

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Importância da identificação prévia de agentes etiológicos presentes no leite de vacas
em pré-secagem**

Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária

Dr.^a Maria Teresa Teixeira Dias Moreira

Orientador: Prof. Dr. ^o João Carlos Caetano Simões



Vila Real, Fevereiro de 2015



ODE TO A COW

When life seems one too many for
you,
Go and look at a cow.
When the future's black and the
outlook blue,
Go and look at a cow.
For she does nothing but eat her
food,
And sleep in the meadows entirely
nood,
Refusing to fret or worry or
brood
Because she doesn't know how.

Whenever you're feeling bothered
and sore,
Go and look at a cow.
When everything else is a fearful
bore,
Go and look at a cow.
Observe her gentle and placid air,
Her nonchalance and savoir faire,
Her absolute freedom from every
care,
Her imperturbable brow.

So when you're at the end of your
wits,
Go and look at a cow.
Or when your nerves are frayed
to bits,
And wrinkles furrow your brow;
She'll merely moo in her gentle
way,
Switching her rudder as if to say:
"Bother tomorrow! Let's live
today!
Take the advice of a cow."

The Old Farmer's Almanac
1936

AGRADECIMENTOS

Li, algures num livro, que “a lista de agradecimentos reais deveria, pelo menos, igualar a extensão do texto, pois cada memória relembra cada passo que se deu e de algum modo alguém que estava ao nosso lado. Não pretendo querer fazê-lo, pois em tais situações o real funde-se com o imaginário, e em nós somente resta a memória do que se viveu. Arriscarei apenas salientar aqueles que, pela sua influência na minha vida, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho”.

Assim, as minhas primeiras palavras são para a Prof. Doutora Cristina Saraiva, pela forma desprendida e sincera como aceitou que realizasse este trabalho, pela sua constante simpatia e boa-disposição, e por uma amizade que vem dos tempos da faculdade.

Ao Prof. Dr. João Simões, agradeço não apenas o facto de aceitar ser o Orientador deste mestrado e por tudo o que isso implicou, mas igualmente pelo que me ensinou, enquanto aluna de Veterinária, há já alguns (poucos!) anos atrás...

À Direção da Leicarcoop, na pessoa do Sr. José Campos de Oliveira, um agradecimento sentido por me possibilitar a realização da parte prática deste relatório.

Aos produtores, pela forma simpática com que sempre recebem este tipo de iniciativas, pela sua curiosidade, pela partilha de experiências e pelo muito que ao longo destes anos tenho aprendido com eles sobre as vacas de leite.

À Biomerieux®, concretamente à Dra. Maria José Afonso, pela participação nos meios de diagnóstico.

Devo várias palavras de gratidão, à família que me criou e à que criei. Para a família que eu criei, pequenina, mas sempre presente, só posso dizer: obrigada Francisca, do fundo do coração, por me fazeres “descer à terra” e por partilhares estes e outros caminhos comigo (e por nos aturares nas tardes de domingo!).

Para a família que me criou, as minhas primeiras palavras são para a minha Mãe, figura determinada e determinante na minha vida. Para os meus irmãos, para a Titi, para os meus cunhados, obrigada por tudo, por nada e por mais alguma coisa!

Para os meus sobrinhos, de forma especial ao Chico, pela sua ajuda no tratamento dos dados. Um agradecimento para as minhas “outras famílias”, a da Leicar, particularmente, à Sílvia, ao Luís e ao Paulo, pela ajuda com os inquéritos e com os dados dos produtores, pela amizade, por serem as pessoas que são e por diariamente fazerem com que tudo pareça mais leve!

Para a Adelaide, também pela sugestão do tema, para a Andreia, para o Pedro, pelas conversas, pelas conclusões das conversas.

Para a Paulinha, um obrigada do tamanho do mundo, por tudo, a sua interminável e tolerante amizade, pelas inúmeras vezes em que, de uma forma ou outra, sempre me ajuda, pelo exemplo enquanto pessoa e enquanto veterinária, pelas nossas muitas conversas e partilhas, e porque acho que sozinha teria desistido!

Ao Eng.º Nuno Marques, um agradecimento especial, não apenas pela paciência em rever este trabalho, mas sobretudo pelo amigo que se tornou ao longo dos últimos anos.

Para todos os que têm um caminho que de alguma forma se cruzou e vai cruzando com o meu, obrigada!

Para o meu Pai...

Trabalhos elaborados no âmbito da dissertação:

Moreira M.T. e Simões J., 2015. Identificação de micro-organismos presentes no leite de vacas em pré-secagem em explorações com baixa CCS [Identification of microorganisms from milk before dry period on farms with low SCC]. Rev. Electrón. vet., 16(4), e1-9. Disponível em:<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040415/041505.pdf>

RESUMO

O período seco, ou não lactante, de uma vaca leiteira é o espaço de tempo compreendido entre duas lactações, durante o qual a glândula mamária sofre alterações dinâmicas, quer funcionais, quer estruturais. A secagem é o tempo ideal para curar infecções existentes, mas representa igualmente um risco para a aquisição de novas infecções intramamárias (IMI). As IMI que persistem de lactação em lactação e as novas infecções com origem no período seco contribuem para a ocorrência de mastites, clínicas e subclínicas, ao longo da vida produtiva do animal. As mastites são a doença. Em termos económicos, com maior impacto na exploração, devido a perdas relacionadas com o tratamento, leite descartado devido ao intervalo de segurança, diminuição da produção, mão-de-obra, diminuição do progresso genético e refugo precoce ou morte. A finalidade dos tratamentos de secagem é eliminar as infecções presentes nesse momento, evitar mastites durante o período seco e prevenir o aparecimento das mesmas na lactação subsequente. O principal objetivo deste trabalho, foi demonstrar a necessidade de proceder à identificação, como protocolo de rotina, dos agentes etiológicos presentes no leite de vacas na pré-secagem. O trabalho dividiu-se em duas partes. Na primeira, foi realizado um inquérito a 68 explorações da região do Entre Douro e Minho com o intuito de caracterizar as práticas e hábitos relativos ao manejo da secagem. Na segunda fase, seleccionámos 7 explorações, com contagens celulares inferiores a 250.000 CCS, a fim de caracterizar os agentes etiológicos prevalentes no leite em 246 vacas na pré-secagem, independentemente de qualquer outro exame. A percentagem das 68 explorações que têm como procedimento a secagem e as que usam selante foi superior a 90%, enquanto menos de 20% das explorações afirmaram não observar mastites no pós-parto imediato. Em 78,9% (194/246; $P < 0,001$) das amostras de leite de vacas em pré-secagem ocorreu crescimento bacteriano. Das vacas afetadas, os estafilococos coagulase-negativos predominaram em 30,9% (60/194; $P < 0,001$) dos casos, seguidos (menos

de 16%) por *E. coli* e *Arcanobacterium bovis*. Concluimos que, embora a maioria dos produtores estabeleçam um programa de controlo de mastites considerando o período de secagem, existe uma elevada proporção de vacas em pré-secagem afetadas por agentes bacterianos, daí a importância do diagnóstico microbiológico do leite das vacas em pré-secagem, de forma a dirigir, corretamente, os tratamentos a aplicar na secagem.

Palavras-chave: secagem, mastite, agente etiológico, terapia seletiva de secagem, cultura microbiológica

ABSTRACT

The dry period is a crucial phase in lactation cycle of a dairy cow. Is a significantly important period for the epidemiology of mastitis and production of high quality milk. Dry period is the perfect time to cure existing infections, but also represents a risk for the acquisition of new intramammary infections (IMI). The IMI that persists from lactation to lactation and the new infections originating in the dry period contribute to the occurrence of clinical or subclinical mastitis, throughout the productive life of the animal. The purpose of the dry-off treatment is to eliminate the infections presents at that time, and avoid the appearance of them in the subsequent lactation. The main objective of this work was to demonstrate the need for the identification, as a routine protocol, of the etiological agents in the milk of cows in pre- dry-off. The study was divided into two parts. The first was conducted a survey of 68 farms in the Douro/ Minho region in order to characterize the practices and habits relating to the dry period management. In the second part, we selected seven farms with lower cell count ($< 250,000$ cells) in order to characterize the etiologic agents in 246 pre-dry cows. No other kind of diagnosis (CMT, Milk Electric Conductivity or individual cell count) was considered. The percentage of farms using internal teat sealant was higher than 90 %, while less than 20 % of farms said they did not observe mastitis in the immediate postpartum; 78.9 % (194/246; $P < 0.001$) of milk samples from cows show bacterial growth. From affected cows, *coagulase-negative staphylococci* predominate in 30.9 % cows (60/194; $P < 0.001$) followed (less than 16%) by *E. coli* and *Arcanobacterium bovis*. We conclude that although most of the producers establish a mastitis control program considering the dry period, there is a high proportion of cows affected by pre-dried bacterial agents. This is the main reason to do a microbiological diagnosis in the milk of pre-drying cows, in order to maximize the dry treatment.

Key words: Dry-off period, selective dry-cow therapy, mastitis, etiologic agent, microbiologic culture

ÍNDICE

1.Introdução	1
2.Objectivos	24
3.Material e métodos	
3.1. Animais e explorações – caracterização	25
3.2. Recolha de amostras – pré e pós-parto	26
3.3.Microbiologia	27
3.4. Tratamentos realizados no período que antecedeu a secagem	28
3.5. Análise estatística	29
4.Resultados	
4.1. Respostas ao inquérito	30
4.2. Caracterização dos agentes no momento da secagem	34
4.3.Avaliação microbiológica dos leites após o parto	36
5.Discussão	38
6.Conclusões	43
7.Referências Bibliográficas	44
Anexos	<i>i</i>

ÍNDICE de TABELAS, FIGURAS e GRÁFICOS

Tabela 1 – Agentes contagiosos e ambientais.

Tabela 2- Agentes etiológicos classificados em função do seu impacto na saúde do úbere.

Tabela 3 – Caracterização das explorações.

Tabela 4 – casos em que ocorreram alterações do agente em vacas infectadas no ante e no pós-parto.

Figura 1 -- Percentagem das explorações que têm como procedimento a secagem.

Figura 2- Percentagem das explorações que têm em atenção a produção leiteira diária no momento da secagem.

Figura 3- Utilização percentual de diferentes métodos de secagem.

Figura 4- Critérios de seleção da antibioterapia de secagem (preço, intervalo de segurança, identificação prévia do agente, indicação do veterinário).

Figura 5- Percentagem das explorações que utilizam selante após a antibioterapia de secagem.

Figura 6- Percentagem das explorações que dispõem de local específico para as vacas secas.

Figura 7- Percentagem das explorações que separam os animais num lote de peri-parto.

Figura 8- Percentagem das explorações com maternidade.

Figura 9- Vigilância relativa ao aparecimento de mastites em vacas secas/novilhas.

Figura 10- Percentagem dos animais que apresentam mastite ao parto.

Figura 11 – Prevalência de agentes etiológicos nas explorações presentes no estudo na identificação realizada na pré-secagem.

Figura 12 – Percentagem relativa de agentes bacterianos com crescimento no leite das 16 vacas do pós-parto.

LISTA DE ABREVIATURAS

BDCT- blanket dry cow therapy

CCS – Contagem de células somáticas

IMI- Infecção IntraMamária

IMM-IntraMamário

ITS- Selante Interno

LPS- Lipopolisacarideo

PMN - Polimorfonucleado

SCN – *Staphylococcus coagulase negativo*

TCM -Teste Californiano de Mastites

1. INTRODUÇÃO

O período seco é o intervalo de tempo entre duas lactações, durante o qual a glândula mamária sofre alterações dinâmicas, tanto a nível funcional como a estrutural (Sz. Jánosi e Huszenicza, 2001). O momento durante o qual as fêmeas bovinas de aptidão leiteira interrompem a lactação é conhecido como “período seco” ou secagem. A duração deste intervalo é variável e dependente das opções do proprietário, considerando-se o intervalo entre as 6 a 8 semanas antes do parto o mais consensual. Pressupõe vantagens incontornáveis, entre as quais, a regeneração do tecido mamário e a possibilidade da aplicação de tratamentos curativos e profiláticos.

Um dos objetivos da secagem é conseguir o menor número de quartos infetados no parto seguinte. Uma das formas de atingir este objetivo é através da administração de terapia antibiótica no fim da lactação em conjunto com a utilização de um protetor da ponta do teto que impeça, em simultâneo, a contaminação bacteriana (Dingwell *et al.*, 2001). Representa uma dupla oportunidade: a cura das infeções existentes no úbere e a prevenção de novas infeções. Anatômica e fisiologicamente, é um desafio para a vaca e para o úbere (Dingwell *et al.*, 2001).

O principal contra deste período é a interrupção da ordenha enquanto mecanismo específico de defesa do úbere. Apesar deste facto, a secagem é, sem dúvida, a grande oportunidade para a lactação seguinte. A profilaxia utilizada durante o período seco, pode ou não, contemplar a utilização de antibioterapia, mas deve, obrigatoriamente, estar incluída num programa de controlo de mastites que se pretenda eficaz. (Lange-Consiglio *et al.*, 2014).

O período seco é um tempo de alterações metabólicas, nutricionais e “mamárias”, com um profundo impacto na lactação futura. O organismo da vaca está alerta para o feto, que completa aproximadamente 2/3 do seu crescimento nos 60 dias anteriores ao parto e para as suas necessidades, em detrimento das necessidades da mãe (Dingwell *et al.*, 2001).

Cronologicamente, a secagem pode dividir-se em 3 fases: involução ativa, repouso e uma terceira fase constituída pela lactogénese/colostrogénese. As transições funcionais que ocorrem durante a involução da glândula, após a interrupção da lactação e subsequente crescimento da mesma durante a colostrogénese são os processos responsáveis pela elevada suscetibilidade do úbere à ocorrência de novas infeções. Após a interrupção da lactação, ocorre a involução ativa, caracterizada pela acumulação de leite e estase do úbere, que resulta no aumento da pressão intramamária e diminuição da atividade secretora. O úbere e respetivo tecido celular sofrem profundas e drásticas alterações: as cisternas, ductos e alvéolos da glândula engorgitam, a composição do leite altera-se e o tecido secretor inicia a sua regressão até à conclusão do processo involutivo. Estas alterações resultam numa secreção mamária pobre em gordura, caseína e citrato, mas com pH, concentração de lactoferrina, albumina sérica e contagem de células somáticas (CCS) elevados. Após o término deste processo, que demora aproximadamente entre 21 a 30 dias, o úbere torna-se mais resistente à ocorrência de novas infeções. À medida que o termo da gestação se aproxima, ocorre um novo período de transição que prepara o úbere para uma nova lactação e durante o qual acontece o inverso do período involutivo. Caracterizado por uma rápida e exponencial diferenciação celular, é acompanhado de um intenso crescimento com acumulação de sólidos, como gordura, citrato, lactose e α -lactoalbumina e diminuição das células somáticas de proteção. Durante esta transição, acumula-se no úbere um elevado volume de secreções, que aumentam a pressão intramamária. A secreção de colostro e as alterações a nível do canal do teto influenciam mais uma vez, a suscetibilidade à ocorrência de novas infeções intramamárias (IMI) (Dingwell *et al.*, 2003).

Como se demonstrou anteriormente, a especial sensibilidade do úbere à ocorrência de novas infeções ocorre nas fases involutivas e representa o principal motivo para a necessidade da profilaxia da secagem. Este facto está associado a uma diminuição dos mecanismos de defesa

do úbere (Bradley *et al.*, 2004). Relativamente a estes últimos, destacamos o papel da lactoferrina, enquanto imunomodelador para os leucócitos, pela sua capacidade de atuar em sinergia com a IgG1 contra a *E. coli* e a *Klebsiella* spp. e ainda como inibidor do crescimento de outras enterobactérias (Bradley *et al.*, 2004).

A taxa de novas IMI é mais elevada durante o período seco relativamente á mesma taxa durante a lactação. A taxa esperada de novas IMI durante o período seco, em quartos bacteriologicamente negativos e que na altura da secagem não são sujeitos a DCT situa-se entre os 8% e os 12% (Dingwell *et al.*, 2003).

Existem 4 pontos fundamentais a ter em conta na secagem: a duração, a produção de leite em termos quantitativos no momento da secagem, o método utilizado e a epidemiologia das IMI (infecções intramamárias) do período seco. De forma independente ou em conjunto, influenciam a saúde do úbere e a epidemiologia IMI dos pós-parto (Dingwell *et al.*, 2001).

Relativamente à duração do período de secagem, as recomendações apontam para um intervalo compreendido entre os 45 e os 60 dias. Em 1950, época em que pela primeira vez se reconheceu a importância da secagem como fator determinante na ocorrência de novas infeções, estabeleceu-se uma diferença entre “período seco” - 14 dias anteriores e posteriores ao e “verdadeiro período seco” - durante o qual a lactação é de facto interrompida (Dingweel *et al.* 2001).

Um período de secagem inferior a 45 dias traduz-se em mais leite por lactação, diminuição da suscetibilidade à ocorrência de mastites e melhoria da saúde do úbere, uma vez que os animais são secos numa fase em que fisiologicamente produzem menos leite. Por outro lado, um período de secagem mais curto implica menos alterações na dieta dos animais, vetor

facilitador da adaptação ruminal, com a consequente diminuição dos transtornos metabólicos característicos do pós-parto (Bernier-Dodier *et al.*, 2011).

No entanto, concluiu-se posteriormente que períodos de secagem com duração inferior a 40 dias ou a completa inexistência de secagem são fatores que podem estar implicados na menor produção de leite na lactação subsequente. Existem duas hipóteses que podem ajudar a explicar esta relação. A primeira está relacionada com as reservas de gordura corporal, comprovadamente a produção de leite implica um elevado consumo de energia, períodos de secagem curtos ou inexistentes podem comprometer o restabelecimento da gordura corporal no pré-parto (Bernier-Dodier *et al.*, 2011). No entanto, foi reportado que vacas em lactação contínua ou com períodos de secagem muito curtos perdem menos peso no pós-parto, o que contraria esta hipótese (Bernier-Dodier *et al.*, 2011).

A interferência da regulação endócrina da produção de leite no período de gestação tardio na preparação da glândula mamária para a próxima lactação, constitui a segunda hipótese, que pressupõe que lactações contínuas ou com períodos de secagem muito curtos impedem a regeneração do tecido mamário. Alguns estudos demonstraram que o “turnover” das células da glândula mamária é menor em animais sujeitos a lactações contínuas ou períodos de secagem muito curtos, relativamente a animais com períodos de secagem convencionais, facto mais notório em animais primíparas (Bernier-Dodier *et al.*, 2011).

O segundo aspeto mencionado é o método utilizado para secar o leite. Numa amostragem constituída por 188 animais em secagem (Dingwell *et al.*, 2001), a taxa de IMI no pós-parto em vacas secas de forma radical foi de 45.1%, por oposição aos 43.3% apresentados por animais secos de forma gradual. Este foi o primeiro indicador de que o método de secagem influencia de alguma forma, a taxa de novas infeções. A dieta pode ajudar a contornar este obstáculo.

Exemplo: fornecer apenas palha ou feno durante a semana em que o animal vai secar, de forma a baixar de forma rápida a produção de leite. Estes últimos investigadores referem no seu estudo a restrição de água, no entanto, por fatores associados ao bem-estar animal, discordamos desta prática.

A alteração da dieta conduz a um importante aumento no plasma dos ácidos gordos não esterificados e beta-hidroxibutirato. Elevados títulos plasmáticos dos ácidos Gordos Não Esterificados diminuem a atividade linfocitária (Ster *et al.*, 2010). Apesar disto, o benefício antecipado da rápida diminuição da produção de leite mascara este facto.

Para a secagem das vacas utilizam-se sobretudo 2 métodos principais, a secagem gradual ou intermitente e a secagem abrupta.

A secagem abrupta caracteriza-se pela interrupção total e de forma radical da ordenha. É importante ter em consideração o nível produtivo do animal, como será demonstrado posteriormente. O facto de a glândula ficar repleta de leite pode contribuir para lesões nos quartos que servem como porta de entrada para bactérias e outros organismos patogénicos com a consequente colonização da glândula. A diminuição da produção de leite reportada neste método de secagem situa-se entre os 3 e os 10.4% (Dingwell *et al.*, 2001).

O outro fator que contribui para o aumento do risco de IMI, quando se utiliza a secagem abrupta, tem que ver com o volume de leite na glândula conter concentrações mais baixas dos fatores naturais de proteção como a lactoferrina, imunoglobulinas e fagócitos (Lange-Consiglio *et al.*, 2014).

A secagem gradual consiste em ordenhar o animal apenas uma vez por dia, durante 14 dias, como período mínimo. Estudos demonstram que este método permite diminuir a produção

do animal na última semana antes da secagem a valores situados entre os 22% e os 47%. Por oposição ao demonstrado no ponto anterior, a diminuição gradual da produção de leite na altura da secagem, contribui para o aumento da imunidade do úbere na fase precoce deste período, uma vez que minimiza os fatores de risco anteriormente descritos (Dingwell *et al.*, 2001).

A quantidade de leite produzida no momento em que se decide secar o animal pode representar um problema. Uma produção 5 l acima dos 12.5 l no momento da secagem aumenta o risco de IMI no pós-parto em aproximadamente 77% (Rajala-Schultz *et al.*, 2005). Apesar dos números, não está estabelecido qual o nível de produção à secagem que pode, de facto, influenciar a ocorrência de novas infeções no pós-parto.

A secagem é o ponto-chave da lactação seguinte e, como tal, o momento ideal para implementar algum tipo de profilaxia intramamária e sistémica, quando justificável. Existem várias razões para considerar uma abordagem diferenciada em termos de antibioterapia na pré-secagem: a utilização de antibióticos, as resistências e os intervalos de segurança estão em permanente escrutínio por parte dos consumidores; muitos animais que recebem antibioterapia na altura da secagem não estão de facto infetados o que permite a utilização apenas de selante (Cameron *et al.*, 2014, Huxley *et al.*, 2002).

A epidemiologia das IMI, que ocorrem durante o período seco está bem documentada, assim como a importância das infeções que persistem na lactação seguinte. O risco de novas IMI provocadas por microrganismo ambientais é alto em comparação ao apresentado por microrganismo patogénicos contagiosos, como por exemplo, *S. aureus* e o *S. agalactiae* (Halasa *et al.*, 2009). A incidência de novas infeções e a altura em que estas ocorrem podem contribuir de forma importante para implementação, com sucesso, de estratégias de controlo (Dingwell *et al.*, 2009).

Os quartos infetados com os agentes maiores apresentam um risco acrescido de desenvolverem novas IMI no período seco e persistirem na lactação seguinte. No que concerne aos agentes menores, alguns estudos demonstraram que a presença destes pode funcionar como uma barreira protetora contra o desenvolvimento de novas infeções provocadas pelos patógenos maiores (Dingwell *et al.*, 2003).

Um dos grandes objetivos da secagem é conseguir o menor número de quartos infetados na lactação subsequente e uma das formas de o conseguir passa pela administração de antibiótico intramamário no fim da lactação.

O conhecimento da epidemiologia dos agentes é fundamental para implementar as estratégias de controlo mais eficazes (Bexiga, 2011), a importância da implementação de estratégias de controlo das mastites bovinas é reconhecida há mais de 50 anos (Dingwell *et al.*, 2003).

Estão presentes na epidemiologia das IMI tanto os agentes contagiosos como os ambientais (tabela 1), classificados desta forma em função da adaptação ao úbere e forma de infeção, ou, se nos referimos ao seu impacto na saúde do úbere e no impacto em termos de CCS, em agentes patogénicos “maiores” e agentes patogénicos “menores” (tabela 2).

Tabela 1 – Agentes etiológicos contagiosos e ambientais (Adaptado de Blowey e Edmonson, 1999).

Agentes Contagiosos	Agentes Ambientais
<i>St. aureus</i>	<i>E. coli</i>
<i>Strep. agalactiae</i>	<i>Strep. uberis</i>
<i>Mycoplasma spp.</i>	<i>Staphylococcus coagulase-negativos</i>
<i>Arcanobacterium bovis</i>	<i>Strep dysgalactiae</i>
<i>Strep. dysgalactiae</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Proteus spp.</i>
	Algas, leveduras e fungos

Tabela 2 – Agentes etiológicos classificados em função do seu impacto na saúde do úbere (adaptado de Bexiga, 2011).

Agentes patogénicos “maiores”	Agentes patogénicos “menores”
<i>St. Aureus</i>	<i>Staphylococcus coagulase-negativos</i>
<i>Strep. agalactiae</i>	<i>Arcanobacterium bovis</i>
<i>Strep. dysgalactiae</i>	
<i>Strep. uberis</i>	
<i>E. coli</i> e outros Gram negativos	
<i>Mycoplasma bovis</i>	

A epidemiologia das IMI durante o período seco foca-se sobretudo nos agentes ambientais devido á continua exposição dos animais a estes últimos, no entanto, não devemos descartar os agentes contagiosos, uma vez que a secagem constitui a única oportunidade para eliminar estas infeções (Dingwell *et al.*, 2003).

Segue-se uma breve descrição dos agentes mais frequentes isolados no nos leites da pré-secagem dos animais presentes neste trabalho.

Staphylococcus aureus

Agente altamente contagioso, ubiqutário no ambiente, representando os úberes infetados o seu maior reservatório (Aires, 2010). É um coco gram-positivo, hemolítico, anaeróbio facultativo, catalase positivo, coagulase positivo, não esporulado (Midleton, 2013).

Associado frequentemente a causa de IMI subclínicas, que se tornam crónicas e refratárias aos tratamentos intramamários com base na antibioterapia numa elevada percentagem de casos, pode, no entanto, provocar mastite gangrenosa aguda, quando produz grandes quantidades de toxina (Blowey e Edmonson, 1999).

O impacto económico na exploração do *S. aureus* está relacionado com o aumento da CCS no leite, fator penalizador do pagamento, e diminuição da quantidade de leite produzida devido á destruição do parênquima celular. A maioria das infeções por *S. aureus* ocorre durante a ordenha, através do orifício do teto, passando pelo canal até à colonização da glândula. As lesões de hiperqueratose previamente existentes podem favorecer a entrada deste patógeno. Uma vez na glândula mamária, o *S. aureus* adere às células mamárias epiteliais, diminuindo a probabilidade de a bactéria ser excretada da glândula em conjunto com o leite. A primeira defesa

da glândula face este microorganismo é a fagocitose da bactéria por parte dos neutrófilos. No entanto, presença do leite e os fatores antifagocíticos como a proteína A, a cápsula e a pseudocápsula, diminuem as propriedades fagocitária dos neutrófilos e que impedem a penetração dos antibióticos (Blowey e Edmonson, 1999; Rebhun, 1995).

Outro fator que contribui para dificultar a expulsão do *S. aureus* é a diminuta concentração de anticorpos de opsonização e complemento, que facilitam a captação do agente pelos neutrófilos, no leite.

Algumas experiências (Blowey e Edmonson, 1999) demonstraram que uma vaca que elimina *S. aureus* no leite pode infectar os tetos das 6 a 8 vacas que se lhe seguem na ordenha, daí que seja tão importante ordenhar as vacas infectadas em último lugar.

No período de secagem, o tratamento deve ser feito com base nos perfis de sensibilidade do antibiograma, mas o refugo dos animais cronicamente infectados é sempre uma hipótese a ter em consideração, no caso de ser difícil implementar medidas de controlo como a vacinação (Startvac ®), plano dos 10 pontos (NMC, 1999) e o não aproveitamento do leite descartado para alimentação dos juvenis da exploração.

Streptococcus agalactiae

Coco Gram positivo, catalase negativo, de aspeto azul em meio de Edwards. É um agente que sobrevive durante pouco tempo no ambiente, mas que pode persistir na glândula mamária por longos períodos (Maroney e Ruegg, 2005).

A maior fonte de infecção é o úbere de vacas infetadas, mas um ambiente contaminado contribui igualmente para a sua propagação. É altamente contagioso, e tal como o *S. aureus*, a sua transmissão ocorre sobretudo durante a ordenha, quer através da máquina, quer através das mãos do ordenhador e utensílios comuns.

É causa comum de mastite, mas cuja erradicação das explorações de leite é possível, uma vez que é um agente sensível à maioria dos antimicrobianos disponíveis e o custo do tratamento é compensatório.

Os animais infetados com *S. agalactiae* não mostram muitos sinais clínicos, para além das alterações macroscópicas evidentes no leite produzido (aspeto mais aquosos) descida na produção e CCS elevada. Devemos suspeitar da entrada de *Strep. agalactiae* numa exploração quando ocorre o aumento súbito e repentino da contagem das células somáticas (1.000.000 células/ml) que persiste no tempo, em associação com a quebra na produção.

Em termos epidemiológicos, o agente coloniza e infecta a cisterna e os condutos, provocando inflamação da glândula. A acumulação dos detritos produzidos pela bactéria intensifica a resposta inflamatória, resultando na destruição do tecido secretor, diminuição da produção de leite e eventualmente agalactia.

À semelhança dos outros microrganismos, a terapia de secagem, associada ao refugo dos animais cronicamente infetados, representa uma excelente oportunidade para controlar a prevalência de *S. agalactiae* numa vacaria. No entanto, e como referido anteriormente, a boa resposta do agente a protocolos de tratamento com base na antibioterapia, tem uma relação custo/benefício bastante eficaz, sendo muito vantajoso a sua implementação numa exploração.

Mycoplasma spp.

Apesar de não ter sido isolado em nenhum dos leites analisados, pela importância que cada vez mais assume, sobretudo o *Mycoplasma bovis*, não poderíamos deixar de mencionar este microorganismo. À semelhança dos anteriores, os micoplasmas são igualmente contagiosos, surgem com menor frequência, são geralmente diagnosticados em vacarias com surtos de mastites clínicas que resistem à terapêutica antibiótica. Associado a estes surtos, precedido em alguns casos pelo aparecimento de doença respiratória (o micoplasma é ubíquo do trato respiratório) e alterações articulares (Rebhun, 1995), está a introdução de novos animais infetados.

Os animais são infetados independentemente da idade e da fase da lactação, mostram inicialmente mastites clínicas que evoluem para crónicas. A transmissão ocorre durante a ordenha, sobretudo em ambientes com más práticas de higiene, por via horizontal, especialmente em locais de ventilação deficiente, ocorrendo a dispersão do agente desde o aparelho respiratório até ao úbere. O sêmen e leite contaminado assim como alguns fomites podem servir como meio de transmissão (Ruegg, 2000).

Devemos suspeitar de micoplasma sempre que um elevado número de animais apresenta mastites em mais do que um quarto, mas continua com apetite e com sinais pouco evidentes de doença sistémica. Como já foi referido, a maioria dos casos é não responsiva ao tratamento e os animais afetados diminuem drasticamente a produção de leite.

Mycoplasma spp. pode causar alterações permanentes no tecido secretor da glândula, por exemplo, fibrose, abscessos revestidos por uma fina parede e linfadenite supramamária. Perante este facto, os meios para controlar o *Mycoplasma spp.* são em primeiro lugar, a aplicação de medidas de biossegurança na exploração, de forma a limitar a entrada do agente. Perante a

evidência dos animais positivos, deve sempre considerar-se o refugo, porque apesar de *in vitro* surgirem referências a sensibilidades a fluoroquinolonas, florfenicol e tiamulina, a antibioterapia tem-se mostrado ineficaz (Rosenbush *et al.*, 2005). Os animais positivos devem ser separados e identificados e o seu leite não pode ser aproveitado para alimentar os animais jovens.

Arcanobacterium bovis

Isolado com muita frequência em subclínicas, surge com menor frequência associado a mastites clínicas (Bradley *et al.*, 2007).

O impacto das IMI provocados por *Arcanobacterium* spp. na CCS é baixo (Schunkken *et al.*, 2009) talvez porque o isolamento da bactéria no leite nem sempre constitui a causa primária da inflamação da glândula mamária, significando em alguns casos apenas a colonização do canal do teto com a subsequente contaminação da amostra de leite (Bexiga, 2011). Apresenta baixa resistência à antibioterapia.

Em termos epidemiológicos, na literatura disponível, foi considerado um microorganismo contagioso por ter a glândula mamária e canal do teto como principal fonte de infeção, transmitindo-se vaca a vaca (Fox e Gay, 1993) e um agente menor devido ao baixo impacto na CCS do tanque (Aires, 2010) cujo isolamento ocorre com maior frequência em explorações nas quais a desinfeção dos tetos após a ordenha é deficiente ou inexistente. É um bacilo Gram positivo e catalase positivo.

O período seco é o ideal para efetuar o tratamento entre lactações e o que apresenta maiores taxas de sucesso na prossecução da erradicação da bactéria.

***Staphylococcus* coagulase-negativa**

Historicamente os *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCN) nem sempre foram identificados como espécie, uma vez que a distinção entre si não era totalmente clara, e porque os diferentes elementos do grupo apresentam características e impacto clínico muito semelhante. Cocos gram-positivos, catalase positivos, distinguem-se do *St. aureus* pelo teste da coagulase. Este teste deteta a presença de coagulase, uma enzima comumente expressada pelo *St. aureus*, (Bexiga, 2011).

O grupo de SCN tem assumido crescente importância e atenção da parte dos investigadores. Durante a última década os SCN surgem num elevado número de estudos como o grupo identificado com maior frequência em amostras de leite proveniente de animais com mamites clínicas ou subclínicas.

Classificados como agentes menores, devido ao baixo impacto na saúde do úbere e na CCS, podem, no entanto, ser a razão de elevadas perdas em casos de prevalências elevadas (Aires, 2010).

Na maioria dos animais infetados pode ocorrer a cura espontânea, no entanto respondem positivamente à antibioterapia com base em penicilinas, ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas e tetraciclina. Considerados como parte da flora oportunista que coloniza os tetos durante a secagem, podem estar na origem IMI intramamárias em novilhas (Dingwell *et al.*, 2003).

Streptococcus dysgalactiae

Geralmente identificado como um agente ambiental, apresenta algumas características do grupo dos microrganismo contagiosos, como a transmissão vaca a vaca (NMC, 1999). Coco gram-positivo, catalase negativo, colónias verdes em meio de Edwards, adere às células epiteliais, nas quais pode permanecer por longos períodos de tempo, sem perda de viabilidade.

Sobrevive nas amígdalas e a partir daqui, por lambedura, contaminar os tetos. Por vezes os animais infetados apresentam febre e inflamação do úbere, sendo o diagnóstico definitivo confirmado por cultura microbiológica. Responde facilmente a protocolos que incluam a desinfecção dos tetos no pré e pós-dipping assim como á antibioterapia de secagem, com base em penicilinas, cloxacilina e cefalosporinas (Rebhun, 1995).

O controlo passa por melhorar as condições de higiene da sala de ordenha e camas e por técnicas de manejo que visem a conservação da integridade dos tetos.

Escherichia coli

Bacilo gram-negativo, oxidase negativo, colónias cor-de-rosa em meio MacConkey. É o microorganismo ambiental que provoca maior número de mastites, existe em grande quantidade nas fezes, determinando que a infeção ocorra sobretudo em vacas estabuladas, especialmente em instalações com práticas de higiene e manejo deficientes.

Os sintomas da mastite típica por *E. coli* incluem os quartos quentes, muito duros e inflamados, com secreção aquosa. Uma percentagem de vacas manifesta uma intensa reação de choque, que pode provocar a morte num curto espaço de tempo (por vezes em horas), devido ao

efeito da libertação de uma endotoxina, um lipopolisacarídeo (LPS) derivado da parede das células bacterianas. Este LPS é eliminado pelos PMN, que por sua vez libertam grânulos lisosômicos que exacerbam a reação de choque.

Sempre que existe penetração bacteriana nos condutos de menor calibre e nos seios lactíferos da glândula, ocorre uma multiplicação massiva bacteriana que pode lesionar os vasos sanguíneos. É por esta razão que em muitos casos associados a mastite por *E. coli* é vulgar encontrar uma secreção aquosa avermelhada, característica à qual os produtores chamam “mastite de aguadilha” ou, os mais românticos, de “vinho do Porto”. Estes casos podem conduzir a um processo agudo gangrenoso, com subsequente desprendimento do tecido do úbere.

Ao contrário do que acontece com o *S. aureus* e o *S. agalactiae*, a *E. coli* não adere ao revestimento endotelial do teto e da cisterna do úbere, razão pela qual não é frequente encontrar animais cronicamente infetados.

Durante a secagem, e devido à existência da lactoferrina (Blowey e Edmonson, 1999), as infeções por *E. coli* são raras, mas é necessário vigiar os animais e sobretudo preconizar práticas de higiene eficazes, uma vez que algumas preparações de antibióticos para vacas secas têm indicação para a bactéria em questão.

Outros Coliformes

O grupo genérico dos coliformes engloba agentes de *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp., entre outros. São bacilos gram-negativos, oxidase negativos e fermentadores da lactose.

Devido à importante percentagem que foi isolada neste trabalho, iremos abordar a *Pseudomonas* spp. Tipicamente provem de águas contaminadas utilizadas para a lavagem dos úberes. Os animais podem infetar-se ainda, por exemplo, quando não se deitam no cubículo, mas nos corredores, onde existem normalmente pequenos “charcos” de água, pelo menos esta tem sido a nossa observação ao longo dos anos. Um fator adjuvante é o facto de sobreviver a baixas temperaturas (NMC, 1999).

Os sinais clínicos são muito variáveis, desde a mastite tóxica até casos crónicos recidivantes (Blowey e Edmonson, 1999). O fato de viver no interior das células do úbere, torna a bactéria inacessível á maioria dos tratamentos com base em antibiótico uma vez que a bactéria vive

Streptococcus uberis

Agente patogénico muito importante do úbere, é o segundo organismo ambiental que mais frequentemente provoca mastite. São cocos Gram-positivos, catalase negativo, ubiqüitários nas explorações pecuárias. A maioria das infeções ocorre nos primeiros meses de lactação ou no final do período de secagem (Radostits *et al.*, 2007).

O principal reservatório da bactéria é o ambiente, como as camas, chorumes, pasto, etc. Novas infeções podem atingir novilhas e vacas antes do parto, o que prova que o organismo não se transmite animal a animal, durante a ordenha. As IMI causadas por *S. uberis* podem ser clínicas, acompanhadas de edema do quarto infetado, dor, febre e inapetência (Aires, 2009) ou subclínicas (Zadoks *et al.*, 2002).

O leite pode apresentar-se com alterações, entre as quais aspeto mais aquoso. Em termos de tratamento, está recomendado a administração local e intramamária de penicilinas, amoxicilia, eritromicina e cefalosporinas (Rehum,1995), embora possa ocorrer cura espontânea (Radostits *et al.*, 2007). A terapia de secagem mostra-se bastante eficaz (Aires, 1999).

Algas, Fungos e leveduras

São organismos que crescem lentamente em agar-sangue, o meio ideal para o seu crescimento é agar-Saboraud (Blowey e Edmonson, 1999). Incluem-se neste grupo o género *Candida* como exemplo de leveduras, a *Prototheca zopffi*, uma alga e o *Aspergillus fumigatus*, um fungo.

São agentes ambientais e podem ter uma incidência elevada em explorações com má arquitetura ou número insuficiente de camas, nas quais uma grande quantidade de animais se deita fora dos cubículos; relacionando-se ainda com práticas de ordenha nas quais se lavam os tetos, mas não se secam antes de colocar as unidades de ordenha. Identificam-se cada vez com maior frequência e provocam mastite com sinais clínicos evidentes, como a tumefação e inflamação do (s) quarto (s) afetado (s) e alteração do leite, com coágulos grandes, brancos e muito espessos. Sistemicamente podem ou não apresentar febre.

O tratamento com antibiótico é totalmente ineficaz, por vezes apresentam alguma sensibilidade a antimicóticos (Bexiga, R. 2003). A melhor forma de controlar a afeção consiste na separação e refugio dos animais afetados. Alguma bibliografia recomenda a imersão ou infusão dos tetos em iodo.

TRATAMENTOS

A prevenção das IMI durante o período seco assenta em dois princípios básicos, minimizar a contaminação bacteriana com origem no ambiente e reforçar a imunidade da glândula mamária (Bradley e Green, 2004).

A utilização de antibiótico intramamário durante o período seco é por um lado, uma forma de prevenir a ocorrência de novas IMI e por outro, a forma de eliminar as infeções subclínicas pré-existentes no momento da secagem (Petrovski *et al.*, 2011).

A utilização de selantes internos (ITS), sozinhos ou numa terapia combinada, é uma medida preventiva que constitui uma alternativa aos programas de secagem tradicionais, baseados apenas na utilização de antibiótico intramamário.

A utilização da terapia antibiótica utilizada durante a secagem foi implementada a partir de 1940, no Reino Unido, com o propósito de controlar a mastite com origem no *Aracnobacterium pyogenes*. A partir de 1960, passou a estar incluída no “Plano dos 5 Pontos”, com o objetivo de curar as IMI pré-existentes e prevenir a ocorrência de novas infeções durante o período seco (Huxley *et al.*, 2002).

Na América do Norte, a principal estratégia utilizada durante a secagem é a aplicação de antibiótico intramamário (IMM) de longa-Ação (Cameron *et al.*, 2014) por recomendação do National Mastitis Council, como um ponto do programa de controlo de mastites.

A aplicação de um antimicrobiano de secagem, em todos os quartos, de todas as vacas (BDCT- *blanket dry cow therapy*) desempenhou um importante papel na redução da prevalência dos microrganismo contagiosos com a consequente redução da contagem de células somáticas

(CCS) do tanque. (Cameron *et al.*, 2014). No entanto, existe alguma controvérsia relativamente a este assunto, derivada da necessidade, ou não, da aplicação indiscriminada de antibiótico em todos os quartos (Dingwell *et al.*, 2003).

As razões para evitar a utilização profilática de antibióticos incluem o custo, a relação custo/benefício associado ao tratamento de quartos não-infetados, as possíveis emergências de mecanismos de resistência aos antibióticos e o risco do aparecimento de resíduos de antibiótico na cadeia alimentar (Dingwell *et al.*, 2003). A discussão sobre este assunto sobe de tom a partir do momento que a classe consumidora começa a demonstrar cada vez maior preocupação relativamente á relação da utilização de antimicrobianos e o aparecimento de resistências.

Com a utilização da antibioterapia intramamária conseguem-se, por um lado, elevadas taxas de curas (Bradley *et al.*, 2004; Halasa *et al.*, 2009) e, por outro, alguma efetividade no controlo das novas IMI na fase precoce do período seco. Ainda assim, a ocorrência de IMI continua a surgir devido às resistências demonstradas por alguns patogénicos ou por falha da concentração mínima inibitória (Oliver *et al.*, 1990; Bradley *et al.*, 2004).

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

A relação entre a utilização de antimicrobianos e o desenvolvimento de resistências não é totalmente claro ou conclusivo (Call *et al.*, 2008; Rajala-Schultz *et al.*, 2009; Saini *et al.*, 2012).

Acresce a estes argumentos o facto de a utilização de antimicrobianos ser um fator que sempre contribuirá para o desenvolvimento de resistências (Call *et al.*, 2008) obrigando à correta implementação e utilização dos programas de qualidade do leite.

A utilização de selantes internos (ITS) permite ultrapassar alguns dos obstáculos referidos anteriormente (Cameron *et al.*, 2014). Os ITS representam uma alternativa à DCT em quartos comprovadamente não infetados, isenta de antibiótico, que pode ser utilizada na prevenção das IMI durante o período de secagem, uma vez que previnem a entrada de microrganismo patogénicos a partir da ponta do teto (Huxley *et al.*, 2002; Dingwell *et al.*, 2003; Cameron *et al.*, 2014).

A efectividade da utilização dos ITS está bem documentada na literatura (Berry *et al.*, 2002; Huxley *et al.*, 2002; Cook *et al.*, 2005; Sanford *et al.*, 2006, Cameron *et al.*, 2014). Em alguns estudos que compararam a utilização de ITS com a DCT em quartos não infetados no momento da secagem, o comportamento das duas estratégias foi em tudo semelhante (Woolford *et al.*, 1998; Sanford *et al.*, 2006), o que sugere que os ITS podem ser utilizados sozinhos em quartos não infetados.

A utilização de ITS limita a exposição dos tetos e, consequentemente, de toda a glândula à invasão bacteriana. A sua Acção pode ser condicionada apenas pelo tempo de persistência no teto. Foi reportado que tetos “abertos”, ou seja, sem um tampão de queratina, são mais sensíveis a infeções relativamente a tetos “fechados” (Berry *et al.*, 2002).

De referir ainda que existe um crescente interesse, devido ao aumento do número de explorações orgânicas que vendem leite a um preço bastante atractivo, e representam um nicho de mercado em expansão. No entanto, estão impedidas de utilizar determinados tipos de antibióticos, ainda que com fins profiláticos, caso da antibioterapia de secagem.

Os ITS mimetizam os mecanismos fisiológicos que “fecham” o canal do teto (Rabiee e Lean, 2013) e são uma ferramenta importante para prevenir as IMI (Godden *et al.*, 2003).

Após a secagem, forma-se naturalmente um tampão de queratina no canal do teto, que desempenha um papel muito importante na defesa contra as IMI, uma vez que constitui não apenas uma barreira física contra a entrada de microrganismo patogénicos, mas igualmente como inibidor do crescimento bacteriano, devido á presença de ácidos gordos esterificados e não esterificados na queratina (Bradley *et al.*, 2004). No entanto, e uma vez que se verifica que a formação deste tampão, que desaparece em média 10 dias após o parto (Bradley *et al.*, 2004), não funciona uniformemente em todos os animais (num estudo histológico realizado em tetos excisados, a observação mais precoce da formação do canal de queratina ocorreu no dia 16 da secagem; Dingwell *et al.*, 2003) foram estudadas ao longo dos últimos 30 anos formas de artificialmente conseguir o encerramento do canal do teto durante a secagem (Woolford *et al.*, 1999).

A primeira pessoa a desenvolver um selante interno, contendo subnitrato de bismuto foi Meaney em 1977, que demonstrou igualmente a efetividade do mesmo na prevenção de IMI (Rabiee e Lean, 2013).

Posteriormente, tanto Meaney como Woolford provaram a eficácia da utilização de ITS em conjunto com antibioterapia intramamária na redução da incidência das IMI e mamites clinicas (Rabiee e Lean, 2013). Este facto continuou a ser demonstrado ao longo dos anos, em estudos posteriores sendo consensual atualmente a vantagem da utilização dos ITS.

A utilização de um protocolo de secagem que inclua ITS e a administração de antibiótico em todos os tetos, assegura, no entanto, que todos os quartos recebem algum tipo de proteção contra as infeções IMM. (Berry *et al.*, 2002; Huxley *et al.*, 2002; Sanford *et al.*, 2006; Cook *et al.*, 2005).

Em Portugal existem 3 formulações comerciais disponíveis, cuja substância ativa é o subnitrato de bismuto, mas que variam nos excipientes utilizados.

2. OBJECTIVOS

O principal objetivo do presente trabalho foi avaliar a utilidade da identificação de agentes etiológicos presentes no leite de vaca na pré-secagem, como critério de seleção da estratégia preventiva a aplicar durante a secagem.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho dividiu-se em duas partes. Na primeira, foi realizado um inquérito a 68 explorações da região do Entre Douro e Minho, fundamentalmente dos conselhos da Póvoa de Varzim, Barcelos, Vila do Conde, Famalicão e Braga, com o intuito de caracterizar as práticas e hábitos relativos ao maneio da secagem de acordo com o inquérito em anexo.

Na segunda parte, seleccionamos 7 explorações, com CCS inferiores a 250.000 (Pantoja *et al.*, 2009; Cameron *et al.*, 2014) para caracterizar os agentes etiológicos prevalentes de mastites no anteparto e a sua resposta ao tratamento no início do período de secagem (Godden *et al.*, 2003; Green *et al.*, 2004; Sanford *et al.*, 2006).

3.1. Explorações e animais - caracterização

Das explorações do Entre Douro e Minho, foram seleccionadas 7 explorações com CCS inferiores a 250.000 e que se caracterizam na tabela 3:

Tabela 3 – Caracterização das explorações.

Exploração	Concelho	Animais Lactação	Animais Secagem	Tipo Ordenha	Nº Ordenhas por Dia	Teor Butiroso	Teor Proteico	CCS (X1000)
1	PVZ	115	16	MEC	2	3.9	3.35	150
2	PVZ	150	17	ROB	2.5	3	3.3	250
3	PVZ	179	15	MEC	2	3.6	3.3	250
4	VC	35	7	MEC	2	3.4	3.18	130
5	PVZ	55	6	MEC	2	3.8	3.0	<200
6	PVZ	52	6	MEC	2	3.8	3	<200
7	PVZ	90	20	MEC	2	3.7	3.2	<100

As vacarias 2 e 6 vacinam com Startvac ® a "varrer" e a vacaria 1 utiliza um protocolo de 3 administrações. A exploração 1 utiliza uma vacina de rebanho, com revacinações semestrais. Em cada uma das explorações, foram selecionadas as vacas com parto previsto entre Outubro de 2014 e Janeiro de 2015, sem mamite clínica na altura da recolha da amostra e com um período de secagem de 60 dias.

Não foi tomado em conta o número de partos, os dias de lactação ou o nível produtivo, a CCS individual bem como a história pregressa de mastite. Em resumo, não existiu nenhum tipo de diagnóstico e foi considerada apenas a data prevista de parto.

3.2. Recolha de amostras no pré e pós-parto

Recolheram-se assepticamente amostras de leite dos quatro tetos dos animais selecionados, durante a semana anterior à data prevista de secagem. As pontas dos tetos foram previamente limpas com uma compressa e álcool a 70%, após a limpeza comum a que todos os tetos são submetidos antes da ordenha.

Os primeiros 2 ou 3 jatos de leite devem ser descartados, uma vez que as células e bactérias que apresentam apenas refletem a contaminação do canal do teto, e não o leite da glândula mamária em geral (Radostits *et al.*, 2007). O frasco de colheita deve ser estéril e imediatamente refrigerado após a mesma.

Em média, 10 dias após o parto, recolheram-se novamente, cumprindo o mesmo protocolo: amostras de leite de cada um dos animais presentes no estudo. A colheita de leite foi feita nos quatro tetos em conjunto, apesar de as recomendações apontarem no sentido de recolher amostras individuais de cada teto (Radostits *et al.*, 2007) permitindo assim identificar quais os

tetos afetados e deste modo completar o tratamento apenas nesses, evitando gastos desnecessários com medicamentos. No entanto, e por questões económicas, optou-se pela colheita dos 4 tetos em conjunto (K.K:Reyher and I. R. Dohoo, 2011)

Constituíram a exceção as vacas que, por opção dos proprietários, foram refugadas.

3.3. Microbiologia

De cada amostra retirou-se 10 µl de leite, com uma ansa calibrada e esterilizada, semeados logo de seguida em agar columbia+5% de sangue de carneiro (BioMérieux SA ®). As placas incubaram a 37⁰C, com leituras efetuadas às 24h e 48h.

A identificação das colónias foi feita com base na morfologia, tipo de hemólise, coloração de Gram, catalase, oxidase e alguns testes bioquímicos. Os organismos gram-positivos, catalase positivos, foram divididos em SCN ou *S. aureus* dependendo do resultado na prova da coagulase. Utilizou-se a prova da esculina (BioMérieux SA ®) para diferenciar os organismos gram-positivos, catalase negativos. Os organismos que não hidrolisaram a esculina foram submetidos á prova de CAMP (Christie-Atkins-Munch-Peterson) e divididos em CAMP negativos (*Streptococcus spp.*) e CAMP+ (*S. agalactiae*). O meio seletivo de agar Mac Conkey (BioMérieux SA ®) utilizou-se para diferenciar *E.coli* de outros Gram-negativos.

As placas com 3 ou mais colónias consideraram-se contaminadas. As que apresentaram menos de 5 ou ausência total de colónias foram classificadas como sem crescimento (Pantoja *et al.*, 2009; Petrovski *et al.*,2011).

3.4. Tratamentos realizados no período que antecedeu a secagem

A importância do período seco na dinâmica das IMI está bem determinada (Green *et al.*, 2007). A glândula mamária é particularmente sensível a novas IMI nas fases iniciais e finais do período seco, ou seja, na involução e na colostrogenese (Godden *et al.*, 2003).

Além dos fatores referidos anteriormente como o nível de produção no momento da secagem ou o manejo deste período, a velocidade de involução do úbere e a condição/contaminação dos tetos condicionam, igualmente, o sucesso da secagem (Godden *et al.*, 2003).

Relativamente às IMI presentes no período não lactante, estas podem ter duas origens diferentes: ou são provenientes da lactação anterior ou são novas infecções adquiridas durante o período seco (Green *et al.*, 2007). A probabilidade da vaca durante contrair novas infecções durante a secagem está relacionada com a exposição do animal a potenciais agentes patogénicos, por exemplo, com origem no ambiente, com fatores individuais que condicionam a suscetibilidade do animal à infecção e com a proteção efetiva conferida pelos protocolos de secagem que utilizem antibiótico e selante, em conjunto ou separadamente (Berry e Hilerton, 2002; Huxley *et al.*, 2002; Bradley e Green, 2011).

Com base nestes princípios, os protocolos de secagem efetuados aos animais presentes neste trabalho, incluíram a administração de antibiótico intramamário após a última ordenha da lactação, a utilização de selante em todos os quartos e a administração IM ou SC de antibiótico injetável 3 semanas antes da data prevista de parto (Dingwell *et al.*, 2002; Godden *et al.*, 2003; Cameron *et al.*, 2014).

Nos animais cujo leite não apresentou crescimento, foi utilizado apenas selante (Berry *et al.*, 2002).

As vacas em cujo leite foram isoladas leveduras ou *Prototheca* spp. (Bexiga *et al.*, 2003), foram sujeitas a terapia vitamínica e aplicado ITS.

Antes da aplicação de antibiótico intramamário, os tetos foram sujeitos a desinfecção, através de um toalhete embebido em álcool. O procedimento finalizou com a imersão dos tetos numa solução iodada e com emoliente.

A justificar estes procedimentos, referimos que uso de ITS em simultâneo com a terapêutica antimicrobiana intramamária, que ajudem na proteção do canal do teto até à formação do tampão de queratina (Pyörälä *et al.*, 2008), deve ser considerado quando a vaca está exposta a ambientes com elevada carga microbiana (National Mastitis Council, n. d.).

3.5. Análise estatística

Foi realizada uma análise estatística descritiva. Utilizou-se o teste do qui-quadrado para testar diferenças entre percentagens.

4. RESULTADOS

4.1. Respostas ao inquérito

Os resultados encontram-se descritos nos gráficos seguintes (1-10). A média de dias de duração da secagem totalizou 48.75 dias.

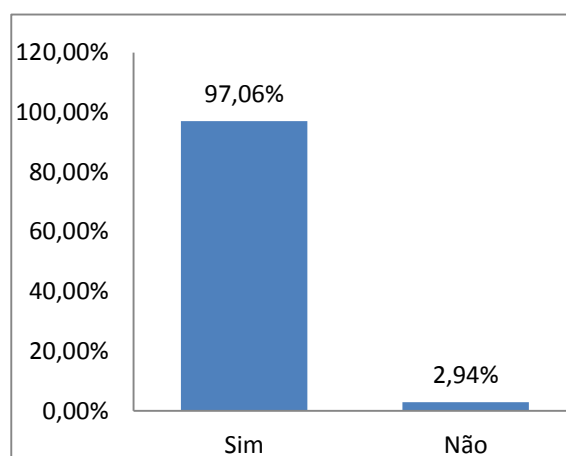


Figura 1- Percentagem das explorações que têm como procedimento a secagem.

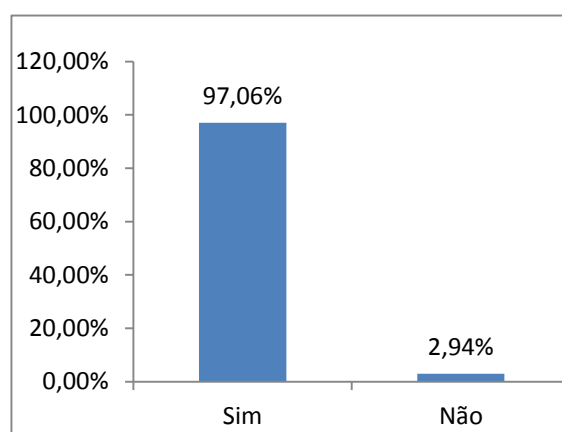


Figura 2- Percentagem das explorações que têm em atenção a produção leiteira diária no momento da secagem.

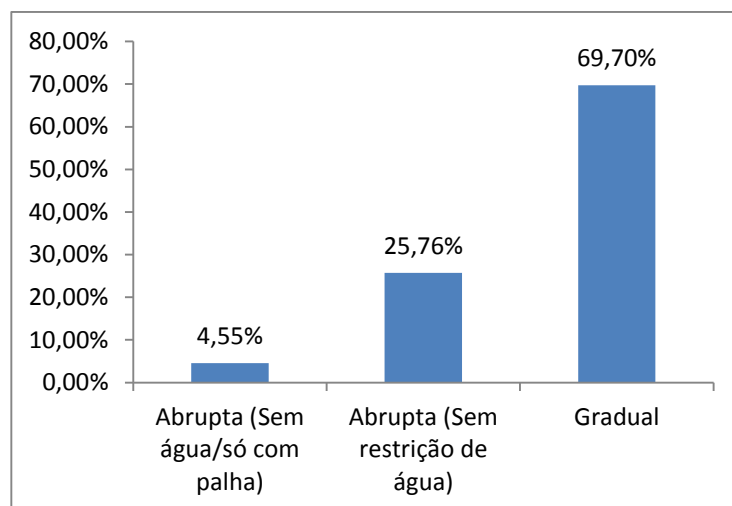


Figura 3 – Utilização percentual de diferentes métodos de secagem.

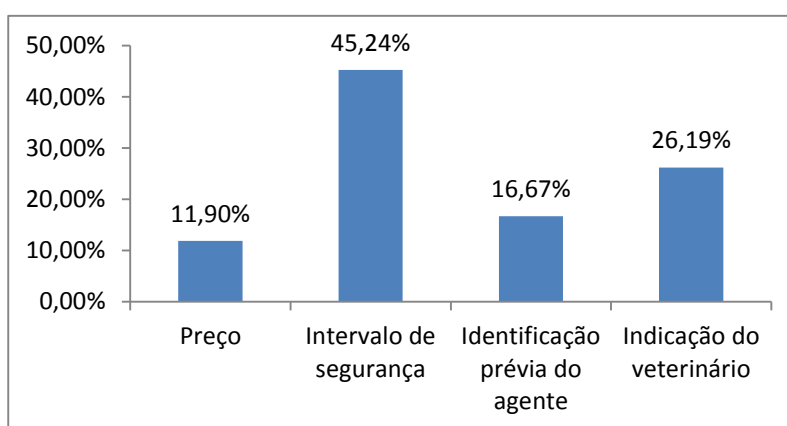


Figura 4 - Critérios de seleção da antibioterapia de secagem (preço, intervalo de segurança, identificação prévia do agente, indicação do veterinário).

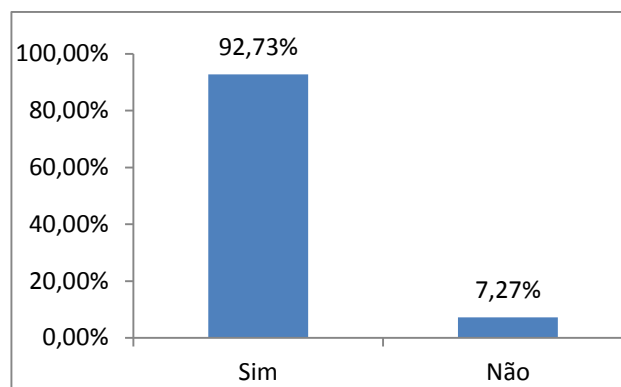


Figura 5 – Percentagem das explorações que utilizam selante.

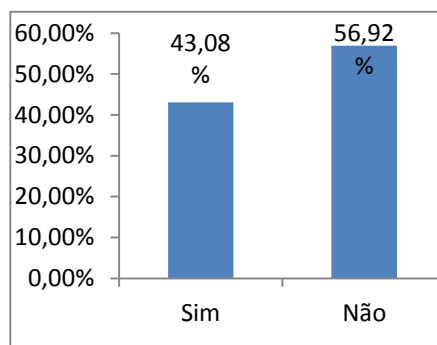


Figura 6 – Percentagem das explorações que dispõem de local específico para as vacas secas.

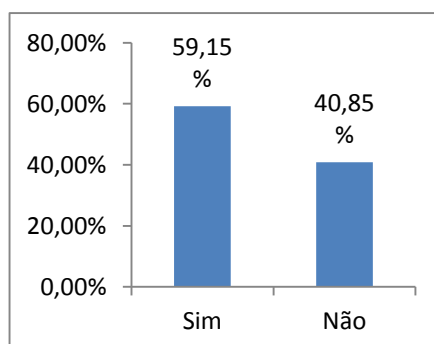


Figura 7- Percentagem das explorações que faz lote de peri-parto.

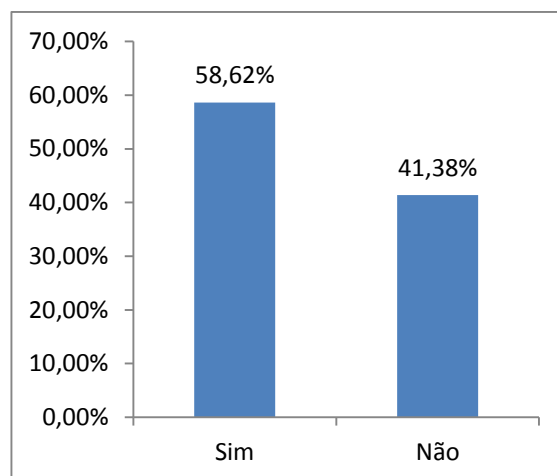


Figura 8 – Percentagem das explorações que dispõem de maternidade.

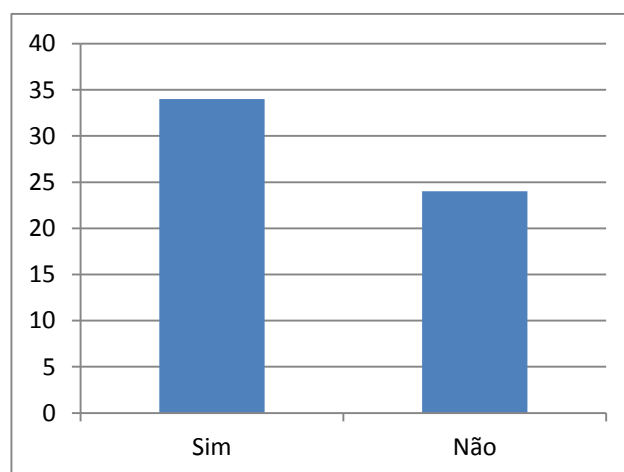


Figura 9 - Percentagem das explorações que utilizam um sistema de vigilância relativo ao aparecimento de mastites durante o período de secagem.

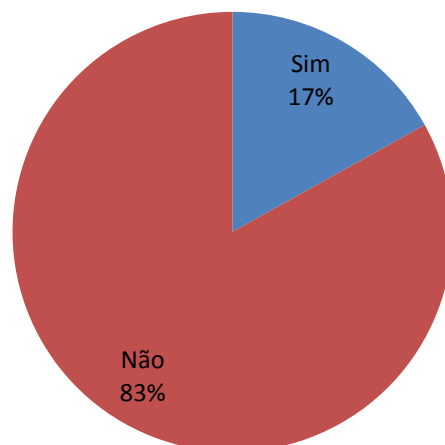


Figura 10- Percentagem das explorações com animais que apresentam mastite no momento do parto.

4.2. Caracterização dos agentes no momento da secagem

Das 246 vacas em que se procedeu ao isolamento dos agentes antes da secagem, observou-se que em 78,9% (194/246) ocorreu o crescimento de culturas bacterianas, enquanto nas restantes 21,1% (52/246; $P < 0,001$) não ocorreu qualquer crescimento. Das 7 explorações em estudo, em todas apareceram amostras contaminadas com *Arcanobacterium bovis* entre os agentes patogénicos responsáveis por mastite e, em 3 explorações, amostras com *Staphylococcus aureus*, ambos os agentes considerados como contagiosos. A figura resume os agentes presentes nas explorações analisadas.

Das vacas positivas, 17,5% (34/194) apresentavam, concomitantemente, pelo menos mais outro agente bacteriano ou levedura, sendo que as restantes apresentavam mastite só por um agente 82,5% (34/194; $P < 0,001$).

Os *estafilococos* coagulase-negativa representaram 30,9% (60/194; $P < 0,001$) do total das vacas afetadas. As restantes proporções podem ser observadas no gráfico 11.

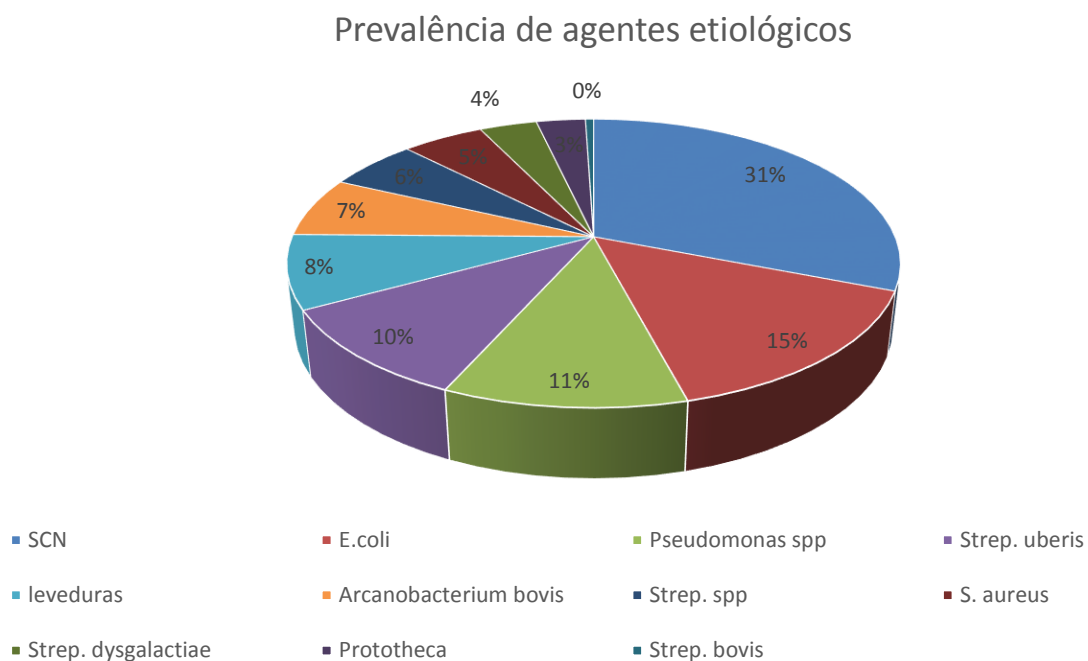


Figura 11- Prevalência de agentes etiológicos nas identificações efetuadas em leites de animais na pré-secagem, provenientes das explorações presentes no estudo. SNC- estafilococos coagulase-negativa.

4.3. Avaliação microbiológica do leite após o parto

Dos 246 animais iniciais, 7,3% (18/246) foram refugados e 1 morreu (0,4%), tendo sido analisado o leite de 92,3% (227/246) das vacas 10 dias após o parto. Nestes, apenas se observou crescimento em 7,1% (16/227) (gráfico 12).

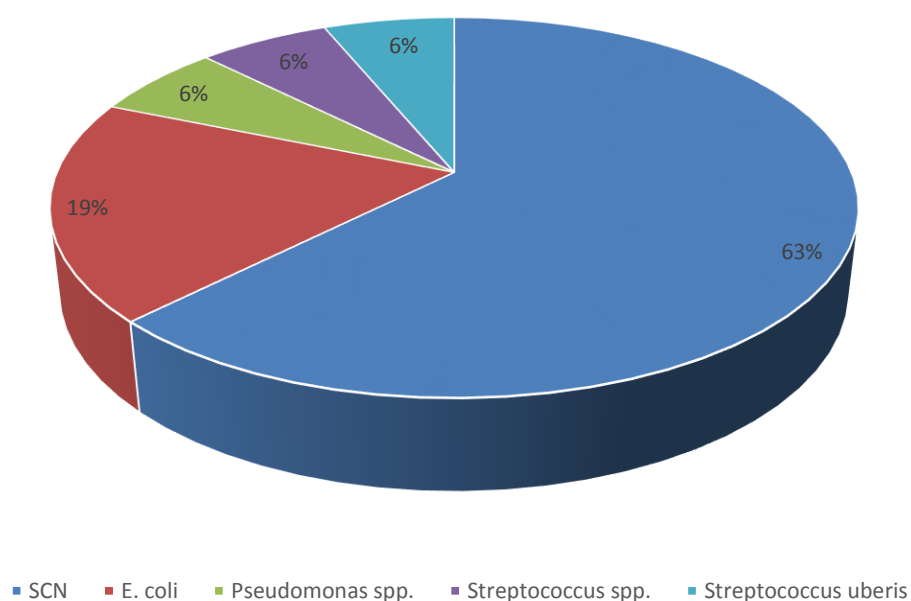


Figura 12 - Percentagem relativa de agentes bacterianos com crescimento no leite das 16 vacas do pós-parto. SNC- estafilococos coagulase-negativa.

Na tabela 4, descrevem-se os 12 casos em que ocorreram alteração do agente em vacas infectadas no ante e pós-parto. Em apenas 4 vacas se observou isolamentos bacterianos no pós-parto, ao contrário do que tinha ocorrido no anteparto.

Tabela 4- Casos em que ocorreram alterações do agente em vacas infetadas no ante e no pós-parto.

Nº de casos	Ante-Parto	Pós-Parto
4	<i>Arcanobacterium bovis</i>	SCN
1	<i>Strep. uberis</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.
1	<i>Stre. Uberis</i>	SCN
1	<i>Strep. dysgalactiae</i>	<i>E. coli</i>
1	<i>Strep. dysgalactiae</i> + SCN	SCN
1	Sem crescimento	<i>E. coli</i>
1	Leveduras	<i>E. coli</i>
1	SCN+S. aureus	SCN
1	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Strep. spp.</i>

SNC- *estafilococos* coagulase-negativa

5. DISCUSSÃO

Foi possível observar durante a realização do presente estudo, através do inquérito realizado aos produtores, que a teoria sobre os fundamentos da secagem faz parte dos procedimentos habituais das explorações (Pantoja *et al.*, 2009; Cameron *et al.*, 2014) e entre estas, a média da duração da secagem totaliza, aproximadamente, 49 dias, número que se encontra de acordo com a bibliografia (Lange-Consiglio *et al.*, 2014). Num total de 68 inquéritos realizados, apenas duas explorações não secam os animais.

Um outro ponto importante, focado na introdução deste trabalho, diz respeito ao nível produtivo da vaca no momento da secagem, facto de assumida importância para 97.06% do total dos inquiridos, convergente com as indicações consideradas corretas (Dingwell *et al.*, 2001). A tendência relativa à opção pelos diferentes métodos de secagem foi assumidamente para a secagem gradual, o que respeita os procedimentos referidos na literatura (Cameron *et al.*, 2014). De salientar que, mesmo as explorações que fazem secagem abruta, não restringem o acesso à água.

Relativamente aos critérios de seleção da terapia de secagem a aplicar entre as quatro hipóteses apresentadas: preço, intervalo de segurança, identificação prévia do agente ou indicação do veterinário, a escolha recaiu maioritariamente sobre o intervalo de segurança. Apesar da sua importância, talvez falte alguma formação e informação aos produtores sobre aquele que é o ponto-chave deste estudo, ou seja, a identificação prévia dos possíveis agentes etiológicos presentes no leite das vacas em pré-secagem (Berry *et al.*, 2002; Huxley *et al.*, 2002; Cook *et al.*, 2005; Bradley *et al.*, 2010; Cameron *et al.*, 2014). A utilização de selante é uma prática comum em 92.73% das explorações, o que vai de encontro ao recomendado (Berry *et al.*, 2002; Bradley *et al.*, 2010; Cameron *et al.*, 2014).

Os pontos mais críticos relativamente às práticas de secagem prendem-se com questões relacionadas com as instalações. A maioria das vacarias não dispõe de um local específico para as vacas secas ou lote de peri-parto por questões de espaço físico. Este é, com certeza, um ponto a melhorar. Relativamente à existência de maternidade, 41.3% das explorações apresenta um local próprio para os animais parirem. Se relacionarmos com a questão seguinte, conseguimos compreender o porquê de não existir um sistema de vigilância para as vacas secas. Apesar deste facto, não é frequente os animais apresentarem mastite no momento do parto, como se pode comprovar através da análise do gráfico 10. Como conclusão, e os números comprovam isso mesmo, podemos afirmar que os produtores de leite têm cada vez mais e melhores conhecimentos sobre a secagem, reconhecendo que este é um período fundamental na vida produtiva de uma vaca de leite.

A segunda parte do trabalho pretendeu conhecer os agentes microbianos presentes no leite de vacas em pré-secagem. No seguimento da execução da parte prática, foi possível observar uma elevada proporção de vacas positivas ao exame microbiológico no momento da secagem, tendo em consideração que a amostra foi independente de qualquer tipo de diagnóstico prévio (teste californiano de mamites, condutividade elétrica do leite, CCS individual, por exemplo). O ponto-chave do presente estudo foi, em primeiro lugar, reforçar a importância da prévia identificação no leite de agentes etiológicos como fator condicionante do sucesso da aplicação de protocolos de secagem e como um procedimento de rotina a ter em conta pelos agricultores (Berry *et al.*, 2002; Pantoja *et al.*, 2009; Bradley *et al.*, 2010; Gundelach *et al.*, 2010; Reyher *et al.*, 2011; Cameron *et al.*, 2014) em explorações com contagens de CCS baixas.

A aparente taxa de cura durante o período seco foi elevada e apenas 4 dos animais apresentaram novas infeções, convergindo com os resultados de outros estudos (Bradley *et al.*, 2010; Cameron *et al.*, 2014), apesar de existirem diferenças significativas entre este trabalho

e outros referidos na bibliografia, sobretudo a nível do momento e do número de amostras recolhidas no pós-parto. Qualquer um dos 2 protocolos utilizados, a aplicação de BDCT ou de ITS, mostrou uma elevada percentagem de cura aparente, o que sugere/demonstra o pretendido com este estudo: a importância do conhecimento dos agentes presentes no úbere/tetos das vacas anteriormente à secagem de forma a direccionar corretamente o tratamento a aplicar.

Outros estudos reportam, no entanto, resultados com elevado risco de nova IMI em tratamentos de secagem efetuados com base nos mesmos métodos utilizados no presente trabalho (Berry *et al.*, 2010). A explicação da aparente elevada taxa de sucesso demonstrada nos nossos resultados prende-se com quatro fatores fundamentais; o facto de as amostras serem recolhidas nos 10 dias após o parto; o isolamento no momento da secagem de alguns agentes etiológicos em animais de explorações com histórico de baixas CCS, como as que foram selecionadas para este estudo correspondam a microrganismo provenientes do canal do teto e, portanto, mais facilmente elimináveis; o método utilizado, uma vez que a utilização da PCR implicaria algumas particularidades nos resultados; e ainda os conhecimentos que podem condicionar o sucesso da terapia de secagem, como o nível produtivo do animal, a alimentação e outros fatores condicionantes da aplicação de qualquer tratamento são bastante claros para os produtores.

Um outro facto pode estar a mascarar os resultados finais: as vacarias com maior número de animais presentes no estudo executam um protocolo profilático pós-parto que engloba a administração de antibiótico injetável IM, na altura do parto para prevenção de metrites.

-O mais importante fator de condicionamento seria o alargamento do intervalo da recolha para os 20 ou mais (120) dias pós-parto, período durante o qual é mais frequente o surgimento de IMI, acompanhadas ou não de sinais clínicos. Além deste fator, a contagem de CCS de cada

um tetos poderia ser decisiva na hora da decisão relativamente à utilização de antibiótico intramamário, selante, ou os dois em conjunto (Pantoja *et al.*, 2009).

A idade dos animais ou o número de lactações, uma vez que o aumento do número de partos constitui um fator de risco para as alterações anatómicas e para os mecanismos de defesa intramamários (Pantoja *et al.*, 2009), o nível produtivo (Dingwell *et al.*, 2001), a CCS individual, a história pregressa de mastite e a época dos partos, poderiam, eventualmente, condicionar o espelho final.

Elevadas taxas de cura conseguidas através de métodos semelhantes aos nossos foram, no entanto, anteriormente reportadas em outros estudos (Huxley *et al.*, 2002; Bradley *et al.*, 2010).

A opção de não utilizar terapêutica antibiótica em leites sem crescimento prendeu-se com a gritante necessidade de reduzir a quantidade de antibióticos utilizados nas explorações de leite. Apostou-se, neste caso, numa maior vigilância durante a secagem e peri-parto, cuidados específicos dos lotes dos animais secos e posteriormente na maternidade. No entanto, e observando os resultados do inquérito realizado aos produtores sobre os hábitos relativamente à secagem dos animais, não é frequente apresentarem mastite ao parto, apesar da literatura descrever os primeiros 120 dias pós-parto (Cameron *et al.*, 2014) como os mais prováveis para a ocorrência da inflamação e infeção da glândula mamária. Este facto entra em contradição com a bibliografia anteriormente referida, que considera que a ocorrência de IMI é comum durante o período seco. No entanto, apenas alguns estudos investigaram a relação das IMI ocorridas durante a secagem e o risco de mastite clínica na lactação seguinte. Por exemplo, Green *et al.* (2002), sugeriram que 38% (n=84) dos casos de mastites clínicas que ocorreram na lactação subsequente foram causadas por microrganismos isolados no momento da secagem. Num outro

estudo, aproximadamente 48% (n=85) dos casos clínicos que surgiram nos primeiros 100 dias pós-parto foram originados por enterobacteriaceas, das quais 53% (n=20) previamente isoladas antes da secagem (Bradley *et al.*, 2000).

Existem outros fatores que não foram contabilizados no presente trabalho, mas que teriam influenciado os resultados, entre os quais, a produção de leite, a saúde do úbere e os fatores de manejo relacionados com a própria exploração.

Num tempo conturbado para o sector produtivo, no qual a agricultura, em geral, está na moda, o mesmo não se aplica à produção de leite. O principal condicionante é, no momento da feitura desta dissertação, o preço do leite e o fim das cotas leiteiras. No entanto, não devemos desprezar os ataques constantes à produção de leite e carne, pelo que supostamente representam em termos ambientais e do bem-estar animal. Ataques que pretendem unir-se numa única voz e fazer de todos nós vegetarianos. Assim sendo, cada vez mais, todos os intervenientes na cadeia da produção de leite devem unir esforços de forma a desmistificar os argumentos anteriores, de transmitirem segurança ao consumidor e de procurar novas, e talvez antigas práticas que permitam rentabilizar o preço do litro de leite. A utilização de forma correta do período de secagem em muito pode contribuir para os objetivos anteriormente descritos.

6. CONCLUSÕES

Concluimos que a maioria dos produtores usa planos profiláticos de mastites no período da secagem. No entanto, tendo em consideração a amostra das 7 explorações, existe uma elevada percentagem de animais, nesse momento, afetados por agentes bacterianos e/ou fúngicos.

A elevada percentagem de animais que no pós-parto não apresentou crescimento bacteriano nas amostras de leite pode indicar que a terapia associada a um bom manejo do período de secagem seja relativamente efetiva. São necessários mais estudos, considerando outras variáveis para aprofundar estes aspetos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aires, Tulia Andreia Cordeiro Pinto (2010) – *Mastites em bovinos: caracterização etiológica, padrões de sensibilidade e implementação de programas de qualidade do leite em explorações leiteiras do Entre Douro e Minho* . Universidade Técnica de Lisboa-Faculdade de Medicina Veterinária
2. Allen, Dana G., Pringle, Jonh K., Smith, Dale – *Handbook of Veterinary Drugs* – j.b. Lippincott company
3. Barkema,H.W., Schunkken, Y.H. lam, T.J. Gallign, D.T.Beiboer, M.L., Branda. (1997)- *Estimation of interdependence among quarters of bovine udder with subclinical mastitis and implications for analysis*. Dairy Sci. 80:1592-1599
4. Bernier-Dodier, P., Girard, C. L., Talbot, B. G., Lacasse, P. (2011) – *Effect of dry period management on mammary gland function and its endocrine regulation in dairy cows*. J. Dairy Sci. 94:4922-4936
5. Berry, E. A., Hillerton, J. E. (2002) – *The effect of Selective Dry-Cow Treatment on New Intramammary Infections*- J. Dairy Sci. 85:112-121
6. Bexiga, R. (2011) – *Bovine Mastitis do to coagulase-negative staphylococcus and the role of minor pathogens on mastitis* -. Universidade Técnica de Lisboa-Faculdade de Medicina Veterinária
7. Bexiga, R., Cavaco, L., Vilela, C.L. (2003) - *Isolamento de Prototheca zopfii a partir de leite bovino*. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias 98:33-3
8. Blowey,R. and Edmondson,P. (1999). *Mastitis control in dairy herds*. Farming Press Books, United Kingdom.

9. Bradley AJ, Breen JE, Payne B, Williams P, Green MJ (2011)-*The use of a cephalonium containing dry cow therapy and an internal teat sealant, both alone and in combination.* J. Dairy Sci. 94:692-704
10. Bradley, A., Green M. J. (2004) – *The importance of the nonlactating period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention* – Vet Clin Food Animal 547-568
11. Browning, J.W., Mein, G.A.,Brightling, P.,Nichols, T.J., Barton, M. (1994)- *Strategies for mastitis Control: Dry cow therapy and culling.* Aust. Vet.J. 71:179-181
12. Call, D.R., Davis, M.A., Sawant, A.A. (2008)- *Antimicrobial resistance in beef and dairy cattle production.* Anim.Health. Res.Rev. 9:159-167
13. Cameron, M., Keefe, G.P., Roy, J.P., Dohoo, I.R., MacDonald, K.A., MacKeena, S.L. (2013)- *Evaluation of a 3MPetrifilm on-farm culture system for detection of intramammary infection at the end of lactation.* Prev. Vet. Med. 111:1-9
14. Cameron, McKenna, MacDonald, K.A., Dohoo, I. R., Roy, J.P., Keefe, G. P. (2014)- *Evaluation of selective dry cow treatment following on farm-culture: Risk of postcalving intramammary infection and clinical mastitis in the subsequent lactation.* J. Dairy Sci. 97:270-284
15. Cook, NB, Pionek DA, Sharp, P. (2005)- *An assessment of the benefits of Orbeseal ® when used in combination withdry cow antibiotic therapy in three commercial dairy herds.* Bov Prac 39:83-94
16. Crispie, F., Flynn, J., Ross, R.P., Hill, C., Meaney, W.J. (2004)- *Dry cow therapy with a non-antibiotic intramammary teat seal - a review* - Vet J. 57(7): 412–418.
17. D. N. Waldner – *Dry cow feeding and management* – Oklahoma Cooperative Extension Service ANSI-4260

18. David F. Kelton, Jack Rodenburg and Karen Hand – *Udder Health and milk quality on Ontario dairy Farms utilizing Voluntary Milking Systems* – University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada
19. Dingwell, R.T., D. F. Kelton, K. E. Leslie, and V. L. Edge –*Deciding to dry-off: does the level of production matter?* University of Guelph – Guelph-Ontario – Canadá
20. Dingwell, R.T., Duffield, T.F. , Leslie, K.E., Keefe, G.P., DesCoteaux, L., Kelton, D.F., Lissemore, K.D., Schunkken, Y.H., Dick, P., Bagg, R. (2002)– *The efficacy of Intramammary Tilmicosin at Dryng-off and other risk factors for the prevention of new intramammary infections during the dry period.* J. Dairy Science 85:3250-3259
21. Dingwell, R.T., Kelton, David F., Leslie, Ken E., (2003)- *Management of the dry cow in control of peripartum disease and mastitis.* Vet Clin Food Anim 19: 235-265
22. Dohoo, I., Andersen, S., Dingwell ,R., Hand, K., Kelton, D. Leslie, K.Schunkken, Y., Godden, S. (2011)- *Diagnosing intramammary infections: Comparison of multiple versus single quarter milk samples for the identification of intramammary infections in lactating dairy cows.* J. Dairy Sci. 94:5515-5522
23. Dufour, S., Dohoo, I.R., Barkema, H.W., DesCôteuax, L., DeVries, T.J., Reyher, K.K.,Roy, J.P., Scholl, D.T. (2012)- *Manageable risk factors associated with lactational incidence, e elimination and prevalence of Staphylococcus aureus intramammary infections in dairy cows.* J. Dairy Sci. 95:1238-1300
24. Godden S., P. Rapnicki, S. Stewart, J. Fetrow, A. Johson, R. Bey, R. Farnsworth- *Effectiveness of na internal teat seal in the prevention of new intramammary infections during the dry and early-lactation periods in dairy cows whwn used with a dry cow intramammary antibiotic* (2003)- J. Dairy Sci. 86:3899-3911

25. Green, M. J., Bradley, A. J., Medley, G. F., Browne, W. J. (2007)- *Cow, Farm, and Management Factors During the Dry Period that Determine the Rate of Clinical Mastitis After Calving*. J Dairy Sci. 90(8): 3764–3776.
26. Green, M.J., Green, L.E., Medley G.F., Y.H.Schunkken, Bradley, A.J. (2002) – *Influence of dry-period bacterial intramammary infection on clinical mastitis in dairy cows*. J. Dairy Sci.85:2589-2599
27. *Guia Terapêutica en mamitis bovina* (2011) – Ligal-LaboratórioIntreprofissional Galego de Análise do Leite
28. Gundelach, Y., Kalscheuer, E., Hamann, H., Hoedemaker, M. (2011) - *Risk factors associated with bacteriological cure, new infection, and incidence of clinical mastitis after dry cow therapy with three different antibiotics*. J Vet Sci. 12(3):227-33.
29. H. W. Barkema, Schunkken, Y. H., Lam, T. J. G. M., Galligan, D. T., Beiboer, M. L., Brand, A. (1997)– *Estimation of Interdependence Among Quarters of Bovine Udder with Subclinical Mastitis and Implications for Analysis* – J. Dairy Sci 80:1592-1599,
30. Halasa T., Osteras O., Hogeveen H., Van Werner T., Nielen M. (2009). *Meta-analysis of dry cow management for dairy cattle. Part 1. Protection against new intramammary infections*. J. dairy Sc.92:3134-3149
31. Huxley, J.N., Green, M.J., Green, L.E., Bradley, A. J. (2002) – *Evaluation of an internal teat sealer during the dry period*. J.Dairy Sci. 85:551-561
32. Lange-Consiglio, C., Spelta, R., Garlappi, Luini, M., Cremonesi, F. (2014) - *Intramammary administration of platelet concentrate as na unconventional therapy in bovine mastitis: first clinical application*. J. Dairy Sci. 97:6223-6230
33. Laven, R., Balcomb, C., Tulley, W., Lawrence, K. (2014) – *Effect of dry period length on the effect of an intramammary teat sealant on the risk of mastitis in cattle treated with antibiotics at drying off*. New Zealand Veterinary Journal 62(4):214-2

34. Michel, A. W. (S.D) – *Mastitis: Prevention and Detection* – Dairy Essentials - Babcock Institute for International Dairy Research and Development – University of Wisconsin-Madison
35. Middleton, J.R. (2013)- *Staphylococcus aureus mastitis: have we learned anything in the last 50 years?* NMC Regional Meeting Proceedings.
36. NMC- National Mastitis Council (1999)- *Laboratory and field handbook on bovine mastitis. Revised* Ed - National Mastitis Council, IncWI; 1999
37. Pantoja, J. C. F., Hulland, 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* – J. Dairy Science 92:139-148,
38. Petrovski, K.R., Caicedo-Caldas, A., Willianson, N.B., Lopez-Villalobos, N., Grinberg, A., Parkinson, T.J., Tucker, I.G. (2001) – *Efficacy of a novel internal teat sealant containing 0.5% chlorhexidine against experimental challenge with Streptococcus uberis in dairy cattle*- J. Dairy Sci.94:3366-3375
39. Petzer, I.M., Lourens, D.C., van der Schans, T.J., Watermeyer, J.C., Van Reenen, R., Rautenbach, G.H., Thompson, P. (2009)- *Intramammary infection rate during the dry-period in cows that receive blanket dry cow therapy: efficacy of 6 different dry-cow intramamary antimicrobial products*. J.S Afr Vet Association 80(1):23-30
40. Pfizer Animal Health – *Udder Health Disease Management – Dry Cow*
41. Pol, M., Ruegg, P. L. (2007) – *Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wiscosin*. J. Dairy Sci. 90:249-261
42. Pyörälä, S. (2008)- *Mastitis in Post-Partum Dairy*. Reproduction in domestic animals 43; 252 – 259

43. Rabiee A. R., Lean, J. (2013)– *The effect of internal teat sealant products (Teatseal and Orbeseal) on intramammary infections, clinical mastitis and somatic cell counts in lactating dairy cows: A meta-analysis*. J. Dairy Sci. 96:6915-6931
44. Radostits, O.M, Gay, C.C, Hinchcliff, K.W., Constable, P.D. (2007)- *Veterinary Medicine, A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th edition, Saunders
45. Rajala-Shultz, P.J, Torres, A. H. Degraives, F. J. Gebreyes, W. A., Patchanee, P. (2009) - *Antimicrobial resistance and genotypic characterization of coagulase-negative staphylococci over dry-period*. Vet Microbiol. 134:55-64
46. Rajala-Schultz, P.S.,J.S. Hogan, and K. L. Smith (2005) - *Short communications: Association between milk yield at the dry-off and probability of intramammary infections at calving*. J. Dairy Sci. 88:577-579
47. Reg. (CE) N.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho de 28 de Janeiro de 2002. Documentos impressos. Jornal Oficial da União Europeia.
48. Reg. (CE) N.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004. Documentos impressos. Jornal Oficial da União Europeia.
49. Reg. (CE) N.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004. Documentos impressos. Jornal Oficial da União Europeia.
50. Reg. (CE) N.º 854/2004 Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004. Documentos impressos. Jornal Oficial da União Europeia.
51. Reyher, K. K., Dohoo, I. R. (2011)- *Diagnosing Intramammary infections: Evaluation of composite milk samples to detect intramammary infections* –J. Dairy Sci. 94:3387-3396
52. Reyher, K.K., Dohoo, I.R. (2011) - *Diagnosing Intramammary infections: Evaluation of composite milk samples to detect intramammary infections*. J. Dairy Sci.94:3387-3396
53. Ruegg P. L. (S.D) – *Managing the Dry Period for Milk Quality*, University of Wisconsin-Madison

54. Ruegg P. L. (S.D)- Mastitis Control– *Milking and Milk Quality n° 405* - Babcock Institute for International Dairy Research and Development – University of Wisconsin-Madison
55. 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*. J dairy Sci. 95:1209-1221
56. Schukken, Y. H., Bronzo, V. Locatelli, C., Pollers, C., Rota, N., Casuala, A., Testa, F., Scaccabarozzi, L., Maech, R., Zalduendo, D., Guix, R., Moroni, P. (2014)– *Efficacy of vaccination on Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds*. J. Dairy Sci. 97:1-15
57. Sz. Jánososi, G., Huszenicza (2001)– *The use of the dry cow therapy in the control of the bovine mastitis*. Vet.Med-Czech 46:55-60
58. Torres, A. H., Rajala- Shultz, P. J. Degraives, F. J., Hoblet, K. H. (2008)- *Using dairy herd improvement records and clinical mastitis history to identify subclinical mastitis infections at dry-off*. J. Dairy Res. 75:240-247
59. Williamson, J. H., Woolford, M. W., Day, A. M. (1995)– *The prophylactic effect of a dry cow antibiotic against Streptococcus uberis*- New Zealand Veterinary Journal 43:228-234
60. Woolford, M. W., Williamson, J.H., Day, A. M., Coperman, P. J. (1998) - *The prophylactic effect of a teat sealer on bovine mastitis during the dry-period and the following lactation*. N. Z. Vet Journal 46:12-19
61. Zadoks, R.N., Gillespie, B.E., Barkema, H.W., Sampimon, O.C., Oliver S.P., Schukken, Y.H. (2003) - *Clinical, epidemiological and molecular characteristics of Strep. Uberis infections in dairy herds*. Epidemiol Infect. 130:335-49

ANEXOS

ANEXO 1 – Inquérito de recolha de informação sobre hábitos relacionados com o manejo da secagem e do periparto em explorações de Entre Douro e Minho

Questionário sobre a avaliação das estratégias de secagem utilizadas pelos produtores de leite

Concelho:

Data:

Número total de animais (lactação + secagem + jovens):

Faz secagem:

- ☐ Sim
- ☐ Não

Em caso afirmativo:

Em média, quantos dias antes do parto: _____ dias.

1. Tem em atenção a produção da vaca antes da secagem?

- ☐ Sim
- ☐ Não

2. A secagem é feita de forma:

- ☐ Abrupta (Sem água/só com palha)
- ☐ Abrupta (Sem restrição de água)
- ☐ Gradual

3. De que forma escolhe o antibiótico de secagem (assinalar no max. 2 opções)?

- ☐ Preço
- ☐ Intervalo de segurança
- ☐ Identificação prévia do agente
- ☐ Indicação do veterinário

4. Utiliza selantes?

- ☐ Sim
- ☐ Não

5. Dispõe de um local específico na vacaria para vacas secas?

- ☐ Sim
- ☐ Não

6. Faz lote de peri parto?

- ☐ Sim
- ☐ Não

7. A vacaria tem maternidade?

- ☐ Sim
- ☐ Não

8. Existe algum tipo de vigilância relativa ao aparecimento de mamites em vacas secas/novilhas?

- ☐ Sim
- ☐ Não

9. É frequente os animais parirem já com mamite?

- ☐ Sim Qual a % aproximada? _____%
- ☐ Não

Obrigada!