

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



ESTUDO RETROSPETIVO SOBRE A PREVALÊNCIA DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DE MASTITES E
SUA SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS NA ILHA DE SÃO MIGUEL

JOEL ALEXANDRE FERREIRA VENTURA

TUTOR:
Dr. João Manuel Raposo Vidal

ORIENTADOR:
Doutor George Thomas Stilwell

2021

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



ESTUDO RETROSPECTIVO SOBRE A PREVALÊNCIA DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DE MASTITES E
SUA SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS NA ILHA DE SÃO MIGUEL

JOEL ALEXANDRE FERREIRA VENTURA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI
PRESIDENTE:
Doutor José Ricardo Dias Bexiga
VOGAIS:
Doutora Maria Manuela Castilho
Monteiro de Oliveira

TUTOR:
Dr. João Manuel Raposo Vidal
ORIENTADOR:
Doutor George Thomas Stilwell

2021

Anexo 3 – DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE OU DISSERTAÇÃO

Nome: Joel Alexandre Ferreira Ventura

Título da Tese ou Dissertação: Estudo retrospectivo sobre a prevalência dos agentes etiológicos de mastites e sua sensibilidade aos antibióticos na ilha de São Miguel

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2021

Designação do curso de Mestrado ou de Doutoramento: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Clínica Produção Animal e Segurança Alimentar
 Morfologia e Função Sanidade Animal

Declaro sob compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de 6 meses, 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três, retirando as que não interessam):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 22 de Fevereiro de 2021

Assinatura:

Joel Alexandre Ferreira Ventura

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus pais, irmão e família por todo o apoio ao longo deste percurso universitário.

Muito obrigado a todos os meus amigos por fazerem parte da minha vida, pois sem eles esta fase não teria sido tão divertida.

Um agradecimento especial à minha namorada por tornar a minha vida mais feliz e à sua família por serem pessoas fantásticas.

Um muito obrigado ao Dr. João Vidal por ser uma pessoa extraordinária e por todo o apoio ao longo do meu estágio curricular.

Estou muito grato ao Professor Doutor George Stilwell por ser uma pessoa atenciosa e sempre disponível para ajudar.

Agradeço imenso ao Dr. Pedro Reis por ser extraordinário, pois sem a sua ajuda esta dissertação não seria possível. A todos os médicos veterinários que tive a oportunidade de conhecer e acompanhar durante o meu estágio, um grande obrigado.

A todos os professores, muito obrigado pelo seu trabalho em transmitir não só conhecimento, mas também experiências de vida, conselhos, e momentos partilhados que mais tarde nos iremos relembrar.

Agradeço a todos os colegas e a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a minha experiência enquanto pessoa e aluno.

RESUMO

ESTUDO RETROSPETIVO SOBRE A PREVALÊNCIA DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DE MASTITES E SUA SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS NA ILHA DE SÃO MIGUEL

A mastite bovina é a doença com maior impacto na indústria leiteira, quer pelo seu carácter económico, quer pela contínua necessidade da sua prevenção e controlo das explorações. Para tal, ao longo dos anos, a comunidade científica tem vindo a estudar e avaliar padrões etiológicos, nomeadamente através da determinação da prevalência dos agentes de mastite isolados a partir de amostras de leite de cada região e país, com a finalidade de os correlacionar com os fatores de risco ambientais e de manejo, que poderão estar a influenciar a sua manutenção no efetivo animal. Outro tópico cada vez mais emergente na atualidade tem sido a presença e evolução das resistências aos antimicrobianos utilizados tanto na produção animal como noutras vertentes da medicina veterinária, e ainda na medicina humana. Logo, a dificuldade constante na profilaxia e tratamento de mastites também se associa ao aumento das resistências aos vários antimicrobianos disponíveis e mais utilizados na clínica de campo.

Neste estudo retrospectivo, referente ao período entre 2013 e 2018 foram avaliados 4680 isolados bacterianos em leite de vaca. As amostras de leite foram colhidas a partir de 842 vacas de 553 explorações distribuídas por seis concelhos da Ilha de São Miguel. Para o cálculo da sensibilidade aos antimicrobianos foram utilizados 1724 antibiogramas. Os objetivos definidos para o nosso estudo consistiram em determinar a prevalência dos agentes de mastite, comparar a prevalência de agentes contagiosos e de agentes ambientais, e, de agentes maiores e menores. Para além destes, o cálculo da sensibilidade e avaliação das resistências totais e por agente, e também a prevalência de isolados a partir de amostras com Teste Californiano de Mastites negativo, positivo e de mastite clínica. Relativamente ao estudo das prevalências, *S. aureus* foi o mais prevalente e *Klebsiella spp.* foi o menos prevalente. Constatou-se existir maior prevalência dos agentes maiores comparando com os menores. Os agentes contagiosos apresentaram prevalência superior aos ambientais. Considerando o estudo das resistências, as percentagens totais de isolados resistentes para a penicilina e cloxacilina estão superestimadas pois os Gram-negativos foram incluídos nestas percentagens e estes apresentam uma resistência natural a estes antimicrobianos. A canamicina, a sulfamida+trimetoprim e as fluoroquinolonas são os antimicrobianos com percentagens totais de resistências mais elevadas. Por fim, todos os agentes bacterianos demonstraram ser resistentes a pelo menos dois antimicrobianos.

Palavras chave: vaca leiteira, agentes de mastite, prevalência, resistências aos antimicrobianos, Açores.

ABSTRACT

RETROSPECTIVE STUDY OF THE PREVALENCE OF MASTITIS ETHIOLOGICAL AGENTS AND ITS SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS IN SÃO MIGUEL ISLAND

Bovine mastitis is the disease with the biggest impact in dairy industry, because of its economical aspect and because of the continuous evolution to prevent and control it from dairy farms. With that in mind, over the years, the scientific community has been studying and evaluating etiological patterns, particularly through the prevalence of mastitis pathogens isolated from milk samples of each region and country, with the purpose of correlating them with multiple factors like environmental and management factors, which may be influencing its permanence in herds. Another topic more and more emerging nowadays is the occurrence and evolution of antimicrobial resistance to the antibiotics used in animal production, and in other areas of veterinary and human medicine. Consequently, the continuous difficulty in prophylaxis and treatment of mastitis is associated with the increased resistance to various antimicrobials available and frequently used in practice.

In this retrospective study, referring to the period between 2013 and 2018 we analysed 4680 ethiological isolates from dairy cow's milk. The milk samples were collected from 842 cows from 553 herds distributed by six regions of São Miguel Island. 1724 antibiograms were used to calculate the sensitivity to different antimicrobials. The goal of our study consisted in determining the mastitis pathogens prevalence and isolation frequency, to compare the prevalence between contagious and environmental pathogens, and, between major and minor pathogens. Additionally, calculation of sensitivity and assessment of total resistances and resistances by pathogen, and also the prevalence of isolates from samples negative and positive to californian mastitis test, and from clinical mastitis.

Regarding the prevalence study, *S. aureus* was the most prevalent and *Klebsiella* spp. was the least prevalent. We also found that major pathogens prevail over the minor. Contagious pathogens had a higher prevalence over environmental pathogens. Considering the resistance study, total percentages of isolates resistant to penicillin and cloxacilina are higher than it should be because the Gram-negative isolates were included in the percentages, and these isolates have a natural resistance to these antimicrobials. Kanamycin, sulfonamide+trimethoprim and fluoroquinolones are the antimicrobials with the highest total resistance percentages. All the pathogens revealed resistances to two or more antimicrobials.

Key words: dairy cow, mastitis pathogens, prevalence, antimicrobial resistances, Azores.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
ÍNDICE DE TABELAS	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	xiii
CAPÍTULO 1 – RELATÓRIO DE ESTÁGIO	1
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. INTRODUÇÃO À MASTITE BOVINA	3
1.1. Etiologia	3
1.1.1. Agente contagioso ou ambiental.....	4
1.2. Expressão clínica	5
1.2.1. Agentes maiores	5
1.2.2. Agentes menores.....	7
2. FATORES DE RISCO	8
2.1. Idade	9
2.2. Raça.....	9
2.3. Gestação e número de partos	9
2.4. Imunidade	9
2.5. Fase de lactação	9
2.6. Características genéticas do úbere e tetos.....	10
2.7. História de mastites	10
2.8. Doenças concomitantes	10
2.9. Instalações e manejo.....	11
2.9.1. Condição física dos tetos.....	11
2.9.2. Higiene do úbere.....	12
2.9.3. Nutrição	12
2.10. Estação do ano	12
2.11. Resistência do agente etiológico	13
3. CONTROLO E PREVENÇÃO	13
3.1. Tratamento no período seco.....	14
3.2. Vacinação	15
4. DIAGNÓSTICO	15
4.1. Exame físico.....	16
4.2. Contagem de Células Somáticas (CCS).....	17

4.2.1. CCS do tanque de leite	18
4.2.2. Teste Californiano de Mastites (TCM)	18
4.3. Detecção de agentes de mastite	18
4.3.1. Cultura microbiológica.....	18
4.3.2. Sistemas de cultura na exploração	19
5. TRATAMENTO.....	19
5.1. Antibioterapia	20
5.1.1. Via de administração	20
5.1.2. Escolha do antibiótico	20
5.1.3. Antibióticos utilizados no tratamento de mastite.....	21
5.1.3.1. β -lactâmicos	21
5.1.3.2. Lincosamidas	23
5.1.3.3. Quinolonas	23
5.1.3.4. Sulfonamidas.....	23
5.1.3.5. Aminoglicosídeos	24
5.2. Anti-Inflamatórios Não Esteroides (AINES)	24
6. PROGNÓSTICO.....	25
6.1. Fatores associados ao animal	25
6.2. Fatores associados ao agente etiológico.....	25
7. PADRÕES DE SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS.....	26
8. CONTROLO DAS RESISTÊNCIAS AOS ANTIBIÓTICOS.....	26
CAPÍTULO 3 – ESTUDO RETROSPETIVO SOBRE A PREVALÊNCIA DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DE MASTITES E SUA SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS NA ILHA DE SÃO MIGUEL.....	28
1. OBJETIVOS	28
2. MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1. Caracterização de dados e do estudo	28
2.2. Tratamento de Dados.....	29
3. Resultados	29
4. DISCUSSÃO	38
4.1. Estudo das prevalências	38
4.2. Estudo das resistências.....	41
4.2.1. As resistências totais	41
4.2.2. As resistências por agente.....	42
4.3. Prevalência dos isolados de amostras com TCM positivo e de MC	44
5. CONCLUSÃO.....	46

6. Referências Bibliográficas	48
ANEXOS	61
Anexo 1: Prevalência dos agentes etiológicos isolados por concelho (2013-2018)	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Escala de gravidade para mastite clínica	16
Tabela 2: Classificação das penicilinas, cefalosporinas e algumas características de cada grupo.....	21
Tabela 3: Prevalência dos resultados das culturas microbiológicas (2013-2018).....	30
Tabela 4: Prevalência anual dos resultados das culturas microbiológicas ao longo dos anos em estudo (2013-2018).	32
Tabela 5: Prevalência (%) anual dos agentes etiológicos isolados (2013-2018).....	32
Tabela 6: Número de isolados dos agentes etiológicos testados para cada antimicrobiano.	34
Tabela 7: Percentagens de isolados cujo resultado do TSA, para cada antibiótico testado, foi sensível, intermédio e resistente	36
Tabela 8: Prevalência (%) dos agentes etiológicos isolados a partir de amostras com TCM negativo e positivo, e de MC (n* = 4002).....	37

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Prevalência (%) de isolados por concelho.....31

Gráfico 2: Comparação da prevalência anual de agentes maiores e menores (2013-2018).
.....33

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AASM – Associação Agrícola de São Miguel
AINES – Anti-inflamatórios Não Esteroides
CCS – Contagem de Células Somáticas
CS – Células Somáticas
DAE – Deslocamento do Abomaso à Esquerda
DAD – Deslocamento do Abomaso à Direita
GM – Glândula Mamária
IMM – Intramamária
IMMs – Intramamárias
MC – Mastite Clínica
MCs – Mastites Clínicas
MSC – Mastite Subclínica
SCN – *Staphylococci* coagulase-negativo
TCM – Teste Californiano de Mastites
TSA – Teste de Sensibilidade aos Antibióticos

CAPÍTULO 1 – RELATÓRIO DE ESTÁGIO

A componente prática do estágio curricular decorreu na Associação Agrícola de São Miguel (AASM) - Cooperativa União Agrícola, entre os dias 1 de outubro de 2018 e 31 de janeiro de 2019. O orientador, Dr. João Vidal, definia diariamente qual o médico veterinário de campo que seria acompanhado pelo autor, pois a sua função consistia principalmente em apoiar os colegas e atender os clientes na farmácia. No entanto, houve oportunidade de o acompanhar algumas vezes na clínica de campo.

As atividades práticas no âmbito da sanidade animal englobaram uma série de competências, tais como, a identificação, contenção, vacinação (incluindo preparação de vacinas), colheita de sangue e desparasitação. Na área de reprodução, acompanhando o Dr. Jorge Medeiros, foram desenvolvidas atividades relacionadas com o diagnóstico de gestação, como a palpação por via transretal, procurando sinais anatomofisiológicos de gestação e tentando estabelecer a idade do feto. Outras atividades na mesma área consistiram na discussão de programas de sincronização de cio, implementação de tratamentos para doenças de foro reprodutivo como, por exemplo, quistos ováricos e metrites, e auxiliar em ecografias por via transretal (ecógrafo portátil).

A componente clínica foi a área predominante durante o estágio curricular. O autor acompanhou vários médicos veterinários nos seus serviços, solicitados pelos produtores sócios da AASM. Os casos de doença mais comuns foram os seguintes: MC, metrite puerperal, pneumonia em vitelos e vacas, diarreia neonatal, deslocamento do abomaso à esquerda (DAE) e à direita (DAD) (menos comum), parésia por hipocalcemia (síndrome da vaca caída), cetose clínica, distócia, torção uterina, onfaloflebite, timpanismo e diarreia infecciosa em vacas.

Cirurgicamente, o autor auxiliou o Dr. Ashton Matias na extirpação de uma neoformação de tecido mole de um vitelo da raça *Jersey* (zona da axila). Para além desta, procedeu-se ao auxílio e execução de fixações abomasais abdominais (DAE), participação numa amputação de cauda por traumatismo, cesarianas, extirpações de massas tumorais da terceira pálpebra (possivelmente carcinomas), lancetagem e drenagem de abscessos.

Os meios de diagnóstico selecionados e instituídos na prática clínica foram a anamnese, auscultação, percussão, utilização de glucómetro e fitas de cetose, TCM, palpação transretal, bem como todo o exame de estado geral. Adicionalmente, o autor participou em conjunto com o Dr. Pedro Reis, na colheita de amostras de leite, avaliação da higiene do úbere e da condição física dos tetos, bem como em culturas microbiológicas (semear amostras, coloração de Gram e observação das preparações ao microscópio ótico).

Na área de tratamento, o autor auxiliou na administração e monitorização de ciclos de fluidoterapia em vacas e em vitelos (oral e intravenosa), antibioterapia parenteral (intramuscular, endovenosa, subcutânea, subconjuntival) e intrauterina, anti-inflamatórios não esteroides (AINES), preparações medicamentosas orais e suplementação mineral e vitamínica (endovenosa). Para além das atividades mencionadas, foi feita a colheita do tronco cerebral de várias vacas que morreram na exploração, para teste da encefalopatia espongiiforme bovina, e colaboração em necrópsias e eutanásias.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUÇÃO À MASTITE BOVINA

O termo mastite, designa uma doença que afeta diretamente a glândula mamária (GM) (Ruegg 2012), e consiste numa resposta inflamatória face a uma agressão inicial por um agente, normalmente infeccioso, que pode levar a um processo de neutralização do mesmo, e, conseqüentemente, à cura, de forma a repor a homeostasia do órgão (Jones 2006). Conseqüentemente, a quantidade e qualidade do leite são afetadas, sendo a mastite a principal doença que faz oscilar o parâmetro qualitativo do mesmo. Esta doença é considerada a mais prevalente em vacas leiteiras e permanece como uma das razões mais comuns de refugo de vacas do efetivo (Ruegg 2012).

Esta doença resulta normalmente da infeção intramamária (IMM), e os agentes etiológicos mais comuns são: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e coliformes (Bradley et al. 2007; Vanderhaeghen et al. 2015). O parâmetro utilizado mais frequentemente no diagnóstico de mastite consiste na investigação citológica através da contagem de células somáticas (CCS) (Duarte et al. 2015).

A identificação, prevalência e distribuição dos agentes etiológicos, são as informações mais importantes quando se pretende prevenir doenças de forma eficaz e planear o tratamento mais adequado (Olde Riekerink et al. 2010).

O uso de antimicrobianos é essencial no tratamento e controlo da mastite (Chandrasekaran et al. 2014). Segundo Agersø et al. (2011) citado por Rocha (2013), esta doença é a causa mais frequente para o uso de antibióticos em explorações leiteiras. Para além do custo associado ao seu uso, o aparecimento de resistências e a ineficácia dos antibióticos tem vindo a tornar-se um problema crítico (Gomes and Henriques 2015). Sendo assim, o conhecimento da sensibilidade aos antibióticos dos agentes de mastite é uma mais valia para os médicos veterinários e produtores (Sears and McCarthy 2003).

1.1. Etiologia

A inflamação surge em resposta a diversas etiologias, podendo ser causada por agentes infecciosos e as suas toxinas, traumatismos e químicos. A mastite resulta geralmente da ação de microrganismos bacterianos, que colonizam o úbere, produzindo toxinas que lesam o tecido da glândula mamária (Jones and Bailey 2009).

Quanto à forma de infeção IMM primária, podemos subdividir a mastite em contagiosa ou ambiental. Esta divisão consiste, respetivamente, na infeção a partir de

organismos patogénicos que estão em úberes infetados (Fox and Gay 1993), ou a partir de microrganismos que fazem parte do ambiente da exploração (Smith and Hogan 1993).

1.1.1. Agente contagioso ou ambiental

A denominação de um agente etiológico como contagioso ou ambiental, baseia-se no seu reservatório primário e no seu modo de transmissão mais comum. De acordo com esta classificação, o termo agente ambiental refere-se a microrganismos oportunistas que fazem parte do ambiente do animal, enquanto que o termo agente contagioso, refere-se a microrganismos em que o seu reservatório primário é o úbere de vacas infetadas e a sua transmissão ocorre quando os tetos de vacas saudáveis são expostos ao leite contendo tais agentes (Ruegg 2012). Todavia, alguns agentes etiológicos podem causar mastite por via ambiental ou contagiosa, como é o caso de *Streptococcus dysgalactiae* (Wente and Krömker 2020) e de *Streptococcus uberis* (Phuektes et al. 2001 citado por Kromker 2014). Todos os agentes desenvolvem a sua patogenicidade através da invasão ascendente do canal do teto (Capuco et al. 1992 citado por Aitken et al. 2011).

A mastite contagiosa alberga um elevado número de agentes etiológicos, sendo os mais comuns: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* (Constable et al. 2017) e *Mycoplasma bovis* (Gruet et al. 2001).

Os agentes oportunistas pertencem a uma categoria distinta dentro do grupo dos agentes de mastite contagiosa, sendo principalmente preenchida pelas bactérias inseridas no grupo *Staphylococci* coagulase-negativo (SCN) (Pyörälä and Taponen 2009).

Os principais agentes etiológicos da mastite ambiental são: bactérias Gram-negativas (*Enterobacteriaceae*, como por exemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp.), *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp. (como por exemplo, *Enterococcus faecalis*) (Gruet et al. 2001). Outra bactéria Gram-positiva que integra este grupo é *Trueperella pyogenes* (Gruet et al. 2001; Jost and Billington 2005). Estes agentes causam mastite por via ambiental, como por exemplo, a partir de camas húmidas e conspurcadas, e podem ter como fatores predisponentes a preparação inadequada do úbere, o próprio sistema de ordenha (através de lesões nos tetos) e um controlo ineficaz das moscas (Constable et al. 2017). Estes microrganismos são uma causa frequente de MCs, e poderão estar ocasionalmente associados a formas hiperagudas. A infeção de *Streptococcus* spp. por via ambiental, é atualmente uma causa principal de mastite, sendo clinicamente expressa como leve a moderada, ou frequentemente como subclínica crónica (Constable et al. 2017).

Outros agentes etiológicos que integram o grupo dos agentes de mastite ambiental são: *Pseudomonas* spp., leveduras, *Prototheca* spp., *Serratia marcescens* e *Nocardia* spp.

As infeções por estes agentes são esporádicas, no entanto podem desencadear surtos de doença (Constable et al. 2017). *Prototheca* spp., são algas sem clorofila, unicelulares e de distribuição ubiqüitária, podendo estar presentes no ambiente de explorações, nomeadamente em zonas húmidas (como por exemplo, bebedouros), sem terem sido causa de mastites (Bexiga et al. 2003). A espécie predominante é *Prototheca zopfii*, estando associada à mastite bovina (Möller et al. 2007; Osumi et al. 2008). No caso de infeções fúngicas intramamárias (IMMs), os agentes etiológicos são principalmente leveduras (maioritariamente *Candida* spp.), e podem constituir 2 a 13% dos casos de mastite em vacas (Wawron et al. 2010).

1.2. Expressão clínica

Os agentes patogénicos podem ser classificados ainda com base na sua propensão para causar MC ou subclínica, sendo então considerados como agentes maiores ou menores, respetivamente (Constable et al. 2017).

1.2.1. Agentes maiores

Os agentes que fazem parte deste grupo são: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus* spp., *Streptococcus equinus* (considerado menos prevalente), os agentes *Mycoplasma bovis* e *Staphylococcus aureus*, e, do grupo dos coliformes, a *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., entre outros (Constable et al. 2017).

De seguida apresentam-se algumas características consideradas relevantes de alguns dos agentes maiores anteriormente mencionados:

Staphylococcus aureus - *S. aureus* caracteriza-se por ser uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, imóvel e não esporulada. Esta espécie geralmente hemolítica, também é catalase-positiva e coagulase-positiva (Teixeira et al. 2008). Para além destes fatores de virulência, esta causa lesões nos tecidos glandulares por intermédio de toxinas (α , β , γ e δ) e enzimas extracelulares (nuclease, hialuronidase, fosfatase, lípase e proteases) (Dinges et al. 2000). Considera-se, de um ponto de vista etiológico, uma das maiores causas de mastite subclínica (MSC), clínica, recorrente e crónica nos bovinos leiteiros (Melchior et al. 2011). Este agente resiste à fagocitose de macrófagos e neutrófilos por meio da produção de fatores antifagocíticos (cápsula e proteína A), ultrapassando assim a resposta primária do sistema imunitário (Morin 2009). O principal reservatório de *S. aureus* é o úbere infetado, apesar de poder ser isolado a partir de vários locais do corpo do animal, do meio ambiente e até mesmo das mãos do ordenhador (Benić et al. 2012). Do ponto de vista clínico, a mastite resultante da infeção por este agente poder-se-á manifestar por um

quadro clínico fatal ou apenas por um quadro ligeiro ou mesmo assintomático. As formas crónica e subclínica são as mais frequentes e têm um maior impacto económico (Benić et al. 2012). Metade do efetivo poderá estar infetado, apesar de apenas uma pequena porção revelar alterações observáveis (Radostits et al. 2007). Mesmo assim, a deteção de infeção no efetivo poderá dever-se a episódios clínicos e pela repetição dos tratamentos devido ao insucesso terapêutico (Benić et al. 2012).

Streptococcus uberis - *S. uberis* é ubiqüitário, capaz de colonizar tanto a glândula mamária como o meio envolvente (Kromker 2014). A deteção de *S. uberis* em explorações de vacas leiteiras, tem vindo a ser cada vez mais frequente, quer seja em MCs como subclínicas. Esta espécie assume-se como o agente patogénico principal num número crescente de explorações. Do ponto de vista microbiológico, trata-se de um *coccus* Gram-positivo, anaeróbio facultativo, catalase e oxidase negativo (EB 2017), que pode estar disposto em pares de células ou em cadeias (Kromker 2014).

A adesão às células epiteliais mamárias e a invasão das mesmas é um fator inerente a esta espécie, mediada pela molécula de adesão de *S. uberis* (Kromker 2014). Os autores Elhadidy e Zahran (2013), defendem que a elevada prevalência em algumas explorações leiteiras deve-se à sua capacidade de aderir a células hospedeiras. De acordo com Frost et al. (1977) citado por Kromker (2014), a síntese de hialuronidase e de cápsulas de ácido hialurónico, são também fatores promotores da sua virulência.

Escherichia coli – Esta espécie pertence ao grupo dos coliformes e é uma bactéria Gram-negativa, considerada frequentemente como agente etiológico em casos de MC aguda (Hogan and Smith 2003). A infeção IMM por este tipo de bactéria resulta normalmente da invasão ascendente pelo canal do teto até ao tecido secretor (Hogan and Smith 2003). De acordo com Burvenich et al. (2003), a infeção IMM por *E. coli* é de curta duração e a sua eliminação, na maioria das vezes, ocorre de forma espontânea, ou, pelo contrário, poderá causar a morte do hospedeiro (Dogan et al. 2006). No entanto, de acordo com Dopfer et al. (1999) citado por Dogan et al. (2006), este agente poderá também causar infeções IMM persistentes.

Enterococcus faecalis – Considerado também como um agente maior de mastite (Elhadidy and Zahran 2013), Gram-positivo, anaeróbio facultativo e comensal (Kristich et al. 2004). Responsável pela formação de biofilmes capazes de provocar infeções recorrentes e persistentes (Elhadidy and Zahran 2013). Bradley (2002) citado por Elhadidy and Zahran (2013), afirmam que este agente encontra-se normalmente nas amígdalas, intestino, pele e estreme.

Streptococcus agalactiae – *S. agalactiae* encontra-se difundido pelo mundo como um agente maior de MSC bovina, que poderá ter um enorme impacto sobre a quantidade e qualidade de leite produzido. Este agente pode sobreviver por longos períodos somente

dentro da GM (Erskine and Eberhart 1990; Erskine et al. 1996). O seu reservatório principal consiste no úbere de vacas infetadas, e a sua transmissão ocorre diretamente de modo horizontal (Constable et al. 2017). Apesar da diminuição da prevalência de infeções por este agente ao longo das últimas décadas, mantém-se como um agente etiológico de mastite em explorações com mau maneio e higiene (Merl et al. 2003). Pode ser economicamente tratado por infusão IMM com penicilina e novobiocina (Erskine et al. 1996). O tratamento durante a lactação é altamente bem sucedido e a sua erradicação é relativamente eficaz, caso as recomendações sejam cumpridas (Keefe 2012).

***Trueperella* spp.** – A infeção IMM por *T. pyogenes* poderá tomar duas formas de mastite grave, uma delas designa-se por mastite supurativa (esporádica), e a outra forma é conhecida como mastite de verão. A primeira forma está mais relacionada com efetivos estabulados e também pode ser referida como mastite piogénica. A outra forma, como o nome indica, ocorre nos meses de verão. Esta não é considerada endémica, apesar de ter sido reportada na Escandinávia. Epidemiologicamente, ocorre de forma esporádica, sendo mais comum em vacas que se encontram no período seco e em novilhas que se encontram em gestações avançadas, podendo levar à perda de função produtiva (Constable et al. 2017). A sua transmissão é mediada principalmente por moscas, podendo também se propagar pelo contacto direto dos tetos com o meio ambiente contaminado (por exemplo, áreas de parto e estabulação de vacas em período seco) (Swartz et al. 2016).

***Klebsiella* spp.** – Na indústria leiteira, a espécie *Klebsiella pneumoniae* é conhecida pela sua aptidão para o desenvolvimento de mastites ambientais primárias. Em termos de patogenicidade, *Klebsiella* spp., apresenta um tempo de infeção mais prolongado (em média, 21 dias) em comparação com *E. coli* (menos de 10 dias). Para além disso, as infeções IMM por *Klebsiella* spp. são, geralmente, mais graves do que as desencadeadas por *E. coli* (Schukken et al. 2012).

1.2.2. Agentes menores

Os agentes menores consistem em bactérias que colonizam o canal do teto e podem ser isolados a partir de amostras de leite, mesmo sem qualquer sinal de mastite (Jones 2006). No entanto, apresentam uma relevância patológica limitada e raramente causam inflamação (Jones 2006). Estes formam um quadro constituído maioritariamente por SCN (*Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus epidermidis*) e *Corynebacterium bovis* (Reyher et al. 2012; Constable et al. 2017).

***Staphylococci* coagulase-negativo** - Atendendo ao grupo SCN, este enquadra-se como um conjunto de agentes menores de mastite (ou seja, cuja expressão clínica é

discreta). O seu isolamento atinge maiores proporções quando se trata de estudos em larga escala e a nível mundial (Bexiga 2011). São um grupo heterogéneo, constituído por mais de 50 espécies e subespécies, das quais mais ou menos 10 são isoladas frequentemente a partir de amostras de leite e possuem a habilidade de colonizar as extremidades dos tetos (Piepers et al. 2013). As espécies de SCN mais prevalentes em muitos dos estudos realizados são: *S. chromogenes*, *S. simulans* e *S. epidermidis* (Reksen et al. 2012). Sansano (2012) citado por Pacheco (2015), refere que, durante o período seco e antes do parto, a incidência de novas infeções é máxima, e aquando do parto a percentagem de quartos infetados é elevada. A presença de SCN é mais provável em vacas primíparas do que em múltíparas. As mastites em primíparas no início da lactação, são causadas maioritariamente por SCN (Piepers et al. 2013). O seu potencial infeccioso depende de vários fatores, entre eles, a sua capacidade de adesão à pele da GM e a sua habilidade para a produção de biofilmes (Oliveira and Cunha 2010). Algumas estirpes de SCN apresentam os seguintes fatores de virulência: toxinas δ , leucocidinas, lípases, protease, ADNase, e a formação de cápsula (Bexiga 2011). De acordo com Reksen et al. (2012), as infeções IMMs persistentes podem estar associadas a quartos infetados por SCN, e, para além disso, estes podem ser isolados a partir de infeções IMMs discretas do ponto de vista clínico.

***Corynebacterium* spp.** - Outro agente contagioso comum de MSC em vacas leiteiras pertence ao género *Corynebacterium*, sendo que cerca de 89% dos isolados são *Corynebacterium bovis*. Embora a frequência de isolados seja elevada, este enquadra-se como um agente menor de mastite (Bradley and Green 2009; Schukken et al. 2009). Segundo Brooks e Barnum (1984) citado por Blagitz et al. (2013), considera-se um agente comensal da GM. O seu reservatório principal parece ser o canal do teto (Constable et al. 2017), mas já foram reportados casos de colonização da cisterna do teto, da GM e do parênquima mamário (Sol et al. 1997; Benites et al. 2003). A sua transmissão é horizontal e este agente revela-se extremamente contagioso (a fase infecciosa poderá demorar meses) (Constable et al. 2017). Não há consenso sobre a possibilidade de quartos infetados por este agente tornarem-se menos suscetíveis a infeções por outros agentes (Blagitz et al. 2013).

2. FATORES DE RISCO

Os fatores associados ao animal que influenciam a prevalência de infeção e a sua manifestação clínica podem ser: idade, número de partos, fase de lactação, raça, características genéticas do úbere e tetos, produção de leite, doenças concomitantes, imunidade, e história de mastites ou infeções IMMs subclínicas pré-existentes (Constable et al. 2017). Em relação aos fatores de risco ambientais temos a qualidade das instalações, o

maneio da exploração e a estação do ano. Dentro do maneio, alguns dos fatores podem ser a condição física dos tetos, a higiene do úbere e a nutrição. Os fatores inerentes aos agentes patogênicos são: viabilidade, virulência, capacidade para colonizar e produção de toxinas (Constable et al. 2017).

2.1. Idade

A nível individual, este fator revela-se de elevada importância, uma vez que o sistema imunitário de um animal jovem pode eliminar ou reduzir as consequências de uma infecção de forma mais eficaz, comparativamente a animais mais velhos (Sol et al. 1997).

2.2. Raça

A raça poderá constituir um fator de risco, no entanto, não está comprovado dado a interferência do maneio (Constable et al. 2017). De acordo com Nickerson (2011), novilhas da raça Jersey apresentam uma maior prevalência de infeções IMMs quando comparado com novilhas da raça Holstein, 67,7% e 35%, respetivamente.

2.3. Gestação e número de partos

Em novilhas, a prevalência de mastite eleva-se no último trimestre de gestação e alguns dias antes de parirem (Constable et al. 2017). O número de partos poderá influenciar o surgimento de mastite (Sarker et al. 2012).

2.4. Imunidade

De acordo com Leblanc (2010), a função imunológica encontra-se deprimida uma a duas semanas antes do parto e duas a três semanas após o parto.

A função produtiva da glândula mamária é influenciada pela velocidade de reposição dos neutrófilos. Quanto mais rápida for esta reposição, mais rápida é a recuperação (Constable et al. 2017).

2.5. Fase de lactação

A lactação gera consequências negativas na prevalência de mastite (Sharma et al. 2011). Nos bovinos, existe a possibilidade do incremento do stress oxidativo e da redução dos mecanismos de defesa antioxidantes, imediatamente após o parto, conduzirem a mastite (Sharma et al. 2011). Grande parte das infeções surgem no início do período seco e nos primeiros dois meses de lactação (Constable et al. 2017).

Goff e Kimura (2009) citado por Marinho (2018) referem que o início da lactação leva a um Balanço Energético Negativo (BEN) contribuindo para a imunossupressão que ocorre nesta fase de transição. Segundo Goff (2006) citado por Marinho (2018), este BEN pode ser

explicado pelo facto de haver um aumento das necessidades energéticas após o parto, associado a uma diminuição da ingestão de matéria seca (IMS), juntamente com a mobilização de reservas corporais.

2.6. Caraterísticas genéticas do úbere e tetos

A conformação do úbere e a forma do teto são caraterísticas genéticas que poderão afetar a suscetibilidade à mastite (Neijenhuis et al. 2001).

A ocorrência de mastite poderá variar consoante a expressão de algumas caraterísticas fenotípicas como a morfologia, profundidade e comprimento do úbere e a dimensão do orifício dos tetos (Constable et al. 2017). A presença de tetos supranumerários poderá funcionar como reservatório para microrganismos causadores de mastite (Tiwari et al. 2013). A orientação dos tetos e a distância relativa entre eles poderão também contribuir para aumentar o risco de mastite (Tiwari et al. 2013).

2.7. História de mastites

A precedência de mastite na lactação anterior torna a vaca mais suscetível ao desenvolvimento de mastite na lactação atual (Constable et al. 2017). As vacas estão constantemente a serem expostas a fatores externos e as infeções subclínicas são comuns na maioria das explorações (Constable et al. 2017). Harris and Muggleton (1977) citado por Gruet et al. (2001), defendem que no final da lactação as infeções existentes podem permanecer no úbere, e conseqüentemente no período pós-parto a MSC poderá retornar numa forma mais grave.

2.8. Doenças concomitantes

De acordo com Schukken (1989) e Peeler et al. (1994) citados por Breen et al. (2009), as doenças que concorrem para aumentar o risco de infeções IMMs poderão ser: retenção placentária, distócia e claudicações. A úlcera da sola pode relacionar-se com um aumento do risco de mastite por *S. aureus*, através do aumento do tempo em que o animal permanece deitado, aumentando assim a exposição do úbere a este agente (Radostits et al. 2007).

A hipocalcemia, metrite, deslocamento do abomaso (Biggs 2009) e cetose (Berge and Vertenten 2014) também poderão contribuir para o aumento da suscetibilidade à infecção IMM. A hipocalcemia pode ser causa de mastite, devido à indução de imunossupressão, uma vez que o cálcio é essencial para a resposta imunológica celular (Seifi and Kia 2018). Vacas e novilhas com BEN estão em maior risco de cetose, sendo que, a cetose clínica está associada a um aumento de duas vezes o risco de MC (Berge and Vertenten 2014). Isto pode ser explicado pela redução da capacidade de fagocitose por

parte dos leucócitos e pela redução na produção de citocinas que atraem outros leucócitos para o local de infecção (Uriyasathaporna et al. 2000).

2.9. Instalações e manejo

A qualidade das instalações e o manejo da exploração condicionam o tipo de agente microbiano que infeta o tecido da GM e o risco do desenvolvimento de mastite (Constable et al. 2017).

A dimensão do pavilhão ou da área em que as vacas se encontram alojadas na exploração poderá influenciar a prevalência de infecções IMMs e a incidência de MC, na medida em que fatores como o tamanho e conforto inadequados das camas e corredores irão contribuir para a sobrelotação animal, que associada a um sistema de limpeza ineficaz aumenta os níveis de contaminação dos tetos (Constable et al. 2017).

A eficiência dos ordenhadores e da própria máquina de ordenha, bem como a rapidez com que esta é realizada, são fatores de risco que poderão conduzir ao desenvolvimento de doença. A higiene em geral de todos os elementos que integram este sistema de ordenha, constitui um fator de risco (Constable et al. 2017).

Um ponto crítico da ordenha consiste no período pós-ordenha, pelo facto de o canal do teto permanecer aberto, tornando viável a invasão ascendente dos microrganismos. Uma boa prática, para contornar este risco, consiste no fornecimento de alimento na manjedoura logo após a ordenha para que, deste modo, a vaca permaneça em estação e, assim, evite o contacto direto com agentes patogénicos do piso do parque de alimentação (Biggs 2009; Langoni 2013). Plozza et al. (2011), concluíram que esta prática contribuiu para que a prevalência de MSC fosse inferior a 20%, em explorações australianas.

2.9.1. Condição física dos tetos

O canal do teto constitui uma barreira natural à entrada de microrganismos e, uma vez corrompida por alguma lesão no teto, irá evidenciar-se como mais um fator de risco importante na incidência de infecções IMMs. A integridade da pele e da extremidade do teto impedem a invasão bacteriana e o surgimento de novas infecções (Neijenhuis 2004). As lesões físicas, como, por exemplo, a hiperqueratose induzida pela máquina de ordenha, facilitam a propagação de infecções bacterianas secundárias (Teixeira et al. 2008).

A hiperqueratose da extremidade do teto é uma afeção comum nas explorações leiteiras devido à má utilização da sala de ordenha. O grau de hiperqueratose varia conforme os seguintes fatores: número de lactações, número de dias em lactação (Constable et al. 2017), inexistência de retiradores automáticos das tetinas na máquina de ordenha, entre outros (Sousa 2008). De acordo com Sousa (2008), tetos com grau de

hiperqueratose extremo estão em maior risco de contraírem infecções do que aqueles em que o grau é menos pronunciado.

2.9.2. Higiene do úbere

A higiene da pele do úbere é um fator de risco para infecções IMMs por agentes ambientais (Constable et al. 2017). Os autores Schreiner e Ruegg (2003) demonstraram que as vacas com úberes sujos (grau 3 ou 4 no sistema de avaliação visual) eram mais propensas a estarem infetadas por agentes maiores de mastite, do que vacas com úberes limpos (grau 1 ou 2).

2.9.3. Nutrição

O plano de nutrição é outro fator que tem um impacto importante na expressão clínica da mastite em novilhas e vacas (Heinrichs et al. 2009). O sistema imunitário de um animal bem nutrido é sempre mais eficiente.

O BEN durante a lactação poderá levar ao desenvolvimento de esteatose hepática e cetose (Goff 2006). A nutrição poderá relacionar-se com a prevenção de hipocalcemia puerperal através da instituição de dietas com uma diferença catiónica-aniónica negativa, possivelmente pela alteração estrutural do receptor da hormona da paratiróide no osso, facilitando assim a mobilização do cálcio a partir do mesmo (Horst et al. 1997 citado por Overton and Waldron 2004).

Segundo Biggs (2009), a implementação de uma dieta apropriada mantém uma consistência normal das fezes, que, por sua vez, reduz a contaminação fecal dos tetos e conseqüentemente a infecção por agentes que estão envolvidos na patogénese da mastite ambiental. A vitamina E e o selénio poderão ser fatores benéficos na saúde do úbere pelo seu poder antioxidante, diminuindo a incidência e duração de episódios de mastite (Constable et al. 2017). A vitamina E por si só foi descrita como estimuladora da resposta imunológica pós-parto (Spears and Weiss 2008). Várias investigações provaram que neutrófilos de vacas que consomem alimentos suplementados com selénio, são mais ativos no combate a microrganismos de mastite quando comparados com aqueles de vacas não suplementadas (Erskine et al. 1989).

2.10. Estação do ano

A correlação entre a estação do ano e a incidência de mastite é variável consoante as condições climáticas características de cada região (Constable et al. 2017). Os meses de verão e chuvosos estão relacionados com maiores percentagens de mastite (Ribeiro 2001). As amplitudes térmicas, bem como a percentagem de humidade são fatores de risco

relevantes (Tiwari et al. 2013). A multiplicação bacteriana e a quantidade de agentes patogénicos será tanto maior quanto maior o calor e a humidade ambiental (Godden et al. 2003; Hillerton et al. 2003). A permanência em ambiente húmido, quer seja em pastagem ou em estabulação, associa-se a uma maior probabilidade de emergirem novas infeções IMMs. Quando se trata de climas tropicais e subtropicais, a mastite surge mais no inverno e na primavera, face a um aumento da humidade relativa (Biggs 2009).

Com base no estudo de Hillerton et al. (2003), os casos clínicos de mastite confirmados por exame bacteriológico como mastites de verão (ou seja, envolvendo *T. pyogenes* normalmente em conjunto com outros agentes), foram quase todos associados aos meses de Julho, Agosto, Setembro e Outubro.

2.11. Resistência do agente etiológico

A resistência a procedimentos de limpeza e desinfeção é uma característica de cada agente patogénico. A maior predisposição para resistência à desinfeção surge mais nas mastites contagiosas do que nas ambientais (Constable et al. 2017).

A panóplia de fatores de virulência bacterianos que se expressam conforme as várias fases de lactação e que facilitam o processo de infeção podem ser: capacidade de colonizar, produção de toxinas (lipopolissacárido da *E. coli*), enterotoxinas, α e β toxinas, coagulase, hemolisina, hialuronidase, leucocidinas e formação de biofilme (Constable et al. 2017). O biofilme confere a capacidade de permanecer nos equipamentos de ordenha, de sobreviver aos processos imunológicos e antimicrobianos, e ainda de invadir o meio intracelular de macrófagos e polimorfonucleares (Radostits et al. 2007; Arnold and Bewley 2011; Prenafeta et al. 2014).

3. CONTROLO E PREVENÇÃO

Grande parte do controlo de mastite centra-se na eliminação de agentes que normalmente causam infeção por via contagiosa (como por exemplo, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*) (Pillar et al. 2009) e na prevenção do acesso dos agentes que se encontram no ambiente da exploração, ao interior da GM (como por exemplo, *E. coli*) (Bradley 2002; LeBlanc et al. 2006).

A prevenção de mastite por *S. aureus* poderá envolver as seguintes medidas de biossegurança e sanitárias: limpeza e secagem dos tetos antes da ordenha, utilização adequada das máquinas de ordenha, desinfeção dos tetos pós-ordenha, tratamento no período seco, refúgio precoce de vacas com infeções crónicas, ordenha das vacas infetadas separadamente e instituição de um programa ativo de qualidade do leite (Smith et al. 1998 citado por Rainard et al. 2017).

O controlo de mastite por *Streptococcus agalactiae* requer a adoção de boas práticas de higiene, um tratamento adequado dos casos clínicos e subclínicos na secagem, que, por sua vez, poder-se-á refletir numa prevalência de infeção inferior a 10% do efetivo. Os fatores que aumentam o risco de contrair infeção por este agente são: higiene pobre na ordenha, a negligência na terapia de secagem e a falta de desinfeção dos tetos pré-ordenha (Constable et al. 2017).

Independentemente do material utilizado nas camas, a remoção de material sujo e húmido do terço posterior das camas irá reduzir significativamente o número de contagens bacterianas. A utilização de camas de estrume pode ser uma prática bem sucedida, se for feita uma substituição diária do terço posterior das camas (Hogan and Smith 2012).

Numa exploração cujo plano de controlo seja apropriado, a incidência de MC por *C. bovis* não deverá ser superior a 1,7% dos casos (Constable et al. 2017).

As medidas de controlo impostas para insetos são cruciais no maneiio da exploração, dado que estes funcionam como vetores na transmissão de agentes patogénicos entre vacas e poderão causar lesões diretas na extremidade do teto (McDougall et al. 2009; Arnold and Bewley 2011; Nickerson 2014).

3.1. Tratamento no período seco

O tratamento da vaca seca é a instituição terapêutica antimicrobiana logo após a última ordenha da lactação, sendo importante num programa de controlo de mastites eficaz. As infusões IMM no momento da secagem irão diminuir o número de infeções pré-existentes e prevenir novas infeções durante as primeiras semanas do período seco (Constable et al. 2017). As formulações para administração IMM no momento da secagem contêm antibióticos de longa ação, e as suas vantagens em relação ao tratamento durante a lactação são: uso de doses superiores, manutenção da concentração IMM prolongada (ausência de ordenha regular) e o seu uso apropriado pode reduzir o risco de resíduos no leite (Cameron and Keefe 2014 citado por Royster and Wagner 2015). Distinguem-se dois tipos de terapia na secagem, geral ou seletiva. Respetivamente, consistem no tratamento com antimicrobiano de todas as vacas ou no tratamento seletivo de vacas com mastite, usando-se apenas selantes nas vacas não infetadas (Scherpenzeel et al. 2016).

A preocupação global com a resistência aos antibióticos leva à restrição do seu uso, incluindo na terapia de secagem, dentro da produção leiteira (Scherpenzeel et al. 2016). Na Holanda em 2013, foi introduzido o método seletivo no tratamento da secagem. Scherpenzeel et al. (2016) e Edmondson (2015) citados por Pacheco (2018), defendem que os fatores a serem avaliados para selecionar as explorações para este método podem ser os seguintes: cultura bacteriológica, CCS do efetivo e individuais, registo de casos clínicos de mastite e a presença ou ausência de infeções por *S. aureus*, *S. uberis* e *S. agalactiae*.

De acordo com Rabiee e Lean (2013) citado por Breen (2014), a eficácia dos produtos selantes internos de tetos, que contêm subnitrato de bismuto, na prevenção de novas infeções durante o período seco encontra-se bem definida e contribui eficazmente para o manejo da vaca seca. Com base numa meta-análise de 18 artigos de investigação publicados nos últimos 10 anos, a aplicação de selante interno do teto na presença de antibiótico durante o período seco ou o seu uso de forma isolada no momento da secagem, reduziu significativamente a incidência de infeção IMM e de MC em vacas leiteiras, comparadas com os respetivos grupos de controlo.

3.2. Vacinação

Ainda não existe um consenso para o protocolo vacinal mais eficaz no controlo e prevenção de infeção por *Staphylococcus aureus*. Algumas vacinas foram testadas, mas o seu efeito varia dependendo do tipo de vacina, adjuvantes e outros fatores. De acordo com Pereira et al. (2011), as vacinas que empregam novas tecnologias (ADN e proteína recombinante) e algumas bacterinas de longa duração atingiram bons resultados.

Segundo Piepers (2014) citado por Schukken et al. (2014), a perspetiva vacinal para *S. aureus* e SCN consiste na redução da incidência e duração da infeção. Com base em dois estudos internacionais, a vacina multivalente que visa o controlo de mastites (STARTVAC®, laboratório HIPRA) demonstrou ser eficaz na diminuição da incidência e duração de infeção IMM por estes agentes, através do aumento da taxa de cura e na redução da gravidade de mastite por coliformes. Verificou-se também um aumento da produção leiteira apenas nos animais vacinados (Schukken et al. 2014; Bradley et al. 2015). Os mesmos autores defendem que a eficácia depende de alguns fatores como a variação nas práticas de manejo, idade (mais eficaz para infeções por *S. aureus* na primeira lactação), implementação de boas práticas durante a ordenha e refugo antecipado de animais infetados (Schukken et al. 2014).

Molina et al. (2013), concluíram que a vacina *E. coli* J5 reduz a prevalência de infeção IMM pós-parto, tal como o surgimento de casos clínicos de mastite hiperagudos por *E. coli* num intervalo de cem dias pós-parto.

4. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de MC é realizado essencialmente através do exame físico (Constable et al. 2017). No caso da MSC, a sua deteção não é determinada pelo exame físico (Constable et al. 2017), dado que não se detecta os sinais de inflamação e a secreção leiteira é visivelmente normal (Adkins and Middleton 2018). Existe uma série de métodos indicados para o diagnóstico de MSC, dos quais os mais comuns são: CCS, avaliação de

biomarcadores no leite (como por exemplo, lactato, lactato desidrogenase, N-acetil-D-glucosaminidase, haptoglobina e proteína amiloide sérica A) (Kalmus et al. 2013) e condutividade elétrica do leite (variação iônica) (Adkins and Middleton 2018). Outros exemplos são a determinação do pH do leite e o teste de inibição da tripsina.

4.1. Exame físico

A MC é definida pela presença de leite visivelmente anormal, podendo ter uma aparência aguada ou espessada e apresentar sangue, pús, flocos ou coágulos de fibrina. Vacas com MC poderão também expressar tumefacção, dor e calor no quarto mamário afetado. Em alguns casos, podemos ter um quadro clínico sistêmico cujos sinais podem ser: pirexia, desidratação, fraqueza, inapetência e mesmo prostração (Royster and Wagner 2015). Os casos clínicos podem ainda ser classificados como leves, moderados ou graves conforme a presença ou ausência de sinais locais e/ou sistêmicos, como podemos observar na Tabela 1.

Tabela 1: Escala de gravidade para mastite clínica

GRAU	DESCRIÇÃO
1. Leve	Leite anormal (flocos, aguado ou coágulos)
2. Moderado	Leite anormal e sinais de inflamação do úbere (calor, inchaço e dor)
3. Grave	Sinais de grau moderado e sinais sistêmicos (p.ex. pirexia, desidratação, fraqueza e inapetência)

Adaptado de Royster e Wagner (2015)

Podemos classificar a MC como hiperaguda, aguda ou subaguda de acordo com a velocidade do quadro clínico. A hiperaguda caracteriza-se por uma inflamação grave, com inchaço, calor e dor evidente no quarto afetado, associados a uma reação sistêmica marcada que pode vir a ser fatal. A classificação como aguda consiste numa inflamação grave, mas sem reação sistêmica marcada. No caso da subaguda a inflamação é leve, e consistente com uma secreção leiteira alterada (Royster and Wagner 2015). A duração dos episódios de MC pode tomar três evoluções: curto-duração (*E. coli* spp. e *Klebsiella* spp.), recorrente (*S. aureus*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*) e persistente ou crônica (*S. agalactiae* e *M. bovis*).

4.2. Contagem de Células Somáticas (CCS)

A CCS tem vindo a ser utilizada como o Gold Standard dos métodos auxiliares de diagnóstico da MSC, sendo também um parâmetro importante para a produção pois afeta o preço do leite. Existe uma série de fatores individuais e a nível da exploração que influenciam a CCS. Logo, a interpretação correta desta contagem implica a consideração de alguns fatores: agente, número de lactações, fase de lactação, nível de produção leiteira, stress, estação do ano e raça (Sharma et al. 2011; Schepers et al. 1997 citado por Duarte et al. 2015). É frequente a elevação da CCS após o parto, durante um curto período (Dohoo 1993).

A CCS média da exploração poderá refletir a incidência de MC por agentes patogénicos ambientais (Constable et al. 2017). Um estudo desenvolvido por Malinowski et al. (2006), estabeleceu a relação entre a CCS e os agentes etiológicos, concluindo que vários agentes podem ser isolados a partir de amostras com a CCS aumentada, no entanto, os valores mais elevados associam-se a infeções por *T. pyogenes*, coliformes, *S. agalactiae*, *Streptococcus* spp., *Prototheca* spp. e fungos do tipo levedura. A CCS elevada numa fase tardia da lactação poderá implicar um agravamento da infeção subclínica, levando à diminuição da produção leiteira na lactação seguinte (Green et al. 2004).

O valor a partir do qual se considera MSC é de 200,000 células/ml, ou seja, abaixo deste valor considera-se que a GM se encontra livre de infeção. No entanto, a obtenção deste limite não descarta a possibilidade de existirem falsos-negativos nas culturas microbiológicas (Duarte et al. 2015). Vissio et al. (2014), determinaram a eficácia de ambos os métodos de diagnóstico de infeções IMMs, a CCS e a cultura microbiológica, e chegaram a uma estimativa mais baixa, 150,000 células/ml. A determinação deste novo limite tem em conta a ocorrência de falsos-negativos.

A metodologia adotada para quantificar a CCS poderá ser direta ou indireta. Os métodos diretos, ou utilizam contadores de células automáticos portáteis (práticos para uso no campo), ou recorrem a contadores automáticos com instalação laboratorial (Duarte et al. 2015). Para além destes, outro método direto é a contagem diferencial de células, que permite avaliar proporções celulares relativas por citometria (Pilla et al. 2013). Os métodos indiretos e semi-quantitativos são: TCM ou Teste de Wisconsin de Mastites (WMT). Ambos prevêm o número aproximado de células somáticas (CS), mas o WMT é mais preciso pois consiste na medição da altura da matriz viscosa (semelhante a gel) em milímetros (mm) (Duarte et al. 2015). Um método qualitativo é o teste da atividade da esterase, que consiste na conversão da atividade enzimática numa estimativa da CCS (Adkinsand Middleton 2018). A determinação da bioluminescência (concentração de ATP na célula somática ou a fluorescência do seu ADN), é outro procedimento que se pode utilizar (Hossain et al. 2017).

4.2.1. CCS do tanque de leite

A CCS do tanque de leite da exploração é um método indireto na avaliação da prevalência de mastite dentro da exploração leiteira. A análise da concentração de células somáticas no volume de leite do tanque, permite-nos estimar o número de quartos infetados embora não seja possível definir o número de vacas com mastite. Se a CCS exceder determinados níveis dentro da exploração devemos proceder a um exame individual e assim detectar os animais e os quartos mais infetados (Constable et al. 2017).

4.2.2. Teste Californiano de Mastites (TCM)

Aceite como o teste mais confiável e barato na deteção de MSC (Constable et al. 2017). O TCM consiste na adição de um agente detergente a uma amostra de leite cuja contagem de células é elevada, promovendo a lise celular e conseqüentemente a libertação de ácidos nucleicos, levando à sua precipitação e formação de uma matriz semelhante a um gel. A partir de determinado limite na concentração de células, visualiza-se alterações na viscosidade que irão ser interpretadas de forma subjetiva, não estando por isso isento de erro (Viguiet et al. 2009 citado por Duarte et al. 2015). A sensibilidade deste método para infeções IMMs corresponde a 66,7% e a sua especificidade a 54,8% (Sargeant et al. 2001 citado por Duarte et al. 2015).

4.3. Deteção de agentes de mastite

A identificação de agentes etiológicos responsáveis pelas infeções IMMs, poder-se-á basear em dois grupos metodológicos: fenotípicos (como por exemplo, cultura microbiológica e *mass spectroscopy using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight*) e/ou genotípicos (como por exemplo, *polimerase chain reaction*) (Duarte et al. 2015). Enquanto os métodos fenotípicos identificam o agente através da avaliação das características expressas a partir do ADN (como por exemplo, morfologia, capacidade de metabolizar substratos ou características de multiplicação), os métodos genotípicos utilizam o ADN como base para a identificação de espécies e estirpes (Zadoks and Watts 2009 citado por Duarte et al. 2015).

4.3.1. Cultura microbiológica

A cultura laboratorial de amostras de leite constitui um ótimo meio de diagnóstico, na medida em que identifica os agentes etiológicos em causa. Esta cultura é muito útil, também, na determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos a fim de ser instituída uma terapêutica específica e eficaz em casos de MC (Constable et al. 2017).

A cultura a partir de amostras do tanque de leite tem como objetivos: monitorizar a qualidade do leite cru e a presença de agentes de mastite, particularmente agentes contagiosos, como por exemplo *S. aureus*, *S. agalactiae* e *Mycoplasma* spp. (Adkins and Middleton 2018). Uma única cultura a partir de uma amostra de leite do tanque apresenta, no âmbito estatístico, uma elevada especificidade para *S. aureus* e *S. agalactiae*, ou seja, se o resultado for negativo é pouco provável que este seja um falso negativo (Constable et al. 2017).

A cultura de amostras de um quarto é recomendada como a primeira linha de diagnóstico de mastite, ao contrário da cultura de amostras dos quatro quartos mamários que se revelam úteis na biovigilância de explorações quando se tem em conta as suas limitações (como por exemplo, a fase da lactação pode influenciar a deteção de infeção IMM por SCN) (Reyher and Dohoo 2011).

4.3.2. Sistemas de cultura na exploração

A implementação deste tipo de sistema visa promover a multiplicação bacteriana seletiva, com o intuito de categorizar casos de mastite em grupos amplos de diagnóstico (com ou sem multiplicação e Gram-negativo ou Gram-positivo). Os resultados, a partir destes sistemas, estão disponíveis em 18-24h, com um custo reduzido. Como as amostras sem multiplicação constituem 10 a 40% do total de casos de MC (Bartlett et al. 1992 e Olde Riekerink et al. 2008 citados por Royster and Wagner 2015), optar por este tipo de cultura poderá ajudar a reduzir o uso de antibióticos (Lago et al. 2011 citado por Royster and Wagner 2015).

Estudos realizados com o intuito de validar este tipo de testes apontaram para uma resposta satisfatória, mas, do ponto de vista estatístico, a especificidade ainda é baixa. Investigadores compararam dois sistemas de cultura numa exploração, e perceberam que as diferenças residiam na seleção para a multiplicação de Gram-positivos e Gram-negativos, e por outro lado, de bactérias aeróbias e coliformes. Ambos foram capazes de distinguir entre Gram-positivo e Gram-negativo, com especificidade e sensibilidade elevadas. Todavia, não permitiam determinar se a amostra estava contaminada (Lago et al. 2011 e McCarron et al. 2009 citados por Duarte et al. 2015; Adkins and Middleton 2018).

5. TRATAMENTO

A estratégia a adotar na resolução da mastite deverá basear-se na sua diferenciação como clínica ou subclínica, no estado de saúde geral do animal e no historial clínico do animal e da exploração. No caso de MC é necessário aplicar métodos específicos para selecionar quais são os casos a serem tratados com antimicrobianos. A necessidade de

tratar ou não a MSC durante a lactação pode depender da avaliação dos seguintes fatores: agente, idade, número de infecções IMMs e grau de saúde geral do úbere (Constable et al. 2017).

A decisão de administrar ou não antibióticos irá implicar a consideração de determinados fatores, tais como o tipo e gravidade da resposta inflamatória, duração da infecção, fase de lactação, idade e o estado gestacional do animal (Constable et al. 2017). Para além da antibioterapia, é necessário definir se será igualmente necessário tratamento de suporte. A administração sistémica e IMM com antibióticos adequados, complementada com tratamento de suporte (como por exemplo, fluidoterapia, anti-inflamatórios e aplicação de frio) é recomendada na MC aguda ou subaguda com quadro clínico sistémico (Hossain et al. 2017).

5.1. Antibioterapia

5.1.1. Via de administração

A via de administração será uma decisão importante na instituição terapêutica, sendo que o objetivo principal consiste em atingir o tecido alvo e manter concentrações eficazes no local. De uma forma geral, as infecções limitadas ao leite e ao epitélio dos ductos e alvéolos são facilmente debeladas pela administração IMM. As infecções mais complicadas de tratar são aquelas em que o compartimento afetado é o parênquima (são exemplos, *S. aureus* e *T. pyogenes*). Esta afirmação assenta sobre o facto de ser difícil atingir este tipo de tecido e manter concentrações eficazes de antibiótico quando é escolhida a via IMM (Constable et al. 2017). A administração IMM deverá obedecer a alguns pontos, como o espectro, a farmacocinética e a farmacodinâmica do antimicrobiano aplicado, para além do custo associado (Royster and Wagner 2015).

A administração parenteral reserva-se a situações em que o estado geral está comprometido (pirexia, falta de apetite e inapetência), ou quando estamos perante um úbere marcadamente edemaciado, levando a uma difusão ineficaz do antibiótico IMM (Royster and Wagner 2015).

5.1.2. Escolha do antibiótico

A escolha do antibiótico depende de vários fatores que devem ser analisados criteriosamente, como a identificação do agente etiológico, da sua sensibilidade aos antibióticos e dos dados epidemiológicos da exploração. Os critérios que permitem avaliar e determinar qual o agente antimicrobiano a ser utilizado são os seguintes: disponibilidade de fármacos aprovados, sinais clínicos, agente etiológico de mastites anteriores, histórico de

sucesso terapêutico na exploração, custo de tratamento e intervalos de segurança para leite e carne (Constable et al. 2017).

5.1.3. Antibióticos utilizados no tratamento de mastite

A mastite bovina é a causa mais frequente para o uso de antibióticos nas explorações de vacas de leite (Constable et al. 2017). Royster e Wagner (2015) fizeram uma revisão dos princípios ativos utilizados e aprovados nos Estados Unidos da América para o tratamento de mastite por administração IMM. Alguns exemplos são: amoxicilina, cloxacilina, cefapirina, ceftiofur e pirlimicina.

De acordo com Teixeira et al. (2008), alguns dos antibióticos indicados para o tratamento de mastite podem ser: penicilina, ampicilina, penetamato de penicilina, gentamicina, nafcilina, cefazolina, cefoperazona e cefquinoma. A utilização de cefalosporinas por exemplo, de segunda, terceira ou quarta geração, deverá ser uma opção, apenas quando os antibióticos de primeira linha e/ou cefalosporinas de gerações anteriores tenham revelado ineficácia ou resposta inadequada ao tratamento, e deverá ser uma decisão acompanhada do resultado da cultura microbiológica e da sensibilidade ao antibiótico (Morley et al. 2005).

5.1.3.1. β -lactâmicos

Este grupo de antibióticos é considerado tempo-dependente, ou seja, o fator de maior preponderância para determinar a sua eficácia é o período em que a concentração plasmática do antibiótico permanece superior à concentração mínima inibitória (CMI) para determinada bactéria. As penicilinas e as cefalosporinas integram este grupo (Tabela 2), bem como as aminopenicilinas (como por exemplo a amoxicilina). O mecanismo de ação das cefalosporinas é semelhante ao das penicilinas, inibindo a síntese da parede do microrganismo (Spinosa et al. 2017).

Alguns exemplos de penicilinas administradas por via IMM são: penicilina e neomicina, e, penicilina e dihidroestreptomicina (Constable et al. 2017).

Tabela 2: Classificação das penicilinas, cefalosporinas e algumas características de cada grupo

GRUPO	OBSERVAÇÃO/CARACTERÍSTICAS
Penicilina G ou benzilpenicilinas Cristalina: sódica e potássica Longa ação: procaína e benzatina	Espectro de ação: bactérias Gram-positivas.
Penicilinas resistentes às β-lactamases (antiestafilocóccicas) Isoxazolipenicilinas:	Espectro de ação: <i>Staphylococcus</i> spp. resistentes às β -lactamases; Pouca atividade contra bactérias Gram-negativas devido à dificuldade de atravessar a camada externa da parede celular.

cloxacilina	
Cefalosporinas de 1ª geração (p. ex. cefazolina, cefalexina)	Resistentes às β -lactamases de <i>Staphylococcus</i> spp.; Sensíveis às β -lactamases de <i>Enterobacteriaceae</i> .
Cefalosporinas de 2ª geração (p. ex. cefoxitina, cefaclor)	Resistentes a várias β -lactamases.
Cefalosporinas de 3ª geração (p. ex. cefoperazona, ceftiofur)	Resistentes a várias β -lactamases; Cefoperazona é ativa contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
Cefalosporinas de 4ª geração (p. ex. cefquinoma)	Resistentes às β -lactamases de <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterobacteriaceae</i> spp. e <i>Pseudomonas</i> spp.

Adaptado de Spinosa et al. 2017

Os beta-lactâmicos são usados de forma mais frequente. A cefoperazona é uma cefalosporina de terceira geração cuja atividade alberga a maior parte dos agentes de mastite. A sua formulação para infusão IMM foi aprovada para o controlo de infeções causadas por *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., e *E. Coli* (Feßler et al. 2012). Para além desta, existem outros exemplos de cefalosporinas com formulações IMM (cefquinoma, cefalexina e canamicina) (Bradley and Green 2009).

Amoxicilina e ácido clavulânico – A amoxicilina tem atividade contra bactérias Gram-positivas sensíveis à penicilina, bem como algumas bactérias Gram-negativas. O espetro de atividade dos Gram-positivos inclui: *Streptococcus* (α e β -hemolíticos), algumas espécies de *Staphylococcus*, *Clostridium* spp., e algumas estirpes de *Bacillus anthracis*. O espetro de bactérias Gram-negativas inclui: *E. coli*, muitas estirpes de *Salmonella*, e *Pasteurella multocida* (Thomson 2003). Por sua vez, a amoxicilina é sensível às β -lactamases e por si só não é eficaz contra bactérias do grupo *Enterobacteriaceae*, nomeadamente *E. coli* e *Klebsiella* spp, uma vez que estas produzem este tipo de enzimas (Thomson 2003; Dahmen et al. 2013).

O clavulanato é um inibidor natural (não competitivo) da β -lactamase produzida por bactérias Gram-positivas e muitas Gram-negativas também. Este tem pouca atividade antibacteriana quando atua isoladamente (Thomson 2003). No entanto, quando o ácido clavulânico é administrado em conjunto com a amoxicilina, estende a atividade da mesma prevenindo a sua degradação pelas enzimas bacterianas (Thomson 2003).

Iodohidrato de penetamato – Este composto antimicrobiano é um éster da penicilina G, que se concentra nos tecidos da GM e no leite após administração intramuscular. Encontra-se licenciado em vários países para o tratamento de MSC causada por agentes maiores Gram-positivos. Ativo contra *Streptococcus* spp. e *S. aureus* sensíveis à penicilina (leite e intraepitelial) (Salat et al. 2008).

5.1.3.2. Lincosamidas

As lincosamidas são antibióticos bacteriostáticos, podendo ser bactericidas em concentrações elevadas (tempo-dependente). O seu mecanismo de ação consiste na inibição da síntese proteica. A lincomicina é um exemplo deste grupo (Spinosa et al. 2017). De acordo com Krömker et al. (2010), a combinação de lincomicina e neomicina pode ser utilizada no tratamento de mastite por *S. uberis*.

A pirlimicina também faz parte deste grupo, e pode ser utilizada no tratamento de mastites por *S. aureus* (Oliveira et al. 2013 citado por Sousa 2017).

5.1.3.3. Quinolonas

São antibióticos bactericidas, cujo mecanismo de ação se traduz na inibição da DNA girase (Spinosa et al. 2017). O seu espectro de ação varia consoante a geração de quinolonas, estando as mais recentes associadas a uma maior eficácia contra bactérias Gram-positivas. A partir da segunda geração denominam-se fluoroquinolonas (Spinosa et al. 2017).

1. Primeira geração: ácido nalidíxico, ácido oxolínico e cinoxacina;
2. Segunda geração: ciprofloxacina, enrofloxacina, marbofloxacina, danofloxacina, difloxacina, norfloxacina e enoxacina;
3. Terceira geração: orbifloxacina, levofloxacina, sparfloxacina, grepafloxacina;
4. Quarta geração: trovafloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina, gemifloxacina e stitafloxacina (Martinez et al. 2006).

As quinolonas e fluoroquinolonas são regularmente utilizadas em medicina veterinária dado o seu amplo espectro de atividade e pelo facto de serem agentes antimicrobianos seguros (Balakrishnan et al. 2016). Todavia, em alguns países, a utilização de fluoroquinolonas é proibida para o tratamento de mastites (Constable et al. 2017), pois, devido às resistências aos antibióticos, estes fármacos são de extrema importância para a saúde humana. Quando permitidos, devem ser utilizados apenas em casos excecionais (Guardabassi et al. 2010).

5.1.3.4. Sulfonamidas

As sulfonamidas são antimicrobianos com actividade concentração-dependente. O seu mecanismo de ação consiste na interferência com a biossíntese do ácido fólico. Logo, a sua atividade bacteriostática é eficaz contra células bacterianas, uma vez que estas sintetizam ácido fólico, ao contrário das células de mamíferos que utilizam ácido fólico pré-formado (Prescott 2013). No entanto, podem causar reações adversas graves pois são uma

substância estruturalmente análoga à substância necessária à síntese do ácido fólico. Este grupo de antibióticos apresentam um largo espectro de atividade, abrangendo Gram-positivos e alguns Gram-negativos (*Enterobacteriaceae*) (Spinosa et al. 2017). Diferentes sulfonamidas podem não ter diferenças qualitativas na sua atividade (Prescott 2013).

O trimetoprim pode ser usado de forma isolada, todavia a sua associação com as sulfonamidas tem um sinergismo positivo pois ambos atuam em etapas distintas na formação do ácido tetraidrofólico, culminando num efeito bactericida (Spinosa et al. 2017).

As sulfonamidas em combinação com o trimetoprim são comumente utilizadas para antibioterapias de amplo espectro em medicina veterinária. As suas principais indicações no gado bovino são infecções do trato urinário e gastrointestinal, mastite e metrite (Kartinen et al. 1999). No entanto, será de referir que no bovino adulto o trimetoprim é metabolizado e eliminado muito rapidamente (Plumb 2011).

5.1.3.5. Aminoglicosídeos

São antibióticos importantes para o tratamento de infeções causadas por Gram-negativos. A sua atividade bactericida (concentração-dependente) resulta da interferência na síntese protéica, e, para tal, é necessário penetrarem na célula. Tendo em conta este fato, a associação com os β -lactâmicos resulta num efeito sinérgico, facilitando o seu transporte intracelular. Para além disso, o seu efeito pós-antibiótico (supressão bacteriana após remoção do antibiótico) é evidente (Spinosa et al. 2017). São instituídos no tratamento de infeções graves por Gram-negativos aeróbios e *Staphylococcus* spp. (Gram-positivos). A neomicina é utilizada no tratamento de mastite por administração IMM (Keswani et al. 2010).

A combinação de um aminoglicosídeo e de uma cefalosporina de 1ª geração foi licenciada na Europa em 2008, utilizando-se a canamicina e a cefalexina, dando origem ao Ubrolexin® (Boehringer Ingelheim Animal Health, Ingelheim, Germany) para administração IMM em vacas infetadas. Esta conjugação estende o espectro de atividade quando comparado com a atividade individual, demonstrando sinergismo para agentes maiores de mastite (*S. aureus*, *S. uberis* e *E. coli*) (Silley et al. 2012).

5.2. Anti-Inflamatórios Não Esteroides (AINES)

O tratamento de suporte conta com os AINES como elementos fulcrais para amenização de casos de MC hiperagudos ou agudos, em que seja evidente o envolvimento sistémico, refletindo-se no seu estado geral e quadro clínico (pirexia, taquicardia, taquipneia e hipomotilidade ruminal). São exemplos mais comuns na terapia de vacas leiteiras o cetoprofeno, fenilbutazona e meloxicam (Constable et al. 2017).

6. PROGNÓSTICO

Um tratamento de mastite eficaz, depende principalmente do seguinte: diagnóstico exato, gravidade da infecção da GM, escolha do antibiótico e via de administração adequada, tratamento de suporte e exclusão de fatores predisponentes (Hossain et al. 2017). A conjugação de um início rápido do tratamento e do seu prolongamento no tempo relacionam-se com uma melhoria das taxas de cura (Bradley and Green 2009).

Uma série de estudos estabeleceram fatores de risco que podem influenciar o prognóstico em casos de MC. Estes incluem fatores associados ao animal como a idade, número de partos, fase de lactação, CCS, história de mastite, e fatores associados ao agente etiológico como a virulência e a sensibilidade aos antibióticos (Ziesch and Krömker 2016).

6.1. Fatores associados ao animal

As vacas com MC que se encontram numa lactação prolongada e não estão gestantes, que apresentem claudicação ou outras doenças concomitantes ou baixa produção de leite, deverão ser consideradas para refugio em vez de serem submetidas a tratamento (Constable et al. 2017). De acordo com um estudo de Pinzón-Sánchez e Ruegg (2011) citado por Royster and Wagner (2015), em surtos de MC leve ou moderada, e sem especificidade etiológica, o aumento do número de partos e a ocorrência de MC associaram-se a uma diminuição da probabilidade de cura microbiológica. Segundo o estudo de Bradley e Green (2009), a temperatura retal elevada previamente ao tratamento associa-se a melhor prognóstico, assim como a baixa CCS individual. O país onde o animal se encontra, também pode influenciar o prognóstico de cura.

Investigações concluíram que o aumento do número de partos, o acréscimo na CCS previamente ao tratamento e o envolvimento de mais do que um quarto infetado, interligam-se com a redução da probabilidade de cura clínica em mastites por *S. aureus* (Barkema et al. 2006).

6.2. Fatores associados ao agente etiológico

A divergência entre as taxas de cura consoante o agente patogénico envolvido é uma formulação teórica comprovada na prática. Por exemplo, a mastite causada por *S. aureus* e *S. uberis* têm taxas de cura mais baixas quando comparadas com aquelas causadas por outras espécies de *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Estas diferenças têm como fundamento os fatores de virulência específicos do microrganismo, tais como as suas toxinas, grau de invasão ou lesão do tecido, e a imunodepressão consequente, ou poderá dever-se à sua menor suscetibilidade aos antibióticos (Royster and Wagner 2015).

De acordo com um estudo retrospectivo da autoria de Wilson et al. (1999), foram isolados 21 agentes etiológicos a partir de 9007 casos de MSC. A taxa de cura espontânea correspondeu a 65%, enquanto a taxa de cura dos casos tratados com antibiótico foi igual a 75%.

Entre as espécies de *Staphylococcus* isoladas, os positivos à β -lactamase (enzima hidrolítica que desativa antibióticos β -lactâmicos) demonstram uma menor taxa de cura quando equiparados aos β -lactamase negativos, ainda que o antibiótico selecionado não seja do grupo dos β -lactâmicos (Barkema et al. 2006). De acordo com um estudo de Bradley e Green (2009), explorações onde a prevalência de *S. aureus* é elevada têm taxas de sucesso inferiores nos tratamentos de mastite.

7. PADRÕES DE SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

A resistência aos antibióticos é um conceito que deverá ser de grande preocupação na comunidade médica, uma vez que existem bactérias (como por exemplo, *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. e *Klebsiella* spp.) que se estão a tornar ameaças pelo desenvolvimento de resistências, podendo até possuir mecanismos de resistência múltiplos que tornam os tratamentos com a maior parte dos antimicrobianos ineficazes (Rocha 2013).

Com base num estudo de Nunes et al. (2007), os padrões de suscetibilidade em percentagem para *S. aureus* foram mais elevados para os seguintes antibióticos: cefquinoma, cefazolina, amoxicilina e ácido clavulânico, e sulfametoxazol associado ao trimetoprim. De acordo com Persson Waller et al. (2011), espécies de SCN apresentaram uma prevalência de sensibilidade aos antibióticos elevada, apesar de haver variações entre espécies. O grupo dos coliformes é sensível às tetraciclinas, cefalosporinas, amoxicilina (Blowey 1999), e quinolonas (D'Costa et al. 2006).

De acordo com Rocha et al. (2014) a evolução das resistências a diferentes antibióticos, ao longo de nove anos, foi demonstrada para os seguintes agentes etiológicos: *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. uberis*. No caso do género *Staphylococcus*, sabe-se que algumas estirpes sintetizam penicilases anulando a atividade da penicilina, pelo que dever-se-á recorrer a penicilinas sintéticas (como por exemplo, cloxacilina), a associações antimicrobianas (amoxicilina e ácido clavulânico) ou a antibióticos tolerantes às penicilases (como por exemplo, eritromicina e novobiocina).

8. CONTROLO DAS RESISTÊNCIAS AOS ANTIBIÓTICOS

A perpetuação de mecanismos de resistência bacteriana culmina nas seguintes repercussões negativas: decréscimo na eficácia do controlo, tratamento e produtividade; probabilidade de haver transmissão de bactérias resistentes para os seres humanos através

de produtos lácteos crus e outras vias; evolução para mastites crónicas antecipando o refugo do animal (Sol et al. 2000; Constable et al. 2017).

O controlo do desenvolvimento de resistências aos antibióticos, de acordo com a Associação Veterinária Britânica, requer o seu uso responsável na prática. Para tal criaram um plano de oito pontos (Breen 2014):

1 – Trabalhar com os clientes para evitar a necessidade de recorrer aos antibióticos. Programas de controlo de doença integrados, planeamento de saúde e bem-estar animal e isolamento de animais infetados sempre que possível.

2 – Evitar o seu uso inapropriado. Por exemplo, no caso de infeções virais simples, restringir o seu uso para animais doentes ou em risco, aconselhar os clientes sobre como administrar corretamente e como é importante completar o tratamento, e também evitar o subdoseamento;

3 – Escolher o antibiótico certo para o agente certo. Identificar quais os organismos alvo e prever a sua suscetibilidade; Criar protocolos baseados na prática para infeções comuns, tendo em conta a avaliação clínica e o conhecimento atualizado; Saber como os antibióticos atuam e a suas propriedades farmacodinâmias; Selecionar antibióticos com o espectro de ação mais restrito possível;

4- Monitorizar a sensibilidade aos antibióticos. A sensibilidade microbiológica tem de ser determinada sempre que for possível, de forma a fazer alterações no tratamento se for necessário;

5 – Minimizar o seu uso como profilático. Usar apenas quando os animais se encontram em risco ou quando há evidência de que a sua utilização irá reduzir a morbilidade e/ou mortalidade;

6 – Minimizar a sua utilização no peri operatório. Utilizar unicamente quando necessário, adotar técnicas de assépsia rigorosas e orientações práticas escritas;

7 – Registrar e justificar desvios no seguimento dos protocolos. Ser capaz de justificar a escolha e dose do antibiótico, manter registos precisos do tratamento e do seu resultado de forma a ajudar na avaliação de regimes terapêuticos;

8 – Reportar suspeitas na falha do tratamento à Direção Geral da Alimentação e Veterinária (DGAV). Esta poderá ser a primeira indicação de resistência. A notificação deverá ser enviada através do Sistema Nacional de Farmacovigilância Veterinária (SNFV).

CAPÍTULO 3 – ESTUDO RETROSPETIVO SOBRE A PREVALÊNCIA DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DE MASTITES E SUA SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS NA ILHA DE SÃO MIGUEL

1. OBJETIVOS

A elaboração e desenvolvimento deste estudo retrospectivo visa cumprir os seguintes objetivos:

- Considerando o período do estudo (2013-2018), determinar a prevalência dos agentes etiológicos, comparar a prevalência de agentes contagiosos e ambientais, assim como a prevalência de agentes maiores e menores;
- Avaliar a prevalência anual dos agentes etiológicos em geral e comparar a prevalência anual de agentes maiores e menores;
- Calcular as percentagens dos agentes etiológicos cuja sensibilidade aos antibióticos classifica-se como: sensível, intermédio e resistente. Avaliar as resistências totais e por agente;
- Calcular a prevalência dos agentes etiológicos isolados a partir de amostras com resultado negativo e positivo ao TCM, e a partir de amostras de MC.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Caracterização de dados e do estudo

Os dados são referentes ao período compreendido entre 26 de Março de 2013 e 6 de Dezembro de 2018.

Os dados representados e tratados neste estudo resultam da colheita de amostras de leite obtidas pelo produtor/proprietário da exploração e pelo médico veterinário responsável pelo departamento da qualidade do leite (DQL) da AASM. Pelo que, o método de colheita não foi executado de forma uniforme e não esteve sempre em concordância com as recomendações enunciadas pelo National Mastitis Council (NMC).

Os protocolos, de isolamento e identificação dos agentes etiológicos e do TSA, foram realizados no laboratório da AASM. A análise laboratorial foi realizada pelo mesmo médico veterinário ao longo do período considerado. Os quartos mamários não foram especificados na apresentação dos resultados do TCM.

Este estudo inclui uma compilação de 4680 amostras provenientes de 842 vacas. O número de explorações em causa é igual a 553. Relativamente ao TCM, este foi realizado antes da recolha da amostra pelo médico veterinário na exploração. Contabilizou-se 3493 resultados do TCM. Por outro lado, 509 amostras foram colhidas de vacas com MC. Além

disso, 678 casos de suspeita de mastite não têm resultados do TCM ou informação sobre o seu diagnóstico como MC, pois as amostras foram recolhidas pelo produtor. No entanto, procedeu-se à sua cultura e isolamento contabilizando-se, no final, 482 isolados.

Considerando o estudo da sensibilidade aos antibióticos de isolados dos agentes etiológicos, foi possível analisar o resultado de 1738 antibiogramas, dos quais 1724 fazem parte do estudo. A exclusão de 14 antibiogramas deve-se ao facto de pertencerem aos agentes agrupados como Outros, não sendo possível analisar as suas resistências por agente.

Em relação aos antibióticos, foram testados os seguintes: cefquinoma, iodohidrato de penetamato, cefalexina + canamicina, cefalónio, fluoroquinolonas, amoxicilina + ácido clavulânico, lincomicina + neomicina, cloxacilina, cefoperazona, cefazolina, canamicina, penicilina e sulfamida + trimetoprim.

Dos antibióticos apresentados, apesar da categorização como iodohidrato de penetamato, não há distinção de resultados deste e da sua combinação com a penicilina. Tendo em conta que não existe informação sobre quais as fluoroquinolonas testadas, e o facto dos seus resultados estarem agrupados, estes estão identificados apenas como fluoroquinolonas.

2.2. Tratamento de Dados

O tratamento dos dados foi realizado através do programa Microsoft Excel 2010, e limitou-se à análise descritiva, nomeadamente através de contagens e cálculo de prevalências.

3. Resultados

Como podemos observar na Tabela 3, foram analisadas 4680 amostras de leite, das quais, 863 (18,44%) não revelaram multiplicação microbiana e 453 (9,68%) foram classificadas como contaminadas. Em relação aos agentes etiológicos de mastites, podemos observar as percentagens de isolados por ordem decrescente:

- *S. aureus* (24,79%); *S. uberis* (14,51%); *Corynebacterium* spp. (9,08%); SCN (6,18%); *E. coli* (4,59%); *E. faecalis* (4,19%); leveduras (2,50%); *S. agalactiae* (1,45%); *Streptococcus* spp. (1,22%); *Prototheca* spp. (0,83%); Outras *Enterobacteriaceae* (0,83%); *Trueperella* spp. (0,79%); Outros (0,64%); *Klebsiella* spp. (0,28%).

Tabela 3: Prevalência dos resultados das culturas microbiológicas (2013-2018).

RESULTADOS DA CULTURA MICROBIOLÓGICA	PREVALÊNCIA (%)	NÚMERO DE AMOSTRAS
<i>Klebsiella</i> spp.	0,28	13
Outros	0,64	30
<i>Trueperella</i> spp.	0,79	37
Outras <i>Enterobacteriaceae</i>	0,83	39
<i>Prototheca</i> spp.	0,83	39
<i>Streptococcus</i> spp.	1,22	57
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1,45	68
leveduras	2,50	117
<i>Enterococcus faecalis</i>	4,19	196
<i>Escherichia coli</i>	4,59	215
SCN*	6,18	289
<i>Corynebacterium</i> spp.	9,08	425
Amostra Contaminada (AC)	9,68	453
<i>Streptococcus uberis</i>	14,51	679
Cultura Sem Multiplicação (CSM)	18,44	863
<i>Staphylococcus aureus</i>	24,79	1160
Total	100,00	4680

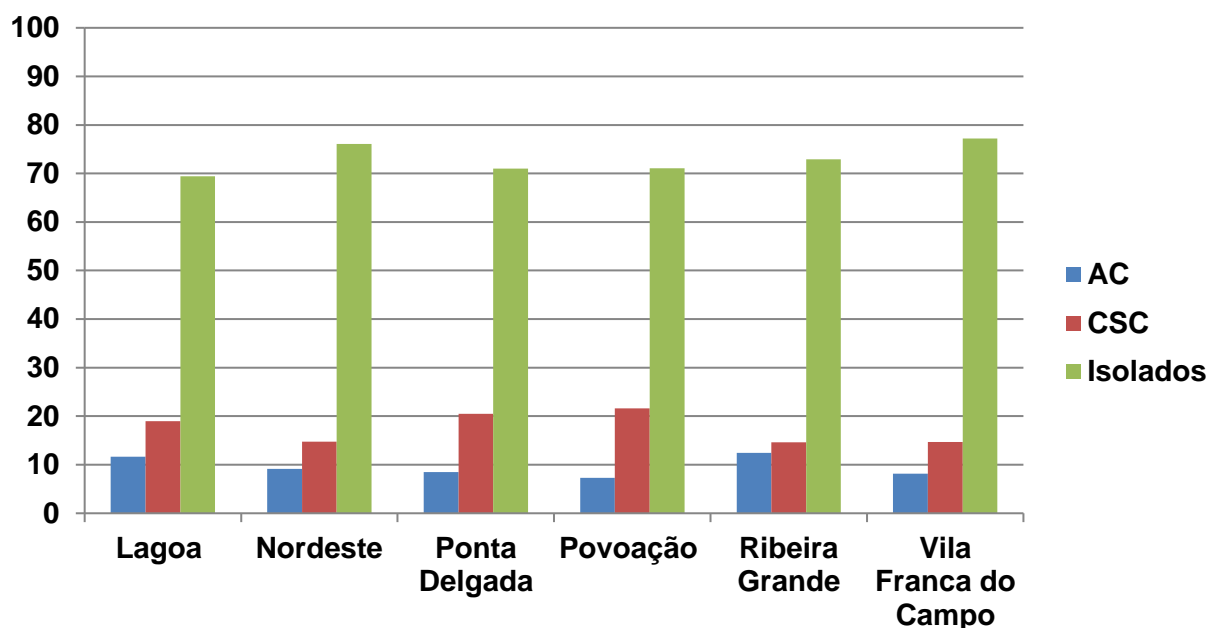
**Staphylococci* coagulase-negativo

Comparou-se a prevalência entre os agentes etiológicos considerados como contagiosos (*S. aureus*, *S. agalactiae* e *Corynebacterium* spp.) e ambientais (Outras *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Streptococcus* spp., *E. faecalis*, *T. pyogenes*, *Prototheca* spp., leveduras e SCN). *S. uberis*, como pode causar mastite por via ambiental ou contagiosa foi incluído no cálculo de ambos os grupos. Os resultados da cultura categorizados como “Outros” não foram incluídos no cálculo das percentagens.

A prevalência dos agentes contagiosos foi 49,83%, enquanto que a prevalência dos agentes ambientais foi 35,92%.

Atendendo ao Gráfico 1, que compara a prevalência dos isolados nos diversos concelhos onde foram recolhidas amostras, podemos observar que apesar de Vila Franca do Campo ser o concelho com maior prevalência de isolados, não se verifica uma variação notável.

Gráfico 1: Prevalência (%) de isolados por concelho.



AC = Amostra Contaminada; CSC = Cultura Sem Multiplicação

Na Tabela 4 encontra-se representado as percentagens de amostras contaminadas, de culturas sem multiplicação e de agentes etiológicos ao longo dos anos em estudo (2013-2018). O número total de amostras por ano representa-se por n. A percentagem mínima de amostras contaminadas corresponde a 2013 (3,46%), e a máxima verificou-se em 2017 (14,27%). No caso das CSC, em 2013 atingiu-se a percentagem mínima (13,48%) e em 2015 a percentagem máxima (23,12%). A percentagem de AC e CSC são, respectivamente, 3,46% e 11,26% em 2013 e 13,48% e 21,04% em 2018. Como podemos observar a percentagem tanto de AC, como de CSC foram superiores em 2018.

Tabela 4: Prevalência anual dos resultados das culturas microbiológicas ao longo dos anos em estudo (2013-2018).

RESULTADOS DA CULTURA MICROBIOLÓGICA	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Total	n = 838	n = 682	n = 744	n = 876	n = 925	n = 613
AC	3,46%	8,06%	7,93%	12,21%	14,27%	11,26%
<i>Corynebacterium spp.</i>	9,07%	5,43%	1,61%	14,61%	12,97%	8,48%
CSM	13,48%	19,21%	23,12%	15,30%	19,89%	21,04%
<i>E. coli</i>	2,86%	6,16%	6,59%	3,54%	4,43%	4,57%
<i>E. faecalis</i>	2,86%	1,61%	2,55%	7,76%	6,49%	2,28%
Outras <i>Enterobacteriaceae</i>	0,72%	0,88%	0,27%	0,80%	1,08%	1,31%
<i>Klebsiella spp.</i>	0,48%	0,29%	0,13%	0,23%	0,22%	0,33%
Leveduras	4,18%	2,20%	1,75%	2,40%	1,84%	2,61%
Outros	1,20%	0,60%	0,40%	0,82%	0,11%	0,49%
<i>Prototheca spp.</i>	1,19%	0,44%	0,54%	1,26%	1,08%	0,16%
<i>S. agalactiae</i>	2,27%	2,20%	2,02%	0,91%	0,43%	1,14%
<i>S. aureus</i>	35,92%	29,15%	30,51%	24,20%	13,08%	17,46%
<i>S. uberis</i>	11,22%	21,11%	18,01%	10,16%	13,30%	15,50%
SCN	7,88%	1,03%	1,75%	4,22%	9,95%	12,07%
<i>Streptococcus spp.</i>	2,15%	1,03%	1,08%	1,03%	0,76%	1,31%
<i>Trueperella spp.</i>	1,07%	1,61%	1,75%	0,34%	0,11%	-

*AC = Amostra contaminada; CSM = Cultura sem multiplicação; SCN = *Staphylococci* coagulase-negativo

Atendendo à Tabela 5, podemos observar a prevalência anual (%) dos agentes etiológicos isolados de 2013 a 2018. O número total de agentes etiológicos isolados anualmente representa-se por n.

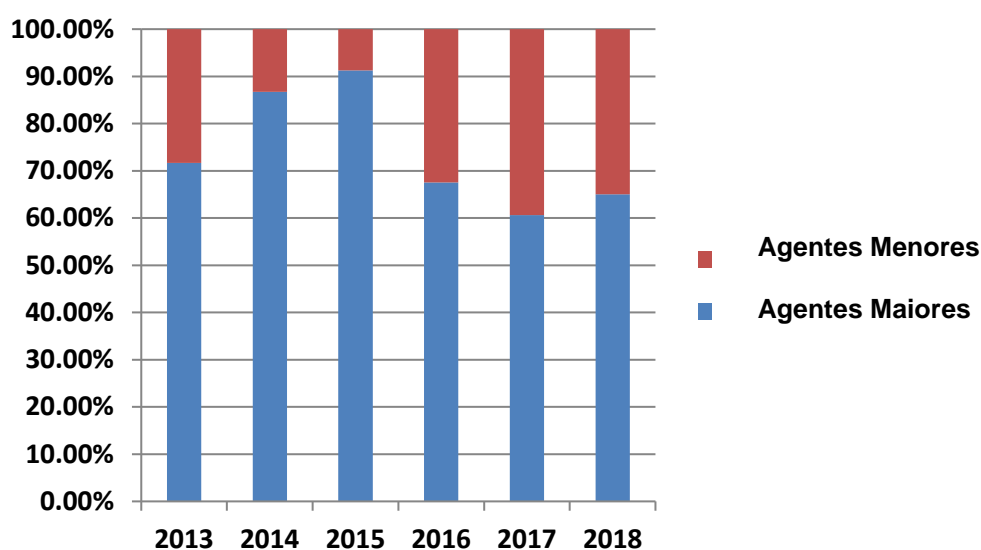
Tabela 5: Prevalência (%) anual dos agentes etiológicos isolados (2013-2018).

AGENTE ETIOLÓGICO	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Total	n = 696	n = 496	n = 513	n = 635	n = 609	n = 415
<i>Klebsiella spp.</i>	0,57	0,40	0,19	0,31	0,33	0,48
Outras <i>Enterobacteriaceae</i>	0,86	1,21	0,39	1,10	1,64	1,93
<i>Trueperella spp.</i>	1,29	2,22	2,53	0,47	0,16	-
Outros	1,44	0,81	0,58	1,42	0,16	0,48
<i>Prototheca spp.</i>	1,44	0,60	0,78	1,73	1,64	0,24
<i>Streptococcus spp.</i>	2,59	1,41	1,56	1,42	1,15	1,93
<i>S. agalactiae</i>	2,73	3,02	2,92	1,26	0,66	1,69
<i>E. coli</i>	3,45	8,47	9,55	4,88	6,73	6,75
<i>E. faecalis</i>	3,45	2,22	3,70	10,71	0,01	3,37
Leveduras	5,03	3,02	2,53	3,31	2,79	3,86
SCN*	9,48	1,41	2,53	5,83	15,11	17,83
<i>Corynebacterium spp.</i>	10,92	7,46	2,34	20,16	19,70	12,53
<i>S. uberis</i>	13,51	29,03	26,12	14,02	20,20	22,89
<i>S. aureus</i>	43,25	38,71	44,25	33,39	19,87	25,78

*SCN = *Staphylococci* coagulase-negativo

O Gráfico 2 representa a comparação da prevalência anual entre os agentes de mastite maiores (*S. aureus*, *S. agalactiae*, *E. coli*, *E. faecalis*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *S. uberis*, *Trueperella* spp. e *Klebsiella* spp.) e os agentes menores (SCN e *Corynebacterium* spp.). A prevalência anual de agentes maiores foi superior à dos agentes menores durante todo o período do estudo (2013-2018). O ano em que se observou a maior disparidade entre as prevalências de agentes maiores e menores foi 2015, com 92,24% e 8,76%, respectivamente. Por outro lado, em 2017 a prevalência de agentes maiores e menores apresentou a menor diferença percentual, 60,60% e 39,40%, respectivamente.

Gráfico 2: Comparação da prevalência anual de agentes maiores e menores (2013-2018).



Como podemos observar na Tabela 6, o número de isolados de *Trueperella* spp. testados para a penicilina, cefazolina e canamicina foi de apenas 3. No caso de Outras *Enterobacteriaceae* foram testados 9, 3 e 4 isolados, respectivamente, para cada um destes antimicrobianos. *Klebsiella* spp. apresentou um número baixo de isolados testados, para todos os antimicrobianos.

Tabela 6: Número de isolados dos agentes etiológicos testados para cada antimicrobiano.

AE*	CEQ	IP	CFX/K	CFL	F	AMC	LN	CLX	CFP	CFZ	K	P	SXT
<i>Trueperella</i> spp.	15	15	12	15	15	11	15	15	15	3	3	3	12
<i>Corynebacterium</i> spp.	57	58	52	58	58	50	56	56	56	37	37	37	21
<i>E. coli</i>	143	145	128	122	142	128	138	115	139	37	10	13	134
<i>Enterobacteriaceae</i>	20	20	14	19	19	18	17	12	17	9	3	4	16
<i>Enterococcus faecalis</i>	118	119	116	99	94	117	89	89	89	38	10	39	84
<i>Klebsiella</i> spp.	9	9	7	8	9	8	9	8	9	4	3	3	6
<i>S. aureus</i>	746	756	704	630	712	689	726	734	733	236	192	245	515
SCN	91	91	84	83	61	88	86	86	85	57	20	57	38
<i>S. agalactiae</i>	39	39	33	35	39	29	38	38	38	13	13	13	26
<i>Streptococcus</i> spp.	29	29	27	29	26	28	24	24	24	13	11	14	15
<i>S. uberis</i>	435	443	404	370	377	413	421	425	426	123	46	123	326
Total	1702	1724	1581	1468	1552	1579	1619	1602	1631	570	348	551	1193

*AE = Agente etiológico; CEQ = cefquinoma; IP = iodohidrato de penetamato; CFX/K = cefalexina e canamicina; CFL = cefalônio; F = fluoroquinolonas; AMC = amoxicilina e ácido clavulânico; LN = lincomicina e neomicina; CLX = cloxacilina; CFP = cefoperazona; CFZ = cefazolina; K = canamicina; P = penicilina; SXT = sulfamida e trimetoprim; SCN = *Staphylococci* coagulase-negativo;

Percentagem total de isolados resistentes aos antimicrobianos testados: penicilina (43,19%); sulfamida+trimetoprim (29,84%); canamicina (22,70%); cloxacilina (18,16%); fluoroquinolonas (16,82%); lincomicina + neomicina (7,72%); cefazolina (5,26%); cefalexina+canamicina (3,67%); cefalônio (3,47%); amoxicilina + ácido clavulânico (2,41%); iodohidrato de penetamato (1,74%); cefoperazona (1,29%); cefquinoma (1,29%).

Na Tabela 7 podemos analisar a percentagem dos agentes etiológicos sensíveis, resistentes e com perfis de sensibilidade intermédios aos antibióticos testados.

Tabela 7: Percentagens de isolados cujo resultado do TSA, para cada antibiótico testado, foi sensível, intermédio e resistente.

AE*	TSA	CEQ	IP	CFX/K	CFL	F	AMC	LN	CLX	CFP	CFZ	K	P	SXT
<i>Corynebacterium</i> spp.	S	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	94,59	95,24
	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,41	4,76
<i>E. coli</i>	S	97,90	71,03	69,53	73,77	100,00	83,59	51,45	6,96	95,68	81,08	30,00	15,38	84,33
	I	-	12,41	11,72	9,02	-	6,25	14,49	-	-	5,41	-	-	0,75
	R	2,10	16,55	18,75	17,21	-	10,16	34,06	93,04	4,32	13,51	70,00	84,62	14,93
<i>E. faecalis</i>	S	94,07	100	88,79	90,91	67,02	94,02	82,02	67,42	93,26	84,21	40,00	82,05	36,90
	I	1,69	-	-	2,02	5,32	3,42	5,62	-	3,37	-	-	-	2,38
	R	4,24	-	11,21	7,07	27,66	2,56	12,36	32,58	3,37	15,79	60,00	17,95	60,71
Outras <i>Enterobacteriaceae</i>	S	95,00	85,00	71,42	68,42	94,74	61,11	64,71	-	94,12	66,67	66,67	-	87,50
	I	-	10,00	14,29	-	-	5,56	5,88	-	-	-	-	-	-
	R	5,00	5,00	14,29	31,58	5,26	33,33	29,41	100,00	5,88	33,33	33,33	100,00	12,50
<i>Klebsiella</i> spp.	S	88,89	77,78	28,57	75,00	88,89	62,50	22,22	12,50	88,89	25,00	33,33	33,33	83,33
	I	-	11,11	57,14	-	-	-	33,33	-	-	-	-	-	-
	R	11,11	11,11	14,29	25,00	11,11	37,50	44,44	87,50	11,11	75,00	66,67	66,67	16,67
<i>S. agalactiae</i>	S	97,44	97,44	96,97	88,57	84,62	100,00	100,00	84,21	94,74	92,31	100,00	92,31	57,69
	I	2,56	2,56	3,03	-	-	-	-	2,63	2,63	-	-	-	3,85
	R	-	-	-	11,43	15,38	-	-	13,16	0,03	7,69	-	7,69	38,46
<i>S. aureus</i>	S	98,66	98,94	97,73	98,41	93,96	98,11	97,80	92,64	97,54	95,34	79,17	34,29	94,37
	I	0,40	0,79	0,43	0,16	1,54	0,58	0,69	0,27	1,50	0,42	6,77	-	0,39
	R	0,94	0,26	1,85	1,43	4,49	1,31	1,52	7,08	0,95	4,24	14,06	65,71	5,24
<i>S. uberis</i>	S	99,08	99,32	97,77	99,46	49,34	98,06	88,12	83,06	99,30	95,93	34,78	78,05	25,77
	I	0,69	0,23	1,24	-	2,92	0,97	2,14	2,35	0,47	3,25	2,17	-	1,84
	R	0,23	0,45	0,99	0,54	47,75	0,97	9,74	14,59	0,23	0,81	63,04	21,95	72,39
SCN	S	97,80	100,00	98,81	100,00	95,08	98,86	94,19	89,53	100,00	98,25	90,00	70,18	89,47
	I	1,10	-	-	-	-	1,14	1,16	-	-	-	-	-	7,89
	R	1,01	-	1,19	-	4,92	-	4,65	10,47	-	-	10,00	29,82	2,63
<i>Streptococcus</i> spp.	S	100,00	96,55	100,00	100,00	57,69	100,00	87,50	75,00	100,00	100,00	54,55	64,29	66,67
	I	-	3,45	-	-	-	-	4,17	4,17	-	-	-	-	-
	R	-	-	-	-	42,31	-	8,33	20,83	-	-	45,45	35,71	33,33
<i>Trueperella</i> spp.	S	80,00	100,00	100,00	100,00	99,33	100,00	100,00	80,00	86,67	100,00	100,00	66,67	83,33
	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	20,00	-	-	-	0,067	-	-	20,00	13,33	-	-	33,33	16,67

*AE = Agente etiológico; CEQ = cefquinoma; IP = iodohidrato de penetamato; CFX/K = cefalexina e canamicina; CFL = cefalónio; F = fluoroquinolonas; AMC = amoxicilina e ácido clavulânico; LN = lincomicina e neomicina; CLX = cloxacilina; CFP = cefoperazona; CFZ = cefazolina; K = canamicina; P = penicilina; SXT = sulfamida e trimetoprim; SCN = *Staphylococci* coagulase-negativo; TSA = Teste de Sensibilidade aos Antibióticos; S = Sensível; I = Intermédio; R = Resistente;

Na Tabela 8, podemos observar os seguintes resultados:

- A prevalência de amostras contaminadas com TCM positivo foi de 8,40%;
- A prevalência de culturas sem multiplicação com TCM positivo foi de 16,94%;
- *S. aureus* constitui 22,66% dos isolados de amostras com TCM positivo, e apenas 1,82% dos isolados de amostras de MC;
- *S. uberis* constitui 11,57% dos isolados de amostras com TCM positivo, e apenas 3,55% dos isolados de amostras de MC;

Tabela 8: Prevalência (%) dos agentes etiológicos isolados a partir de amostras com TCM negativo e positivo, e de MC (n* = 4002).

AGENTE ETIOLÓGICO	RESULTADO DO TCM		MASTITE CLÍNICA
	NEGATIVO	POSITIVO	
AC*	-	8,40	0,72
<i>Corynebacterium</i> spp.	0,05	8,35	0,52
CSM*	0,07	16,94	1,85
<i>E. coli</i>	0,10	3,00	1,72
<i>E. faecalis</i>	-	3,72	0,42
Outras <i>Enterobacteriaceae</i>	-	0,67	0,10
Leveduras	-	2,02	0,42
<i>Prototheca</i> spp.	0,02	0,45	0,22
<i>S. aureus</i>	0,05	22,66	1,82
SCN*	0,05	5,57	0,30
<i>S. agalactiae</i>	-	1,40	0,30
<i>Streptococcus</i> spp.	-	1,10	0,12
<i>S. uberis</i>	-	11,57	3,55
<i>Klebsiella</i> spp.	-	0,15	0,12
<i>Truperella</i> spp.	-	0,47	0,37
Outros	0,02	0,30	0,12
Total	0,36	86,77	12,67

*AC = Amostra Contaminada; CSM = Cultura Sem Multiplicação; SCN = *Staphylococci* coagulase-negativo; n = total de isolados

4. DISCUSSÃO

4.1. Estudo das prevalências

A prevalência de 453 amostras contaminadas (9,68%) pode dever-se ao incumprimento das recomendações para colheita asséptica de amostras de leite por parte do produtor. A recolha da amostra de uma forma apropriada é um passo essencial para a obtenção de resultados de culturas objetivos e fiáveis., de forma a poderem ser interpretados com o propósito de identificar e monitorizar a saúde dos animais presentes numa exploração (Sears and McCarthy 2003). Assim, para se obter resultados fidedignos, a colheita de amostras de leite deverá ser completamente livre de contaminação externa. Barnes-Pallesen (1987) e Erskine et al. (2002) citados por Sears e McCarthy (2003), recomendam seguir os procedimentos enunciados pelo *National Mastitis Council*:

- Promover a assepsia dos tetos antes da recolha da amostra (solução desinfetante de tetos comercial);
- Proceder à remoção total do desinfetante do teto com papel, e limpeza dos tetos com uma solução de álcool a 70%;
- Realizar a secagem dos tetos no momento da recolha;
- Proceder ao descarte de um ou dois jatos de leite antes da recolha do leite de cada quarto mamário;
- Promover a assepsia novamente após a colheita da amostra;
- Promover a utilização de luvas e lavagem das mãos com solução detergente entre vacas.

Considerando as culturas sem multiplicação (CSM), o seu número foi de 863 (18,44%). Um estudo da distribuição de agentes patogénicos na Finlândia apresentou uma percentagem de CSM (28,60%) maior do que o nosso estudo (Koivula et al. 2007). Os resultados falsos-negativos da cultura bacteriana são um problema comum no diagnóstico de mastites, e podem representar 15 a 40% das amostras de MC. As razões pelas quais tal acontece poderão ser: eliminação espontânea da infeção, concentração baixa ou excreção intermitente de agentes patogénicos no leite, localização intracelular e presença de substâncias inibitórias no leite (Constable et al. 2017).

Atendendo aos resultados descritos, *S. aureus* foi o agente mais prevalente (24,79%) no nosso estudo retrospectivo. A prevalência deste agente etiológico é muito variável entre países da Europa e dentro de cada país (Benić et al. 2012). No entanto, num estudo retrospectivo realizado na ilha de São Miguel, a prevalência de *S. aureus* em relação ao total de isolados foi de, aproximadamente, 10%, apesar de ter sido o agente contagioso mais prevalente (Vieira 2014). Fatores como a variação entre explorações e o facto de as

amostras do estudo enunciado referirem-se apenas a 2013, podem contribuir para justificar esta disparidade de resultados, uma vez que as amostras que integraram o nosso estudo foram colhidas ao longo de 6 anos. Pelo que, a variação do seu isolamento ao longo do tempo, pode estar associada a mudanças no manejo e à possibilidade de ocorrer uso constante de antibióticos sem registo e avaliação prévia da sua eficácia. Estes factos podem ter aumentado a resistência desta espécie aos antimicrobianos utilizados levando à sua manutenção nas explorações. A ineficácia dos programas de controlo de mastites também poderá ter contribuído para a sua elevada prevalência.

S. uberis foi o segundo agente mais prevalente (14,51%). Este facto não foi constatado por Vieira (2014), pois a prevalência deste agente correspondeu a 11%, sendo considerado o quinto mais prevalente nas explorações da Ilha de São Miguel deste estudo comparativo. A prevalência de *S. uberis* no nosso estudo poderá dever-se à adoção de programas de manejo inadequados para o controlo de mastite contagiosa, que por sua vez poderá ter seleccionado a infeção deste agente por via contagiosa (Ericsson et al. 2009 citado por Rato et al. 2013).

A prevalência de *Streptococcus* spp. no nosso estudo foi baixa (1,22%). De acordo com Ruegg (2012) os programas direccionados para a saúde do úbere estão a crescer no sentido de prevenir mastites por agentes etiológicos deste género. Talvez seja esta a razão para que o nosso estudo tenha encontrado isolamentos relativamente reduzidos.

S. agalactiae foi considerado um agente etiológico pouco prevalente (1,45%). No caso de outro estudo, a sua prevalência também foi baixa (Rato et al. 2013). No estudo de Vieira (2014), a sua prevalência foi igual a 3,8%. Esta prevalência baixa poderá ser resultado de tratamentos bem sucedidos, já que é um agente normalmente bastante sensível aos antimicrobianos usados na terapêutica e tratamento de secagem. O refugo precoce ao longo dos últimos anos também poderá justificar a baixa prevalência deste agente (Koivula et al. 2007; Cervinkova et al. 2013).

Um dos agentes coliformes principais de MC, *E. coli*, apresentou uma prevalência de 4,59%. Outros estudos referentes à Ilha de São Miguel, demonstraram uma prevalência deste coliforme mais elevada do que o nosso estudo (Vieira 2014; Pacheco 2015). A prevalência baixa no nosso estudo pode estar relacionada com a excreção do agente durante curtos períodos no início da MC (Katholm et al. 2012). Atendendo a Mornet al. (2009) citado por Vieira (2014), a sua prevalência pode estar subestimada por este mesmo facto, dando lugar à ocorrência de resultados falsos negativos.

A prevalência de *Klebsiella* spp. (0,28%) foi quase irrelevante. Comparativamente a outro estudo, a prevalência desta bactéria Gram-negativa foi muito mais baixa (Keefe 2012). O fundamento pode ser o mesmo anteriormente descrito para a prevalência de *E. coli*.

A prevalência de *E. faecalis* foi de 4,19%, que está de acordo com a prevalência de *Enterococcus* spp. apresentada no estudo de Bradley et al. (2007), realizado a partir de amostras de Inglaterra e do País de Gales (1-7%). Por outro lado, a prevalência do grupo Outras *Enterobacteriaceae* (0,83%) foi pouco significativa e similar ao que aconteceu nesse mesmo estudo de Bradley et al. (2007) em vacarias do Reino Unido.

A prevalência de *Trueperella* spp. (0,79%) foi muito reduzida. A ausência de isolamento deste agente é comum em vários estudos, embora seja considerado um agente maior pela sua expressão clínica. Como normalmente causa mastite esporádica ou sazonal (de verão) (Constable et al. 2017) a prevalência reduzida faz algum sentido.

A prevalência de *Corynebacterium* spp. (12,63%) foi equiparável à prevalência obtida por Bradley et al. (2007). Todavia, no estudo retrospectivo realizado em São Miguel, constituiu apenas 2,5% do total de amostras positivas (Vieira 2014). Como o seu reservatório parece ser o canal do teto (Constable et al. 2017), o seu isolamento poderá dever-se à colonização deste local e não pela existência de infecções IMM (Bexiga et al. 2011).

A prevalência de SCN no nosso estudo correspondeu a 8,59%. De acordo com Persson et al. (2011), a prevalência de isolados deste grupo é variável, pois a distribuição de espécies em casos de MC e de MSC é diferente. A nossa prevalência não diferiu muito dos resultados de outros estudos, 11,5% (Vieira 2014) e 11% (Gillespie et al. 2009). A prevalência deste grupo de agentes etiológicos varia entre explorações e entre países (Gillespie et al. 2009).

A prevalência de agentes maiores foi superior à de agentes menores ao longo do período de estudo (2013-2018). No estudo de Bradley et al. (2007), também se verificou uma maior prevalência dos agentes maiores em relação aos agentes menores. Em 2017, verificou-se uma elevação da prevalência de agentes menores. Uma vez que as explorações incluídas no estudo foram diferentes ao longo do tempo, o aumento da prevalência nesse ano poderá ser justificado pela presença de isolados a partir de amostras provenientes de explorações cuja prevalência destes agentes é superior às restantes. A heterogeneidade de espécies SCN também poderá ter contribuído para esta variação, uma vez que este grupo alberga muitas espécies que são agentes menores mas considerados emergentes na indústria leiteira, sendo por isso cada vez mais isolados (Pyörälä and Taponen 2009). Seriam necessários mais estudos para avaliar a variação da prevalência de ambos os grupos de agentes ao longo dos anos.

A prevalência dos agentes contagiosos foi superior à dos agentes ambientais. Este resultado contraria outro estudo retrospectivo realizado na ilha de São Miguel, em que houve uma predominância dos agentes ambientais (83%) sobre os contagiosos (17%) (Vieira 2014). De acordo com os resultados de outro estudo, também se comprovou uma maior

percentagem dos agentes ambientais em relação aos agentes contagiosos (Bradley et al. 2007). No entanto, de acordo com Azevedo et al. (2016), a colheita de amostras a partir do tanque de leite de explorações da ilha de São Miguel revelou prevalências elevadas para ambos os grupos, embora o método de identificação microbiológico utilizado tenha sido a *polimerase chain reaction*, não sendo o mesmo do nosso estudo. A prevalência elevada de agentes contagiosos no nosso estudo, comparativamente aos estudos mencionados, poderá indicar uma ineficácia no controlo de mastites nas explorações que entraram no nosso estudo. A prevalência elevada de *S. aureus* e *S. uberis*, por exemplo, poderá dever-se à negligência de algumas medidas de controlo: refugo de vacas com infeções IMMs crónicas, ordenha por determinada ordem deixando as infetadas para o fim, tratamento das vacas secas, utilização de luvas, desinfeção de tetos e secagem dos tetos com folhas de papel individuais (Smith et al. 1998 citado por Rainard et al. 2017).

Com base no trabalho de Pacheco (2015), a higiene na ordenha classificada como “média” ou “baixa”, a ausência de desinfeção dos tetos antes da ordenha e o facto de não se utilizar luvas ou toalhas de papel antes da colocação das tetinas, têm correlação estatisticamente significativa ($P < 0,05$) com a presença de *S. aureus* no tanque de leite.

A fonte principal de agentes contagiosos é a GM de vacas infetadas, enquanto os agentes de mastite ambientais têm como fonte primária o meio onde a vaca se encontra (Gomes and Henriques 2015). Assim, as proporções de agentes de mastite irão sempre diferir entre países e explorações devido aos diferentes fatores de risco ambientais e de manejo (Vakkamäki et al. 2017).

4.2. Estudo das resistências

4.2.1. As resistências totais

A penicilina e a cloxacilina foram os β -lactâmicos com maiores percentagens totais de resistências. Os resultados de Garcia (2004) e de Rocha et al. (2014) vão no mesmo sentido. Todavia, a testagem de isolados Gram-negativos para estes antimicrobianos superestimou estas percentagens porque as bactérias Gram-negativas apresentam uma resistência natural a estes antimicrobianos, e por essa razão não deveriam ser testadas.

A canamicina está entre os antimicrobianos com maior percentagem total de resistências. Não foram encontrados estudos para comparar este resultado.

A associação entre uma sulfamida e o trimetoprim também esteve entre os antimicrobianos com maior percentagem total de resistências. A utilização generalizada deste composto em protocolos de tratamento de doenças gastrointestinais e de outras doenças do gado bovino (Rocha et al. 2014) podem ter feito com que estes antibióticos estejam entre aqueles com mais resistências.

Por fim, as fluoroquinolonas enquadram-se também como antimicrobianos com maior percentagem total resistências. Todavia, encontra-se mais elevada do que um estudo retrospectivo sobre padrões de resistência de agentes de mastite numa região francesa, realizado por Botrel et al. (2010). Tendo em conta este facto, há a possibilidade destes antimicrobianos serem utilizados de forma generalizada e indiscriminada nas explorações cujos dados fazem parte do nosso estudo.

4.2.2. As resistências por agente

S. aureus revelou uma percentagem elevada de isolados resistentes à penicilina (65,71%). Estudos referentes a outros países demonstraram percentagens igualmente elevadas para este antimicrobiano (Kalmus et al. 2011; Sahebkhthiari et al. 2011 citado por Oliver and Murinda 2012). Com base num estudo retrospectivo realizado em Portugal (2004-2012), a percentagem de resistências para a penicilina foi menor do que o nosso estudo (44,7%) (Rocha et al. 2014). Embora o valor tenha sido mais baixo, o período do estudo referenciado perdurou durante mais dois anos comparativamente a este, as amostras foram referentes a explorações distribuídas por Portugal continental e temporalmente o nosso estudo inclui amostras de um período posterior (2013-2018). Todos estes fatores poderão ser justificativos desta diferença. A elevada percentagem de resistências poderá dever-se à produção de β -lactamases pela bactéria *S. aureus*, diminuindo a atividade da penicilina (Oliver and Murinda 2012). Um estudo realizado no Irão confirmou a presença de genes de resistência à penicilina em estirpes destas bactérias (Jamali et al. 2014).

Corynebacterium spp. revelou baixas resistências, sendo resistente apenas a dois antibióticos testados, penicilina (5,41%) e sulfamida+trimetoprim (4,76%). De acordo com um estudo recente, as espécies do género *Corynebacterium* isoladas a partir do leite de tanque são, geralmente, pouco resistentes aos antibióticos e têm um potencial baixo de transmitir fatores de resistência (Hahne et al. 2018).

Os isolados do grupo *Streptococcus* spp., demonstraram-se resistentes a vários antimicrobianos: canamicina (45,45%), fluoroquinolonas (42,31%), penicilina (35,71%), sulfamida+trimetoprim (33,33%), cloxacilina (20,83%), lincomicina+neomicina (8,33%). Como podemos observar, o aminoglicosídeo canamicina apresentou uma elevada percentagem de isolados resistentes. De acordo com o estudo de Rato et al. (2013), as percentagens de resistências para o aminoglicosídeo gentamicina também foram elevadas para algumas espécies de *Streptococcus*. A avaliação das resistências para algumas espécies deste género é difícil pois não há valores limite para as concentrações mínimas inibitórias (Hahne et al. 2018).

Em relação a *S. agalactiae*, as suas resistências para os antibióticos testados foram as seguintes: sulfamida+trimetoprim (38,46%), fluoroquinolonas (15,38%), cloxacilina (13,16%), cefalônio (11,43%), cefazolina e penicilina (7,69%) e cefoperazona (0,03%). Segundo Rocha et al. (2014) o resultado da percentagem para a cloxacilina foi de 11,4%, ligeiramente menor do que o nosso estudo. A presença de isolados resistentes à cefazolina, ao contrário do estudo de Rato et al. (2013), poderá estar associada ao uso deste antimicrobiano como primeira opção de tratamento, em vez da penicilina, por exemplo, que neste caso seria mais indicado, visto que a percentagem de isolados resistentes é igual.

No caso de *S. uberis*, a combinação entre uma sulfamida e o trimetoprim revelou uma percentagem de 72,39% de isolados resistentes, mais elevada do que o estudo de Rocha et al. (2014). Por outro lado, de acordo com um estudo da Nova Zelândia, a percentagem de resistências a esta associação de antimicrobianos correspondeu a 13% (McDougall et al. 2014). A percentagem de isolados resistentes à cloxacilina foi igual a 14,59%, que é um valor inferior ao resultado de Rocha et al. (2014), 22,1%. As resistências à canamicina (63,04%) e fluoroquinolonas (47,75%), atingiram percentagens relativamente elevadas. De acordo com o estudo retrospectivo e evolutivo de Boireau et al. (2018), referente ao período entre 2006 e 2016 em França, a percentagem para a enrofloxacin atingiu valores ligeiramente mais baixos. No caso da penicilina (21,95%) a percentagem foi mais elevada comparada ao estudo de Rocha et al. (2014). Por fim, *S. uberis* também se revelou algo resistente à formulação de lincomicina+neomicina (9,74%) e as resistências aos restantes antibióticos foram irrelevantes.

A testagem dos agentes etiológicos Gram-negativos à penicilina e cloxacilina deveria ser evitada, uma vez que o espectro de atividade destes antimicrobianos são Gram-positivos. A percentagem de isolados de *E. coli* resistentes à canamicina foi igual a 70%. A percentagem de resistências à combinação sulfamida + trimetoprim foi 14,93%. Comparando este resultado com um estudo de resistências realizado na Estónia, a percentagem de resistências para esta bactéria foi 15,7% (Kalmus et al. 2011). As resistências às sulfonamidas têm-se verificado nesta espécie desde 1964, uma vez que estes compostos são dos mais utilizados nos sistemas de produção animal nos últimos 70 anos (Tadesse et al. 2012). É importante realçar que não se verificaram resistências para as fluoroquinolonas, apesar destes antibióticos fazerem parte do tratamento de infeções por este agente.

As percentagens de resistências para *E. faecalis* foram as seguintes: sulfamida + trimetoprim (60,71%), canamicina (60%), cloxacilina (32,58%), quinolonas/fluoroquinolonas (27,66%), penicilina (17,95%). Para além destas, a bactéria apresentou resistências a mais 7 antibióticos, variando entre os 2,56% e os 15,79%. Este agente beneficia de resistência natural a muitos antibióticos utilizados (por mutação ou incorporação de material genético

exógeno) e a sua capacidade de formar biofilmes confere-lhe maior tolerância aos mesmos compostos (Kristich et al. 2004; Elhadidy and Zahran 2013). No nosso estudo este agente foi mais resistente à sulfamida + trimetoprim, no entanto, no estudo de Rocha et al. (2014), a percentagem de isolados resistentes a estes antimicrobianos foi mais baixa do que aquela por nós obtida.

Os isolados identificados como Outras *Enterobacteriaceae* foram totalmente resistentes à cloxacilina e penicilina, o que era expectável. Como já foi referido não faz sentido continuar a testar Gram-negativos para a penicilina e cloxacilina, pois estes agentes são naturalmente resistentes. Um estudo recente realizado na Áustria apresentou resistências inferiores a 10% para os seguintes antimicrobianos: sulfametoxazol + trimetoprim, norfloxacin, cefoperazona e gentamicina (Schabauer et al. 2018). Comparando os resultados, para a combinação sulfamida + trimetoprim a percentagem foi mais elevada no nosso estudo, 12,50%. As percentagens de resistências para a penicilina, cefazolina e canamicina encontram-se superestimadas, no nosso estudo, pois o número de isolados testados foi baixo.

O grupo SCN, apresentou maiores percentagens de resistências aos seguintes antibióticos: penicilina (29,82%), cloxacilina (10,47%) e canamicina (10%). Com base num estudo de caracterização genética das resistências, realizado na Suíça, o resultado foi mais baixo para a penicilina (23,3%) e a percentagem para a canamicina foi inferior (2,4%), também mais baixa do que a percentagem obtida no nosso estudo. O método de deteção dos isolados foi diferente neste estudo, logo, pode ser pouco equiparável aos resultados obtidos por nós. No entanto, este estudo conclui que SCN têm a potencialidade de adquirir genes de resistência levando a falhas terapêuticas (Frey et al. 2013). A produção de β -lactamases em SCN é comum (Persson et al. 2011).

Considerando as resistências para *Trueperella* spp., as percentagens para a penicilina, cefazolina e canamicina encontram-se superestimadas pois o número de isolados testados foi muito baixo. O mesmo acontece para a *Klebsiella* spp., em que o seu número de isolados testados para todos os antimicrobianos, também foi muito reduzido.

4.3. Prevalência dos isolados de amostras com TCM positivo e de MC

A percentagem de amostras contaminadas positivas ao TCM correspondeu a 8,39%. Outros estudos revelaram percentagens mais baixas (Bradley et al. 2007; Koivula et al. 2007). A variação entre estudos, nos procedimentos de colheita, acondicionamento de amostras e interpretação de resultados, são suficientes para justificar a variação das percentagens.

A percentagem de amostras que resultaram em culturas sem multiplicação e que foram positivas ao TCM foi de 16,94%. Este resultado pode ser devido à presença de falsos

negativos e encontra-se compreendido no intervalo obtido por Bradley et al. (2007). A ausência de multiplicação microbiológica poderá resultar da baixa concentração de agentes na amostra de leite e as razões pelas quais tal poderá acontecer são: excreção em número reduzido ou de forma intermitente e a eliminação da bactéria do GM pelo sistema imunitário (Dinsmore et al. 1991 e Sears and Smith 1990 citados por Sears and McCarthy 2003), mantendo-se elevadas as células inflamatórias.

A prevalência de agentes isolados a partir de amostras positivas ao TCM foi superior, comparativamente à prevalência de agentes isolados a partir de amostras de MC, ou seja, há uma maior prevalência de MSC. Bautista-Trujillo et al. (2013) apresentou resultados cuja prevalência de MSC também foi superior à MC.

O agente etiológico com maior prevalência de isolados em amostras positivas ao TCM foi *S. aureus*. Segundo Melchior et al. (2011), esta é uma das maiores causas de MSC em bovinos leiteiros, e as suas formas crónica e subclínica são as mais frequentes (Benić et al. 2012).

S. uberis foi o agente com maior percentagem de isolamento em amostras de MC (3,55%). Apesar deste facto, a sua percentagem de isolamento a partir de amostras com TCM positivo foi superior, ou seja, a sua prevalência em MSC foi maior do que em MC. Contudo vários autores declararam que este agente é responsável tanto por MC, como por MSC.

5. CONCLUSÃO

Este estudo retrospectivo, permite-nos caracterizar de uma forma geral as explorações da Ilha de São Miguel ao longo dos últimos anos, com base na prevalência dos agentes de mastite mais comuns da região. O agente mais prevalente foi *S. aureus*, e o menos prevalente foi *Klebsiella* spp.. Considerando os agentes maiores e menores, inferimos que houve uma prevalência superior dos maiores face aos menores. A prevalência relativamente elevada de agentes considerados como contagiosos implica que sejam revistas ou implementadas medidas de higiene e práticas na ordenha.

De forma a melhorar o estudo das prevalências é imprescindível garantir o seguimento das recomendações para a colheita de amostras de leite, para evitar ao máximo a contaminação, e assim ser possível isolar e contabilizar os verdadeiros agentes causadores das mastites. A repetição de culturas microbiológicas poderá levar à redução dos falsos negativos.

O estudo e avaliação das resistências totais e por agente, mostra-nos que é necessário criar programas de controlo de resistências, uma vez que todos os agentes isolados e submetidos a TSA demonstraram-se resistentes a vários antibióticos e com percentagens consideráveis. Para além deste facto, é importante continuar a sensibilizar os produtores para a realização de culturas microbiológicas e de TSAs de forma rotineira, a fim de escolher um antimicrobiano eficaz e de conter a pressão sobre a propagação das resistências.

Em relação aos antimicrobianos testados, podemos inferir pela leitura e análise de vários estudos referenciados ao longo da discussão, que o grupo das cefalosporinas apresenta baixos valores percentuais ou nem sequer surgem nos resultados das resistências. Pelo contrário, no presente estudo, as cefalosporinas revelaram valores de resistências em quase todos os agentes isolados. Isto poderá indicar que as cefalosporinas poderão estar a ser utilizadas na prática clínica sem uma correcta supervisão e aplicação de regras de utilização, despoletando possíveis mecanismos de resistência a estes compostos.

Conclui-se que não faz sentido continuar a testar isolados Gram-negativos para a penicilina e cloxacilina, pois o seu espectro de ação são bactérias Gram-positivo. As percentagens de resistências totais para estes antimicrobianos estão superestimadas pois estes isolados, naturalmente resistentes, foram incluídos nos cálculos. A canamicina foi o aminoglicósido que suscitou mais resistências e a sulfamida+trimetoprim também figura como um dos antimicrobianos com mais resistências, bem como as fluoroquinolonas.

De um modo geral os agentes de mastites revelaram-se resistentes a pelos menos dois antimicrobianos. Não foi realizada uma análise sobre a presença de resistências cruzadas, o que poderá ser um ponto a desenvolver em estudos futuros. A implementação

de métodos genotípicos na identificação das espécies bacterianas seria importante para uma identificação mais detalhada das estirpes dos agentes etiológicos isolados.

As limitações deste estudo consistem na ausência da análise de variação da prevalência dos agentes etiológicos de uma forma estatística, sendo esta meramente descritiva, acontecendo o mesmo para o estudo das resistências. Atendendo a alguns agentes etiológicos no estudo das resistências, *Klebsiella* spp. e *Trueperella* spp. principalmente, o número de isolados testados para alguns antibióticos são pouco representativos, superestimando as suas percentagens de resistências. O facto de não haver distinção entre os resultados das fluoroquinolonas impede que se faça uma caracterização específica e mais fidedigna das resistências para esta classe de antimicrobianos, pois é difícil comparar com outros estudos, visto que estes, normalmente, seleccionam e avaliam os compostos individualmente.

A perpetuação de estudos do tipo retrospectivo é importante para definir e prever possíveis padrões de doença e de resistências aos antimicrobianos em determinadas explorações, regiões e países. Isto leva ao desenvolvimento de programas de controlo e medidas preventivas, tendo em vista a otimização dos sistemas de produção leiteira e minimizando o impacto negativo a nível da saúde pública e ambiental.

6. Referências Bibliográficas

Adkins PRF, Middleton JR. 2018. Methods for diagnosing mastitis. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract.* 34(3):479–491.

Aitken SL, Corl CM, Sordillo LM. 2011. Immunopathology of mastitis: Insights into disease recognition and resolution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 16(4):291–304.

Arnold M, Bewley J. 2011. *Staphylococcus aureus* mastitis. Cooperative Extension Service. University of Kentucky.

Azevedo C, Pacheco D, Soares L, Romão R, Moitoso M, Maldonado J, Guix R, Simões J. 2016. Prevalence of contagious and environmental mastitis-causing bacteria in bulk tank milk and its relationships with milking practices of dairy cattle herds in São Miguel Island (Azores). *Trop Anim Health Prod.* 48(2):451–459.

Balakrishnan S, Antony P, Mukhopadhyay H, Pillai R, Thanislass J, Padmanaban V, Srinivas M. 2016. Genetic characterization of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* associated with bovine mastitis in India. *Vet World.* 9:705–709.

Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN. 2006. Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci.* 89(6):1877–1895.

Bautista-Trujillo GU, Solorio-Rivera JL, Rentería-Solórzano I, Carranza-Germán SI, Bustos-Martínez JA, Arteaga-Garibay RI, Baizabal-Aguirre VM, Cajero-Juárez M, Bravo-Patiño A, Valdez-Alarcón JJ. 2013. Performance of culture media for the isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *J Med Microbiol.* 62(PART3):369–376.

Benić M, Habrun B, Kompes G. 2012. Clinical and epidemiological aspects of cow mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and its methicillin-resistant strains. *Medical Sciences.* (37):113–121.

Benites NR, Melville PA, Costa EO. 2003. Evaluation of the microbiological status of milk and various structures in mammary glands from naturally infected dairy cows. *Trop Anim Health Prod.* 35(4):301–307.

Berge AC, Vertenten G. 2014. A field study to determine the prevalence, dairy herd management systems, and fresh cow clinical conditions associated with ketosis in western European dairy herds. *J Dairy Sci.* 97(4):2145–2154.

Bexiga JRD. 2011. Bovine mastitis due to coagulase-negative Staphylococci and the role of minor pathogens on mastitis [dissertation]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.

Bexiga R, Cavaco L, Vilela CL. 2003. Isolamento de *Prototheca zopfii* a partir de leite bovino. REVISTA PORTUGUESA DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS. 98:33–37.

Bexiga R, Pereira H, Pereira O, Leitão A, Carneiro C, Ellis KA, Vilela CL. 2011. Observed reduction in recovery of *Corynebacterium* spp. from bovine milk samples by use of a teat cannula. J Dairy Res. 78(1):9–14.

Biggs A. 2009. Mastitis in cattle. 1st ed. The Crowood Press Ltd.

Blagitz MG, Souza FN, Santos BP, Batista CF, Parra AC, Azevedo LFF, Melville PA, Benites NR, Della Libera AMMP. 2013. Function of milk polymorphonuclear neutrophil leukocytes in bovine mammary glands infected with *Corynebacterium bovis*. J Dairy Sci. 96(6):3750–3757.

Blowey R. 1999. A veterinary book for dairy farmers. 3rd ed. Old Pond Publishing.

Boireau C, Cazeau G, Jarrige N, Calavas D, Madec JY, Leblond A, Haenni M, Gay É. 2018. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from mastitis in dairy cattle in France, 2006–2016. J Dairy Sci. 101(10):9451–9462.

Botrel MA, Haenni M, Morignat E, Sulpice P, Madec JY, Calavas D. 2010. Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhône-Alpes, France. Foodborne Pathog Dis. 7(5):479–487.

Bradley AJ. 2002. Bovine mastitis: An evolving disease. Vet J. 164(2):116–128.

Bradley AJ, Breen JE, Payne B, White V, Green MJ. 2015. An investigation of the efficacy of a polyvalent mastitis vaccine using different vaccination regimens under field conditions in the United Kingdom. J Dairy Sci. 98:1-15.

Bradley AJ, Green MJ. 2009. Factors affecting cure when treating bovine clinical mastitis with cephalosporin-based intramammary preparations. J Dairy Sci. 92(5):1941–1953.

Bradley AJ, Leach KA, Breen JE, Green LE, Green MJ. 2007. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. Veterinary Record. 160(8): 253-258.

Breen J. 2014. The responsible use of antimicrobial therapy in the control of bovine mastitis in dairy herds. *Livestock*. 19(2):83–90.

Breen JE, Green MJ, Bradley AJ. 2009. Quarter and cow risk factors associated with the occurrence of clinical mastitis in dairy cows in the United Kingdom. *J Dairy Sci*. 92(6):2551–2561.

Burvenich C, Merris V Van, Mehrzad J, Fraile-Diez A, Ducatheau L. 2003. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res*. 34:521–564.

Cervinkova D, Vlkova H, Borodacova I, Makovcova J, Babak V, Lorencova A, Vrtkova I, Marosevic D, Jaglic Z. 2013. Prevalence of mastitis pathogens in milk from clinically healthy cows. *Vet Med (Praha)*. 58(11):567–575.

Chandrasekaran D, Venkatesan P, Tirumurugaan KG, Nambi AP, Thirunavukkarasu PS, Kumanan K, Vairamuthu S, Ramesh S. 2014. Pattern of antibiotic resistant mastitis in dairy cows. *Vet World*. 7(6):389–394.

Constable P, Hinchcliff KW, Done S, Gruenberg W. 2017. Diseases of the mammary gland. In: *Veterinary Medicine - A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats*. 11th ed. Saunders Ltd. p. 1904-1964

D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. 2006. Sampling the antibiotic resistome. *Science*. 311:374-377.

Dahmen S, Métayer V, Gay E, Madec JY, Haenni M. 2013. Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-carrying plasmids and clones of Enterobacteriaceae causing cattle mastitis in France. *Vet Microbiol*. 162(2–4):793–799.

Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*. 13:16–34.

Dogan B, Klaessig S, Rishniw M, Almeida RA, Oliver SP, Simpson K, Schukken YH. 2006. Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. *Vet Microbiol*. 116(4):270–282.

Dohoo IR. 1993. An evaluation of the validity of individual cow somatic cell counts from cows in early lactation. *Prev Vet Med*. 16(2):103–110.

Duarte CM, Freitas PP, Bexiga R. 2015. Technological advances in bovine mastitis diagnosis: an overview. *J Vet Diagnostic Investig*. 27(6):665–672.

EB R. 2017. Bovine mastitis caused by *Streptococcus uberis*: Virulence factors and biofilm. *J Microb Biochem Technol.* 9(5):237–243.

Elhadidy M, Zahran E. 2013. Biofilm mediates *Enterococcus faecalis* adhesion, invasion and survival into bovine mammary epithelial cells. *Lett Appl Microbiol.* 58(3):248–254.

Erskine R, Bartlet P, Johnson G 2nd, Halbert L. 1996. Intramuscular administration of ceftiofur sodium versus intramammary infusion of penicillin/novobiocin for treatment of *Streptococcus agalactiae* mastitis in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc.* 208(2):258–260.

Erskine R, Eberhart R. 1990. Herd benefit-to-cost ratio and effects of a bovine mastitis control program that includes blitz treatment of *Streptococcus agalactiae*. *J Am Vet Med Assoc.* 196(8):1230–1235.

Erskine R, Eberhart R, Grasso P, Scholz R. 1989. Induction of *Escherichia coli* mastitis in cows fed selenium-deficient or selenium-supplemented diets. *Am J Vet Res.* 50(12):2093–2100.

Feßler AT, Kaspar H, Lindeman CJ, Stegemann MR, Peters T, Mankertz J, Watts JL, Schwarz S. 2012. A proposal of interpretive criteria for cefoperazone applicable to bovine mastitis pathogens. *Vet Microbiol.* 157.

Fox LK, Gay JM. 1993. Contagious mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 9(3):475–487.

Frey Y, Rodriguez JP, Thomann A, Schwendener S, Perreten V. 2013. Genetic characterization of antimicrobial resistance in coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis milk. *J Dairy Sci.* 96(4):2247–2257.

Garcia A. 2004. "Contagious vs. environmental mastitis". Extension Extra. Paper 126. South Dakota State University.

Gillespie BE, Headrick SI, Boonyayatra S, Oliver SP. 2009. Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. *Vet Microbiol.* 134(1–2):65–72.

Godden S, Rapnicki P, Stewart S, Fetrow J, Johnson A, Bey R, Farnsworth R. 2003. Effectiveness of an internal teat seal in the prevention of new intramammary infections during the dry and early-lactation periods in dairy cows when used with a dry cow intramammary antibiotic. *J Dairy Sci.* 86(12):3899–3911.

Goff JP. 2006. Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health. *J Dairy Sci.* 89(4):1292–1301.

Gomes F, Henriques M. 2015. Control of bovine mastitis: Old and recent therapeutic approaches. *Curr Microbiol.* 72(4):377–382.

Green MJ, Green LE, Schukken YH, Bradley AJ, Peeler EJ, Barkema HW, De Haas Y, Collis VJ, Medley GF. 2004. Somatic cell count distributions during lactation predict clinical mastitis. *J Dairy Sci.* 87(5):1256–1264.

Gruet P, Maincent P, Berthelot X, Kaltsatos V. 2001. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: Review and perspectives. *Adv Drug Deliv Rev.* 50(3):245–259.

Guardabassi L, Jensen LB, Kruse H. 2010. Princípios da utilização prudente e racional de antimicrobianos em animais. In: *Guia De Antimicrobianos Em Veterinária.* 1ª. Grupo A. p. 18-30.

Hahne J, Kloster T, Rathmann S, Weber M, Lipski A. 2018. Isolation and characterization of *Corynebacterium* spp. from bulk tank raw cow's milk of different dairy farms in Germany. *PLoS One.* 13(4):1–16.

Heinrichs AJ, Costello SS, Jones CM. 2009. Control of heifer mastitis by nutrition. *Vet Microbiol.* 134(1–2):172–176.

Hillerton JE, Bramley AJ, Watson CA. 2003. The epidemiology of summer mastitis; A survey of clinical cases. *Br Vet J.* 143(6):520–530.

Hogan J, Smith KL. 2012. Managing Environmental Mastitis. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract.* 28(2):217–224.

Hogan J, Smith LK. 2003. Coliform mastitis. *EDP Sciences. Vet Res.* 34:507–519.

Hossain MK, Paul S, Hossain MM, Islam M, Alam M. 2017. Bovine mastitis and its therapeutic strategy doing antibiotic sensitivity test. *Austin J Vet Sci Anim Husband.* 4(1):1–12.

Jamali H, Radmehr B, Ismail S. 2014. Short communication: Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *J Dairy Sci.* 97(4):2226–2230.

Jones GM, Bailey TL. 2006. Understanding the basics of mastitis. *Virginia Cooperative Extension. Virginia State University.*

Jones GM, Bailey TL. 2009. Understanding the basics of mastitis. *J Manag Dev.:*1–2.

Jost BH, Billington SJ. 2005. *Arcanobacterium pyogenes*: Molecular pathogenesis of an animal opportunist. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol.* 88(2):87–102.

Kaartinen L, Löhönen K, Wiese B, Franklin A, Pyörälä S. 1999. Pharmacokinetics of sulphadiazine-trimethoprim in lactating dairy cows. *Acta Vet Scand.* 40:271–278.

Kalmus P, Aasmäe B, Kärssin A, Orro T, Kask K. 2011. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Acta Vet Scand.* 53(1):1–7.

Kalmus P, Simojoki H, Pyörälä S, Taponen S, Holopainen J, Orro T. 2013. Milk haptoglobin, milk amyloid A, and N-acetyl- β -d-glucosaminidase activity in bovines with naturally occurring clinical mastitis diagnosed with a quantitative PCR test. *J Dairy Sci.* 96(6):3662–3670.

Katholm J, Bennedsgaard TW, Koskinen MT, Rattenborg E. 2012. Quality of bulk tank milk samples from Danish dairy herds based on real-time polymerase chain reaction identification of mastitis pathogens. *J Dairy Sci.* 95:5702–5708.

Keefe G. 2012. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract.* 28(2):203–216.

Keswani N, Choudhary S, Kishore N. 2010. Interaction of weakly bound antibiotics neomycin and lincomycin with bovine and human serum albumin: Biophysical approach. *J Biochem.* 148(1):71–84.

Koivula M, Pitkälä A, Pyörälä S, Mäntysaari EA. 2007. Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new database for mastitis pathogens in Finland. *Acta Agric Scand A Anim Sci.* 57(2):89–96.

Kristich CJ, Li YH, Cvitkovitch DG, Dunny GM. 2004. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol.* 186(1):154–163.

Kromker V. 2014. Bovine *Streptococcus uberis* intramammary infections and mastitis. *Clin Microbiol Open Access.* 03(04).

Krömker V, Paduch J, Klocke D, Friedrich J, Zinke C. 2010. Efficacy of extended intramammary therapy to treat moderate and severe clinical mastitis in lactating dairy cows. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 123:147–152.

Langoni H. 2013. Qualidade do leite: Utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. *Pesqui Vet Bras.* 33(5):620–626.

Leblanc S. 2010. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period introduction—metabolic challenges in peripartum dairy cows and their associations with reproduction. *J Reprod Dev Reprod Dev.* 56(56):29–35.

LeBlanc SJ, Lissemore KD, Kelton DF, Duffield TF, Leslie KE. 2006. Major advances in disease prevention in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 89(4):1267–1279.

Malinowski E, Lassa H, Kłossowska A, Markiewicz H, Kaczmarowski M, Smulski S. 2006. Relationship between mastitis agents and somatic cell count in foremilk samples. *Bull Vet Inst Pulawy.* 50(3):349–352.

Marinho NM. 2018. Influência leucocitária na incidência de doenças, parâmetros reprodutivos e produtivos em vacas leiteiras [trabalho]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia - Faculdade de Medicina Veterinária.

Martinez M, McDermott P, Walker R. 2006. Pharmacology of the fluoroquinolones: A perspective for the use in domestic animals. *Vet J.* 172(1):10–28.

McDougall S, Parker KI, Heuer C, Compton CWR. 2009. A review of prevention and control of heifer mastitis via non-antibiotic strategies. *Vet Microbiol.* 134(1–2):177–185.

Melchior MB, van Osch MHJ, Lam TJGM, Vernooij JCM, Gaastra W, Fink-Gremmels J. 2011. Extended biofilm susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: Evidence for association between genetic makeup and biofilm susceptibility. *J Dairy Sci.* 94(12):5926–5937.

Merl K, Abdulmawjood A, Lämmle C, Zschöck M. 2003. Determination of epidemiological relationships of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. *FEMS Microbiol Lett.* 226(1):87–92.

Molina LR, Gentilini MB, Carvalho AU, Facury Filho EJ, Moreira GHFA, Moreira LPV, Gonçalves RL. 2013. *Escherichia coli* J5: Imunização de fêmeas bovinas leiteiras contra mastites causadas por *Escherichia coli*. *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 33(3):291-298.

Möller A, Truyen U, Roesler U. 2007. *Prototheca zopfii* genotype 2-The causative agent of bovine protothecal mastitis? *Vet Microbiol.* 120(3–4):370–374.

Morin D. 2009. Mammary gland health and disorders in large animal internal medicine. 4th ed. Smith B, Mosby Elsevier, editors. EUA.

Morley PS, Apley MD, Besser TE, Burney DP, Fedorka-Cray PJ, Papich MG, Traub-Dargatz JL, Weese JS. 2005. ACVIM Consensus Statement - Antimicrobial Drug Use in

Veterinary Medicine. Journal of Veterinary Internal Medicine. 19:617-629.

Neijenhuis F. 2004. Teat condition in dairy cows [dissertation]. Utrecht: Utrecht University.

Neijenhuis F, Barkema HW, Hogeveen H, Noordhuizen JPTM. 2001. Relationship between teat-end callosity and occurrence of clinical mastitis. J Dairy Sci. 84(12):2664–2672.

Nickerson SC. 2011. Mastitis pathogens. In: Encyclopedia of Dairy Sciences. 2nd ed. Elsevier Ltd. p. 408–414.

Nickerson SC. 2014. Management strategies to reduce heat stress, prevent mastitis and improve milk quality in dairy cows and heifers. UGA Ext.(1426):1–10.

Olde Riekerink RGM, Barkema HW, Scholl DT, Poole DE, Kelton DF. 2010. Management practices associated with the bulk-milk prevalence of *Staphylococcus aureus* in Canadian dairy farms. Prev Vet Med. 97(1):20–28.

Oliveira A, Cunha MDLRS. 2010. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative *Staphylococci*. BMC Res Notes. 3.

Oliver SP, Murinda SE. 2012. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. Vet Clin North Am - Food Anim Pract. 28(2):165–185.

Osumi T, Kishimoto Y, Kano R, Maruyama H, Onozaki M, Makimura K, Ito T, Matsubara K, Hasegawa A. 2008. *Prototheca zopfii* genotypes isolated from cow barns and bovine mastitis in Japan. Vet Microbiol. 131(3–4):419–423.

Overton TR, Waldron MR. 2004. Nutritional management of transition dairy cows: Strategies to optimize metabolic health. J Dairy Sci. 87(SUPPL. 1):E105–E119.

Pacheco D. 2015. Fatores de risco associados à prevalência de *Staphylococcus spp.* e coliformes no leite do tanque de explorações da ilha de São Miguel [trabalho experimental]. Évora: Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia.

Pacheco J. 2018. É possível secar vacas sem antibiótico? Revista Agros. Segalab Grupo AGROS. 35:18–21.

Pereira UP, Oliveira DGS, Mesquita LR, Costa GM, Pereira LJ. 2011. Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: A systematic review. Vet Microbiol. 148(2–4):117–124.

Persson Waller K, Aspán A, Nyman A, Persson Y, Grönlund Andersson U. 2011.

CNS species and antimicrobial resistance in clinical and subclinical bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 152(1–2):112–116.

Persson Y, Nyman AKJ, Grönlund-Andersson U. 2011. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Vet Scand.* 53(1):1–8.

Piepers S, Schukken YH, Passchyn P, De Vliegher S. 2013. The effect of intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in early lactating heifers on milk yield throughout first lactation revisited. *J Dairy Sci.* 96(8):5095–5105.

Pilla R, Malvisi M, Snel GGM, Schwarz D, König S, Czerny CP, Piccinini R. 2013. Differential cell count as an alternative method to diagnose dairy cow mastitis. *J Dairy Sci.* 96(3):1653–1660.

Pillar CM, Goby L, Draghi D, Grover P, Thornsberry C. 2009. Evaluating the in vitro susceptibility of bovine mastitis pathogens to a combination of kanamycin and cefalexin: Recommendation for a disk diffusion test. *J Dairy Sci.* 92(12):6217–6227.

Plumb DC. 2011. Sulfamethoxazole/Thrimetoprim. In: *Plumb's Veterinary drug handbook*. 7th ed. PharmaVet Inc. p. 3320-3331

Prenafeta A, Sitjà M, Holmes MA, Paterson GK. 2014. Short communication: Biofilm production characterization of *mecA* and *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk in Great Britain. *J Dairy Sci.* 97(8):4838–4841.

Prescott JF. 2013. Sulfonamides, diaminopyrimidines, and their combinations. In: *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. p. 279–294.

Pyörälä S, Taponen S. 2009. Coagulase-negative Staphylococci-Emerging mastitis pathogens. *Vet Microbiol.* 134(1–2):3–8.

Radostits MO, Gay CC, Hinchcliff WK, Constable DP. 2007. *A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10th ed. Saunders Elsevier.

Rainard P, Foucras G, Fitzgerald JR, Watts JL, Koop G, Middleton JR. 2017. Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. *Transbound Emerg Dis.* 65(March):149–165.

Rato MG, Bexiga R, Florindo C, Cavaco LM, Vilela CL, Santos-Sanches I. 2013. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of Streptococci from bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 161:286–294.

Reksen O, Gröhn YT, Barlow JW, Schukken YH. 2012. Transmission dynamics of intramammary infections with coagulase-negative Staphylococci. *J Dairy Sci.* 95(9):4899–4910.

Reyher KK, Dohoo IR. 2011. Diagnosing intramammary infections: Evaluation of composite milk samples to detect intramammary infections. *J Dairy Sci.* 94(7):3387–3396.

Reyher KK, Haine D, Dohoo IR, Revie CW. 2012. Examining the effect of intramammary infections with minor mastitis pathogens on the acquisition of new intramammary infections with major mastitis pathogens-A systematic review and meta-analysis. *J Dairy Sci.* 95(11):6483–6502.

Ribeiro AR. 2001. Estudo da mastite bovina causada por microrganismos ambientais: influência do manejo e higiene, sazonalidade e qualidade microbiológica da água [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo.

Rocha B, Mendonca D, Niza-Ribeiro J. 2014. Trends in antibacterial resistance of major bovine mastitis pathogens in Portugal. *Rev Port Ciências Veterinárias.* 109(591–592):79–88.

Rocha BM. 2013. Trends in antibacterial resistance of major bovine mastitis pathogens in Portugal [master's dissertation]. Porto: Instituto de Saúde Pública da Universidade do Porto - Mestrado em Saúde Pública.

Royster E, Wagner S. 2015. Treatment of mastitis in cattle. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract.* 31(1):17–46.

Ruegg PL. 2012. New perspectives in udder health management. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract.* 28(2):149–163.

Salat O, Sérieys F, Poutrel B, Durel L, Goby L. 2008. Systemic treatment of subclinical mastitis in lactating cows with penethamate hydriodide. *J Dairy Sci.* 91(2):632–640.

Saranya K, Pavulraj S, Kalaiselvi L, Amsaveni S, Ramesh S. 2013. Antibacterial susceptibility profiles of coliforms isolated from bovine subclinical and clinical mastitis against fluoroquinolones. *Tamilnadu J Vet Anim Sci.* 9(4):279–284.

Sarker SC, Parvin MS, Rahman AKMA, Islam MT. 2012. Prevalence and risk factors of subclinical mastitis in lactating dairy cows in north and south regions of Bangladesh. *Trop Anim Health Prod.* 45(5):1171–1176.

Schabauer A, Pinior B, Gruber CM, Firth CL, Käsbohrer A, Wagner M, Rychli K, Obritzhauser W. 2018. The relationship between clinical signs and microbiological species, spa type, and antimicrobial resistance in bovine mastitis cases in Austria. *Vet Microbiol.* 227:52–60.

Scherpenzeel CGM, den Uijl IEM, van Schaik G, Riekerink RGMO, Hogeveen H, Lam TJGM. 2016. Effect of different scenarios for selective dry-cow therapy on udder health, antimicrobial usage and economics. *J Dairy Sci.* 99(5):3753–3764.

Schreiner DA, Ruegg PL. 2003. Relationship between udder and leg hygiene scores and subclinical mastitis. *J Dairy Sci.* 86(11):3460–3465.

Schukken Y, Chuff M, Moroni P, Gurjar A, Santisteban C, Welcome F, Zadoks R. 2012. The “other” gram-negative bacteria in mastitis. *Klebsiella, Serratia, and more.* *Vet Clin North Am - Food Anim Pract.* 28(2):239–256.

Schukken YH, Bronzo V, Locatelli C, Pollera C, Rota N, Casula A, Testa F, Scaccabarozzi L, March R, Zalduendo D, et al. 2014. Efficacy of vaccination on *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds. *J Dairy Sci.* 97:1-15.

Schukken YH, González RN, Tikofsky LL, Schulte HF, Santisteban CG, Welcome FL, Bennett GJ, Zurakowski MJ, Zadoks RN. 2009. CNS mastitis: Nothing to worry about? *Vet Microbiol.* 134(1–2):9–14.

Sears PM, McCarthy KK. 2003. Diagnosis of mastitis for therapy decisions. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract.* 19(1):93–108.

Seifi HA, Kia S. 2018. Subclinical hypocalcemia in dairy cows: Pathophysiology, consequences and monitoring. *Iran J Vet Sci Technol.* 9(2):1–15.

Sharma N, Singh NK, Bhadwal MS. 2011. Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview. *Asian-Australasian J Anim Sci.* 24(3):429–438.

Silley P, Goby L, Pillar CM. 2012. Susceptibility of coagulase-negative *Staphylococci* to a kanamycin and cefalexin combination. *J Dairy Sci.* 95(6):3448–3453.

Smith KL, Hogan JS. 1993. Environmental mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 9(3):489–498.

Sol J, Sampimon OC, Barkema HW, Schukken YH. 2000. Factors associated with cure after therapy of clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *J Dairy Sci.* 83:278–

284.

Sol J, Sampimon OC, Snoep JJ, Schukken YH. 1997. Factors associated with bacteriological cure during lactation after therapy for subclinical mastitis caused by staphylococcus aureus. *J Dairy Sci.* 80(11):2803–2808.

Sousa J. 2008. A hiperqueratose do canal do teto nas explorações leiteiras portuguesas [dissertação de mestrado]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.

Sousa VM De. 2017. Avaliação de três protocolos de secagem em bovinos leiteiros [dissertação de mestrado]. Évora: Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia.

Spears JW, Weiss WP. 2008. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *Vet J.* 176(1):70–76.

Spinosa H de S, Gornialk SL, Bernardi MM. 2017. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. 6th ed. Nacional GE, editor. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Sumathi BR, Veeregowda BM, Gomes AR. 2008. Prevalence and antibiogram profile of bacterial Isolates from clinical bovine mastitis. *Vet World.* 1(8):237–238.

Swartz T, Student PD, Science D, Tech V. 2016. *Trueperella pyogenes*: A practical summary for controlling mastitis. Virginia Cooperative Extension. Virginia State University.

Teixeira P, Ribeiro C, Simões J. 2008. Prevenção de mamites em explorações de bovinos leiteiros da teoria à prática. Um ebook para veterinários, produtores e estudantes [Internet]. <http://www.veterinaria.com.pt/media/Mastites.pdf>

Thomson. 2003. USP veterinary pharmaceutical information monographs - antibiotics. *J Vet Pharmacol Ther.* 26(2):1–271.

Tiwari JG, Babra C, Tiwari HK, Williams V, De Wet S, Gibson J, Paxman A, Morgan E, Costantino P, Sunagar R, et al. 2013. Trends in therapeutic and prevention strategies for management of bovine mastitis: An overview. *J Vaccines Vaccin.* 4(2):1–11.

Uriyasathaporna W, Heuer C, Noordhuizen-Stassen EN, Schukken YH. 2000. Hyperketonemia and the impairment of udder defense: a review. *Vet Res.* 31:397–412.

Vanderhaeghen W, Piepers S, Leroy F, Van Coillie E, Haesebrouck F, De Vliegher S. 2015. Identification, typing, ecology and epidemiology of coagulase negative Staphylococci associated with ruminants. *Vet J.* 203(1):44–51.

Vieira AFG. 2014. Retrospective study on mastitis pathogens and their susceptibility to antibiotics in dairy farms of São Miguel (Azores) - Association with herds' holdings and management practices [dissertação de mestrado]. Coimbra: Escola Universitária Vasco da Gama.

Vissio C, Dieser SA, Agnelli HL, Odierno LM, Larriestra AJ. 2014. Accuracy of the composite somatic cell count to detect intra-mammary infection in dairy cows using latent class analysis. *Prev Vet Med.* 113(4):547–555.

Wawron W, Bochniarz M, Piech T. 2010. Yeast mastitis in dairy cows in the middle-eastern part of Poland. *Bull Vet Inst Pulawy.* 54(2):201–204.

Wente N, Krömker V. 2020. *Streptococcus dysgalactiae*—contagious or environmental? *Animals.* 10(11):1–7.

Wilson DJ, Gonzalez RN, Case KL, Garrison LL, Gröhn YT. 1999. Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. *J Dairy Sci.* 82(8):1664–1670.

Ziesch M, Krömker V. 2016. Factors influencing bacteriological cure after antibiotic therapy of clinical mastitis. *Milk Sci Int.* 69.

ANEXOS

Anexo 1: Prevalência dos agentes etiológicos isolados por concelho (2013-2018)

Concelho	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)
Lagoa (São Miguel)	438	100,00
<i>Trueperella</i> spp.	3	0,68
Amostra Contaminada	51	11,64
Outros	2	0,46
<i>Corynebacterium</i> spp.	23	5,25
Cultura sem multiplicação	83	18,95
<i>E. coli</i>	13	2,97
<i>Enterobacteriaceae</i>	3	0,68
<i>Enterococcus faecalis</i>	23	5,25
<i>Klebsiella</i> spp.	1	0,23
Leveduras	12	2,74
<i>Prototheca</i> spp.	9	2,05
<i>Staphylococcus aureus</i>	114	26,03
SCN	29	6,62
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3	0,68
<i>Streptococcus</i> spp.	4	0,91
<i>Streptococcus uberis</i>	65	14,84
Nordeste	318	100,00
<i>Trueperella</i> spp.	4	1,26
Amostra Contaminada	29	9,12
Outros	1	0,31
<i>Corynebacterium</i> spp.	31	9,75
Cultura sem multiplicação	47	14,78
<i>E. coli</i>	13	4,09
<i>Enterobacteriaceae</i>	2	0,63
<i>Enterococcus faecalis</i>	15	4,72
Leveduras	5	1,57
<i>Prototheca</i> spp.	2	0,63
<i>Staphylococcus aureus</i>	98	30,82

SCN	15	4,72
<i>Streptococcus agalactiae</i>	1	0,31
<i>Streptococcus</i> spp.	2	0,63
<i>Streptococcus uberis</i>	53	16,67
Ponta Delgada	1799	100,00
<i>Trueperella</i> spp.	16	0,89
Amostra Contaminada	153	8,50
Outros	9	0,51
<i>Corynebacterium</i> spp.	156	8,67
Cultura sem multiplicação	369	20,51
<i>E. coli</i>	93	5,17
<i>Enterobacteriaceae</i>	20	1,11
<i>Enterococcus faecalis</i>	82	4,56
<i>Klebsiella</i> spp.	4	0,22
Leveduras	50	2,78
<i>Prototheca</i> spp.	10	0,56
<i>Staphylococcus aureus</i>	413	22,96
SCN	115	6,39
<i>Streptococcus agalactiae</i>	12	0,67
<i>Streptococcus</i> spp.	19	1,06
<i>Streptococcus uberis</i>	278	15,45
Povoação	342	100,00
Amostra Contaminada	25	7,31
Outros	3	0,87
<i>Corynebacterium</i> spp.	38	11,11
Cultura sem multiplicação	74	21,64
<i>E. coli</i>	18	5,26
<i>Enterobacteriaceae</i>	3	0,88
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	1,75
<i>Klebsiella</i> spp.	1	0,29
Leveduras	8	2,34
<i>Prototheca</i> spp.	10	2,92
<i>Staphylococcus aureus</i>	90	26,32
SCN	18	5,26
<i>Streptococcus agalactiae</i>	12	3,51

<i>Streptococcus</i> spp.	3	0,88
<i>Streptococcus uberis</i>	33	9,65
Ribeira Grande	1236	100,00
<i>Trueperella</i> spp.	14	1,13
Amostra Contaminada	154	12,46
Outros	10	0,80
<i>Corynebacterium</i> spp.	133	10,76
Cultura sem multiplicação	181	14,64
<i>E. coli</i>	58	4,69
<i>Enterobacteriaceae</i>	5	0,40
<i>Enterococcus faecalis</i>	57	4,61
<i>Klebsiella</i> spp.	5	0,40
Leveduras	32	2,59
<i>Prototheca</i> spp.	7	0,57
<i>Staphylococcus aureus</i>	300	24,27
SCN	67	5,42
<i>Streptococcus agalactiae</i>	19	1,54
<i>Streptococcus</i> spp.	18	1,46
<i>Streptococcus uberis</i>	176	14,24
Vila Franca do Campo	184	100,00
Amostra Contaminada	15	8,15
Outros	5	2,72
<i>Corynebacterium</i> spp.	10	5,43
Cultura sem multiplicação	27	14,67
<i>E. coli</i>	9	4,89
<i>Enterobacteriaceae</i>	6	3,26
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	3,26
Leveduras	2	1,09
<i>Staphylococcus aureus</i>	63	34,24
SCN	10	5,43
<i>Streptococcus agalactiae</i>	4	2,17
<i>Streptococcus</i> spp.	5	2,72
<i>Streptococcus uberis</i>	22	11,96