus uberis*. *NMC 45th Annual Meeting Proceedings, Tampa, Florida, 22-25 January 2006*. pp. 274-275.
- Leslie, K.E. (2004). New concepts on bovine mastitis control. *23rd World Buiatrics Congress, Québec, Canada, 11-16 July 2004*.

- Lévesque, P. (2004). *Less Mastitis: Better milk*. Canada: Hoard's Dairyman.
- Lombard, J., Slyke, T.V., Welcome, F., Schukken, Y. & Koprak, C. (2008). Prevalence of contagious mastitis pathogens on U.S. dairy operations. *NMC 47th Annual Meeting Proceedings, New Orleans, Louisiana, 20-23 January 2008*. pp. 170-171.
- Makovec, J.A. & Ruegg, P.L. (2003). Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8,905 samples (1994-2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222, 1582-1589.
- Malek dos Reis, C.B., Barreiro, J.R., Moreno, J.F.G., Porcionato, M.A.F. & Santos, M.V. (2011) Evaluation of somatic cell count thresholds to detect subclinical mastitis in Gyr cows. *J Dairy Sci*, 94, 4406-4412
- Marín P1, Escudero E, Fernández-Varón E, Cárcelos CM, Corrales JC, Gómez-Martín A, Martínez I. (2010). Short communication: Fluoroquinolone susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from caprine clinical mastitis in southeast Spain. *J Dairy Sci*. 2010 Nov;93(11):5243-5. doi: 10.3168/jds.2010-3345.
- Martinez, M.B., Tadei., C.R. (2005). In: *Microbiologia*, TRABULSI, L.R., ALTERTHUM, F.4ª Ed, São Paulo: Atheneu, 718 p.
- Morin, D.E. (2004). Acute mastitis: revisiting the goals of therapy. *Proceedings of the 23rd World Buiatrics Congress, Québec, Canada, 11-16 July 2004*.
- Moroni, P., Pisoni, G., Antonini, M., Villa, R., Boettcher, P. & Carli, S. (2006). Susceptibilidade às drogas antimicrobianas de *Staphylococcus aureus* oriundos de mastites bovinas subclínicas na Itália. *Journal of Dairy Science*, 89, 2973-2976.
- NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved Standard Eleventh Edition. Wayne: CLSI, Jan. 2012a.
- NCCLS -National Committee for Clinical Laboratory Standards-. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Performance Twenty-Second Informational Supplement. Wayne: CLSI, Jan. 2012b.
- Nickerson, S.C., Owens, W.E. & Boddie, R.L. (1995). Mastitis in dairy heifers: initial studies on prevalence and control. *Journal of Dairy Science*, 78, 1607-1618.
- Nunes, S.F., Cavaco, L.M., Vilela, C.L., Bexiga, R. (2007). Perfil de susceptibilidade a antibióticos de agentes etiológicos de mastite subclínica bovina em Portugal. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 102, 275-280.

- Oliver, SP; González, RN; Hogan, JS; Jayarao, BM and Owens, WE (2004). Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. 4th Edn., National Mastitis Council Inc., Verona, WI, USA. PP: 1-30.
- Oliver, S.P., Luther, D.A., Park, H.M. & Almeida, R.A. (2004). SUAM: an important virulence factor in the pathogenesis of *Streptococcus uberis* mastitis. *NMC 43rd Annual Meeting Proceedings, Charlotte, North Carolina, 1-4 February 2004*. pp. 353-354.
- Pantoja, J.C., Hullah, C., Ruegg, P.L. (2009). Somatic cell count status across the dry period as a risk factor for the development of clinical mastitis in the subsequent lactation. *Journal of Dairy Science*, January 2009, 92(1), p. 139-148.
- Pereira, J. (2011) Eficácia Vacinal na Prevenção de Mastites. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Escola Universitária Vasco da Gama, Coimbra.
- Philpot W.N., Nickerson S.C., (2000). Winning the Fight Against Mastitis. Westfalia Surge Inc. 1880 Country Farm Drive, Naperville, IL 60563.
- Piepers S, Vlieghe SD, Kruif AD, Opsomer G, Barkema HW. (2009). Impact of intramammary infections in dairy heifers on future udder health, milk production, and culling. *Veterinary Microbiology*. 134,113-120.
- Pitkälä, A., Haveri, M., Pyörälä, S., Myllys, V. & Buzalski, T.H. (2004). Bovine mastitis in Finland 2001 – prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *Journal of Dairy Science*. 87, 2433-2441.
- Pullinger, G.D., Benavides, M.L., Coffey, T.J., Williamson, J.H., Cursons, R.T., Summers, E., Hulbert, J.L., Maiden, M.C. & Leigh, J.A. (2006). Application of *Streptococcus uberis* multilocus sequence typing: analysis of the population structure detected among environmental and bovine isolates from New Zealand and the United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1429-1436.
- Pyörälä, S. (2009). Treatment of mastitis during lactation. *Irish Veterinary Journal*, 62, 40-44.
- Pyörälä S, Taponen S. (2009). Coagulase-negative staphylococci-Emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*. 134, 3-8.
- QUINN, P.J. et al. (2005). Agentes microbianos e produção de doença: causas bacterianas de mastite bovina. In: QUINN, P. J. et al. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. Porto Alegre: Artmed.

- Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., FitzPatrick, E.S., Fannig, S. & Hartigan, P.J. (2011) *Veterinary Microbiology and Microbial Disease* (2nd Ed., pp. 469-2250) Oxford, Wiley-Blackwell.
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C. & Hinchcliff, K.W. (2000). *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. (9th ed.). pp. 603-691. Edinburgh: W. B. Saunders Company Ltd.
- Radostits, O. M. et al., (2000), *Clínica Veterinária*, 9ª ed., Rio de Janeiro
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C. & Hinchcliff, K.W. (2002) *Clínica Veterinária. Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos*, 9ª Ed., pp. 541-629, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C. & Hinchcliff, K.W. (2000). Mastitis. In O.M. Radostits, C.C. Gay, D.C. Blood, K.W. Hinchcliff (Ed.). *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. (9th ed.). pp. 603-691. Edinburgh: W. B. Saunders Company Ltd.
- Ravaomanana, J., Rasambainarivo, A., Perrot, A., Razafiarison, O. & Rakotonindrina, S. (2004). Mastitis in dairy cows and its economic impact in smallholder production in the Highland Zones of Madagascar. *Proceedings of the 11th International Conference of the Association of Institutions of Tropical Veterinary Medicine, Kuala Lumpur, Malásia*.
- Rebhun WC. (1999) Enfermedades de los pezones y de la ubre. *In: Enfermedades del Ganado Vacuno Lechero*. Zaragoza, España: Editorial Acribia, 362-398.
- Riekerink, R.O., Barkema, H.W., Kelton, D.F. & Scholl, D.T. (2008). Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 91, 1366-1377.
- Reyher, K.K., Dohoo, I.R. (2011). Diagnosing intramammary infections: evaluation of composite milk samples to detect intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, 94(7), p. 3387-3396.
- Roberson, J.R. (2003). Establishing treatment protocols for clinical mastitis. *The Veterinary Clinics Food Animal Practice*, 19, 223-234.
- Rodloff, A. et al. (2008). Susceptible, intermediate, and resistant - the intensity of antibiotic action. *Dtsch Arztebl*, v. 105(39), p. 657-662.
- Ruegg PL, Oliveira L, Jin W, Okwumabua O. (2015). Phenotypic antimicrobial susceptibility and occurrence of selected resistance genes in gram-positive mastitis pathogens isolated from Wisconsin dairy cows. *J Dairy Sci*. 98(7):4521-34. doi: 10.3168/jds.2014-9137.

- Rüeggsegger F1, Ruf J1, Tschuor A2, Sigrist Y3, Rosskopf M3, Hässig M1. (2014). Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens of dairy cows in Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 156(10):483-8. doi: 10.1024/0036-7281/a000635.
- Saini, V., McClure, J.T., Leger, D. Dufour, S., Sheldon, A.G., School, D.T., Barkema, H.W. (2012) Antimicrobial use on Canadian dairy farms. *Journal of Dairy Science*, Mars, 95(3), p. 1209-1221
- Santos, E.M., Brito, M.A., Lange, C., Brito, J.R. & Cerqueira, M.M. (2007). *Streptococcus* e géneros relacionados como agentes etiológicos de mastite bovina. *Acta Scientiae Veterinariae*, 35, 17-27.
- Schukken, Y.H., Zadoks, R.N., Tikofsky, L., Dogan, B., Klaessig, S., Simpson, K., Wiedmann, M. & Boor, K. (2004). Epidemiology of mastitis: paradigms, pattern and parables. *Proceedings of the 23rd WBC Congress, Québec, Canada, 11-16 July 2004.*
- Sears, P.M. & McCarthy, K.K. (2003). Management and treatment of staphylococcal mastitis. *The Veterinary Clinics Food Animal Practice*, 19, 171-185.
- Seegers, H., Billon, D., Roussel, P., Serieys, F. & Bareille, N. (2008). Economic assessment of selective versus blanket dry cow treatment options including teat sealer use. *Proceedings of the 25th World Buiatrics Congress, Budapest, Hungary.*
- Seegers H, Fourichon C, Beaudreau F. (2003). Production effects related to mastitis and mastitis economicas in dairy cattle herds. *Veterinary Research.* 34,475-491.
- Simões, João, Moreira, Maria Teresa, (2015), Identificação de microrganismos presentes no leite de vacas em pré-secagem em explorações com baixa CCSREDVET. *Revista Electrónica de Veterinaria [en línea]*, [Data de consulta: 1 de abril de 2018] Disponível em:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63638741004>> ISSN.
- Smith, Bradford P.,(2006) *Medicina Interna de Grandes Animais.*, 3º ed. Barueri, SP., 2006
- Smith, B.P. (2002). *Large animal internal medicine.* 3th Edition. St Louis: Mosby Co.
- Smith, B.P. (2009) *Large Animal Internal Medicine* (4th Ed., pp. 1112-1138) St. Louis, MO, Mosby Elsevier.
- Taponen S, Liski E, Heikkilä AM, Pyörälä S. (2017). Factors associated with intramammary infection in dairy cows caused by coagulase-negative staphylococci, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis*, or *Escherichia coli*. *J Dairy Sci.* 100(1):493-503. doi: 10.3168/jds.2016-11465.
- Taponen S, Pyörälä S. (2009). Coagulase-negative Staphylococci as cause of bovine mastitis- Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Veterinary Microbiology.* 134, 29-36.

- Tark, D.S., Moon, D.C., Kang, H.Y., Kim S.R., Nam, H.M., Lee, H.S., Jung, S.C., Lim, S.K., (2017). Antimicrobial susceptibility and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* isolated from bovine mastitic milk in South Korea from 2012 to 2015. *Journal of dairy science*, 100(5):3463-3469.
- Teixeira, P., Ribeiro, C. & Simões, J. (2008) Prevenção de Mamites em Explorações de Bovinos Leiteiros. Da teoria à prática. Acedido a 3 de Maio de 2018 em www.veterinaria.com.pt/media/Mastites.pdf
- Teixeira, P., Ribeiro, C., Simões, J.. (2006). Programa de controlo de mamites. 1. Diagnóstico dos casos subclínicos e manejo das vacas. *Vaca leiteira*, 98/99, 26-29
- Tenhagen BA, Hansen I, Reinecke A, Heuwieser W. (2009). Prevalence of pathogens in milk samples of dairy cows with clinical mastitis and in heifers at first parturition. *J Dairy Res.* 2009 May;76(2):179-87. doi: 10.1017/S0022029908003786. Epub 2009 Jan 5.
- Tirian, A., Kovács, M., Brydl, E., Szenci, O., Könyves, L., Jurkovich, V. & Ungvári, E. (2008). *Staphylococcus aureus* mastitis in fresh calved heifers on a dairy farm in Hungary. *Proceedings of the 25th World Buiatrics Congress, Budapest, Hungary.*
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. (2003). In: *Microbiologia*, 6a ed, São Paulo: Artmed, p.267-393.
- Tozzetti, D.S., Bataier, M.B., Almeida, L.R. & Piccinin, A. (2008). Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas – revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 10.
- Tyler, J.W. & Cullor, J.S. (2002). Mammary gland health and disorders. In B.P. Smith (Ed.). *Large animal internal medicine*. (3rd ed.). (pp. 1019-1038). St. Louis: Mosby, Inc.
- Tyler JW, Cullor JS (2008). Mammary Gland Health and Disorders. In: Smith BP, ed. *Large Animal Internal Medicine*. 3 rd ed. St. Louis, USA: Mosby, pp.1019-1029.
- Vakkamäki J, Taponen S, Heikkilä AM, Pyörälä S. (2017). Bacteriological etiology and treatment of mastitis in Finnish dairy herds. *Acta Vet Scand.* 2017 May 25;59(1):33. doi: 10.1186/s13028-017-0301-4.
- Vlieghe SD. (2009). Heifer and CNS mastitis. *Veterinary Microbiology*. 134, 1-2.
- Watts JL, Lowery DE, Teel JF, _Rossbach S. (2000). Identification of *Corynebacterium bovis* and other Coryneforms isolated from bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science*. 83,2373-2379.

- Wilson, D.J., Gonzalez, R.N., Case, K.L., Garrison, L.L. & Gröhn, Y.T. (1999). Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*, 82, 1664-1670.
- Yousaf, A., Muhammad, G., Rahman, S., Siddique, M. & Masood, M.Z. (2009). Effect of montanide adjuvanted *Staphylococcus aureus* bacterin-toxoid on prevalence and incidence of mastitis in cows. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 46, 119-123.
- Zadoks, R.N. & Fitzpatrick, J.L. (2009). Changing trends in mastitis. *Irish Veterinary Journal*, 62, 59-70.
- Zadocks, R.N. & Schukken, Y.H. (2003). *Streptococcus uberis*: environmental or contagious pathogen? *NMC 42nd Annual Meeting Proceedings, Fort Worth, Texas, 26-29 January 2003*. pp. 61-67.
- Zadoks RN, Watts JL. (2009). Species identification of coagulase-negative staphylococci: Genotyping is superior to phenotyping. *Veterinary Microbiology*. 134:20-28.
- Zafalon, L.F., Filho, A.N., Oliveira, J.V. & Resende, F.D. (2007). Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia*, 59, 577-585.
- Zhen YH, Jin LJ, Li XY, Guo J, Li Z, Zhang BJ, Fang R, Xu YP. (2009). Efficacy of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) to bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Microbiology*. 133:317-322.