

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à minha família pelo apoio incondicional em todos os momentos deste mestrado.

Este trabalho só foi possível porque no Segalab contei com a colaboração de uma equipa que se disponibilizou para me ajudar a concretizar este trabalho. Um agradecimento especial à Dr^a Helena Madeira, à Dr^a Adelaide Pereira, à Dr^a Patrícia Ferreira, à Eng^a Alexandra Machado e à Prof^a. Corália, pela ajuda prestadas.

Uma palavra especial ao Prof. João Niza-Ribeiro, o meu tutor, por ter sido a pessoa que acreditou em mim desde o início e que disponibilizou todos os meios necessários para que este trabalho pudesse ser realizado.

À Prof^a. Marília Ferreira, minha co-orientadora, por me ter dado os conselhos certos na altura certa.

Um obrigado à Dr^a Carla Gomes, uma amizade que há muito tenho como certa, pela ajuda fundamental na análise dos dados.

Realizar este mestrado teve para mim ainda, a vantagem de poder conhecer muita gente e o prazer de poder fazer novas amizades.

Índice geral

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. As mastites	3
1.1 Alterações na composição do leite	3
2. Controlo das mastites	4
2.1 Definição de objectivos	5
2.2 Ambiente	6
2.3 Maneio da ordenha	8
2.4 Manutenção e utilização da máquina de ordenha	12
2.5 Registos	12
2.6 Biossegurança para as mastites.....	13
2.7 Monitorização da saúde do úbere	13
2.8 Revisão do programa de controlo de mastites	14
3. Reflexo de descida do leite	14
4. Defesas do úbere	17
4.1 Lactoferrina	17
4.2 Lactoperoxidase.....	18
4.3 Oxidase da xantina	18
4.4 Lisozima	19
4.5 Complemento.....	19
4.6 Imunoglobulinas	20
4.7 Leucócitos.....	21
4.8 Teto	22
4.8.1 Canal do teto	24
4.8.2 Queratina	25
4.8.3 Lípidos na queratina	28
5. Condição dos tetos	29
5.1 Agentes infecciosos causadores de lesões nos tetos	30
5.2 Alterações não infecciosas da condição dos tetos	31
6. Hiperqueratose - calosidade e rugosidade do canal dos tetos.....	37
6.1 Máquina de Ordenha	38
6.2 Maneio	40
6.3 Factores intrínsecos do animal.....	41
7. Hiperqueratose e as mastites	42
8. Hiperqueratose e o bem-estar animal	43
CAPÍTULO III - OBJECTIVOS.....	45
CAPÍTULO IV - MATERIAIS E MÉTODOS	46
1. A amostra	48
2. Inquérito	50

3. Análise estatística	51
CAPÍTULO V - RESULTADOS.....	52
1. Resultados das observações.....	52
1.1 Factores intrínsecos do animal.....	52
1.2 Caracterização da hiperqueratose – Calosidade e rugosidade	55
1.2.1 Calosidade dos tetos	55
1.2.2 Rugosidade dos tetos.....	55
1.2.3 Hiperqueratose	56
1.3 Sanidade do úbere – Mastites e TCM	57
2. Resultados do inquérito	58
2.1 Higiene e condições de estabulação	58
2.2 Caracterização das máquinas de ordenha	59
2.3 Maneio de ordenha	60
3. Análise dos factores de risco	61
3.1 Factores intrínsecos do animal que influenciam a hiperqueratose	61
3.2 Factores do maneio e da máquina de ordenha que influenciam a hiperqueratose	63
3.3 Factores de sanidade do úbere que são influenciados pela hiperqueratose	64
3.4 Análise multivariada das variáveis.....	66
CAPÍTULO VI - DISCUSSÃO	68
1. Factores intrínsecos do animal que influenciam a hiperqueratose	68
2. Factores do maneio e da máquina de ordenha que influenciam a hiperqueratose	70
3. Factores de sanidade do úbere que são influenciados pela hiperqueratose	73
CAPÍTULO VII - CONCLUSÕES	75
BIBLIOGRAFIA.....	76
ANEXO I	88
ANEXO II	90
ANEXO III	92

Índice de tabelas

Tabela 1: Distribuição das explorações visitadas por concelho	49
Tabela 2: Número de animais por exploração e percentagem amostrada por base de dados.....	50
Tabela 3: Percentagem de animais infectados por agente microbiológico.	58
Tabela 4: Intervalo de confiança dos “odds” rácio e dos valores da probabilidade (p) associados ao teste de qui-quadrado de Pearson da análise univariada.....	63
Tabela 5: Intervalos de confiança dos “odds” rácios e os valores da probabilidade (p) do teste de qui-quadrado de Pearson entre os tetos com hiperqueratose 2B e 2C e tetos só com hiperqueratose extrema (2D) e a presença de mastites.....	64
Tabela 6: Intervalos de confiança dos “odds” rácios e os valores da probabilidade (p) do teste de qui-quadrado de Pearson entre os animais com hiperqueratose alta (2B, 2C e 2D) e os resultados das análises microbiológicas.	65
Tabela 7: Intervalos de confiança dos “odds” rácios e as significâncias (p) das variáveis incluídas nos diferentes modelos face aos níveis de hiperqueratose alta (2B, 2C e 2D).	67
Tabela 8: Variáveis binomiais	91
Tabela 9: Agrupamentos de agentes patogénicos.....	93

Índice de gráficos

Gráfico 1: Distribuição do número de lactações do efectivo amostrado.....	52
Gráfico 2: Distribuição dos dias de lactação do efectivo amostrado	53
Gráfico 3: Percentagem das formas das pontas dos tetos.....	54
Gráfico 4: Distribuições do comprimento dos tetos anteriores e posteriores ...	55
Gráfico 5: Frequência de calosidade dos quartos anteriores e posteriores	56
Gráfico 6: Frequência dos resultados do TCM dos quartos	57
Gráfico 7: Tempo médio gasto por animal, por unidade de ordenha, em função do vácuo médio de ordenha, de cada exploração visitada	60

Índice de figuras

Figura 1: Corte longitudinal do teto bovino	23
Figura 2: Sistema de classificação da hiperqueratose dos tetos	46

Lista de Abreviaturas e Símbolos

BHI - "Brain heart infusion"
C_{18:2} - Ácido linoleico
C₁₂ - Ácido laurico
C₁₄ - Ácido mirístico
C₁₆ - Ácido palmítico
C₁₈ - Ácido esteárico
C_{18:1} - Ácido oleico
CCS - Contagens de células somáticas
Cél./ml - Células por mililitro
cm - Centímetro
EGF - "Epidermal growth factor"
IGF-I - "Insulin-like growth factor" I
IGF-II - "Insulin-like growth factor" II
KGF - "Keratinocyte growth factor"
KDa - Kilodaltons
KPa - KiloPascals
m/s - Metros por segundo
ml - Mililitro
μl - Microlitro
nm - Nanómetros
OR - "Odds" ratio
TCM - Teste californiano de mastites
TGF-α - "Transforming growth factor α"
TGF-β₁ - "Transforming growth factor β₁"
TGF-β₂ - "Transforming growth factor β₂"

Capítulo I – Introdução

As mastites constituem um dos principais problemas da produção leiteira, devido principalmente às perdas de produção de leite e ao aumento dos custos de produção (Sandholm *et al*; 1995). A sua etiologia multifactorial, tornam impossível a erradicação, e os resultados obtidos com a terapia não são suficientemente eficazes para minimizar os efeitos desta doença. Assim, o controlo das mastites, exige invariavelmente uma forte aposta na sua prevenção, que passa pela adopção de medidas de manejo que evitem a exposição dos animais aos agentes patogénicos e que maximizem os seus mecanismos de defesa naturais (Hamann, 2002).

O canal do teto é a primeira e a principal defesa das vacas contra as mastites. Esta é uma estrutura altamente especializada, que impede a entrada de microrganismos causadores das mastites no úbere. Alterações ou lesões que ocorram no canal do teto permitem uma maior penetrabilidade de microrganismos patogénicos. Alguns estudos descrevem a existência de uma associação entre infecções do úbere e lesões dos tetos como feridas e gretas (Fox *et al*; 1991), outros referem que a remoção da queratina do canal do teto aumenta a susceptibilidade a novas infecções (Murphy, 1959) e noutros ainda, verificou-se que a inoculação de microrganismos para além do canal do teto, resultava numa alta taxa de infecção comprovando o papel fundamental do canal do teto contra as mastites (Newbould & Neave, 1965).

A hiperqueratose é uma reacção do canal do teto a alguns estímulos que provocam o aumento da sua espessura e rugosidade, principalmente pela acumulação de grandes quantidades de queratina. A acção mecânica exercida durante a ordenha é o principal factor desencadeador desta alteração (Capuco *et al*; 1994), o que implica que algumas características da máquina de ordenha e algumas práticas do manejo de ordenha estejam envolvidas no aparecimento da hiperqueratose. Por isso, esta alteração dos tetos tem sido utilizada como um indicador de problemas no manejo de ordenha e na máquina de ordenha (Shearn & Hillerton, 1996).

A relação entre a hiperqueratose e as mastites, foi demonstrada por alguns estudos (Lewis, 2000; Neijenhuis *et al*; 2001a), no entanto outros

autores não obtiveram os mesmos resultados (Sieber & Farnsworth, 1981; Mein *et al*; 1986; Shearn & Hillerton, 1996). Estas diferenças de resultados, podem dever-se aos diferentes sistemas de avaliação utilizados, como ao próprio desenho desses estudos. Vários aspectos sobre a epidemiologia dos agentes causadores das mastites estão ainda por esclarecer, como a forma como invadem o úbere ou a altura em que mais frequentemente essa invasão pode ocorrer. Alguns estudos observaram associações entre a hiperqueratose e infecções por *Streptococcus agalactiae* (Falkenberg *et al*; 2003), leveduras, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes* (Neijenhuis *et al*; 2001a), mostrando que este tipo de alteração dos tetos pode desempenhar um papel importante, no aparecimento de novas infecções. Por isso é necessário que se realizem mais estudos para verificar a força destas associações e se compreenda melhor a epidemiologia das mastites.

Capítulo II – Revisão Bibliográfica

1. As mastites

A mastite é a inflamação da glândula mamária resultante da sua infecção por microrganismos patogénicos (Radostitis *et al*; 1994). Estas infecções ocorrem quando esses microrganismos conseguem invadir o espaço intramamário pelo canal do teto, resistir aos mecanismos de defesa do úbere e proliferar pelo parênquima glandular. A mastite pode manifestar-se sob variadas formas. Na mastite subclínica a glândula infectada não apresenta qualquer alteração clínica macroscópica e o leite tem uma aparência normal, porém já existem alterações do funcionamento do úbere, como por exemplo, o aumento da contagem de células somáticas. A mastite clínica aparece a partir do momento em que a resposta inflamatória, causada pela infecção intramamária, leva ao aparecimento de sinais clínicos. Entre esses sinais, o principal é o aparecimento de alterações das características físicas do leite, como a textura ou cor. À medida em que a inflamação aumenta outros sinais podem aparecer no úbere como alteração da cor, edema e dor (Radostitis *et al*; 1994).

1.1 Alterações na composição do leite

As mastites são um factor chave na produção de leite com qualidade, uma vez que a inflamação do úbere pode originar alterações na composição do leite devido, quer ao aumento da permeabilidade vascular, quer ao aumento do número de células inflamatórias que passam do sangue para o leite, ou pela destruição das células epiteliais e libertação do seu conteúdo. Na glândula infectada, a síntese dos componentes do extracto seco do leite diminui, em aproximadamente, 5 a 15% (Sandholm *et al*; 1995). O tipo de ácidos gordos presentes no leite sofre grandes alterações, uma vez que a actividade das lipases no leite mastítico está aumentada o que também aumenta a concentração de ácidos gordos livres, aumenta a concentração de ácidos gordos insaturados de cadeia curta e diminui a concentração dos ácidos gordos

de cadeia longa, diminuindo a qualidade nutricional e organoléptica do leite (Sandholm *et al*; 1995). A actividade proteolítica do leite, também está aumentada pela presença de concentrações maiores de plasmina que origina o aparecimento de maiores quantidades de aminoácidos livres e outros compostos nitrogenados, e menores concentrações de caseína. A concentração destas enzimas no leite é directamente proporcional à quantidade de células somáticas. A plasmina é a enzima lítica mais importante, porque não é completamente destruída pela ultrapasteurização (Barbano, 2004). A lipase presente no leite normal, é inactivada pela pasteurização (Barbano, 2004), porém no leite mastítico aparecem lipases que também não são eliminadas pela pasteurização (Ma *et al*; 2000). Estudos realizados sobre o tempo de prateleira do leite pasteurizado concluíram que o número de dias para se verificarem alterações no sabor de leite com 2% de gordura aumentava de 18 para 56 dias, quando as células somáticas do leite cru desciam de 1 000 000 por ml para 25 000 células por ml, em leite com baixas contagens de microrganismos (Santos *et al*; 2003). Porque actualmente, não se dispõe ainda de tecnologia que elimine totalmente estas enzimas, e porque elas iniciam o processo de degradação do leite logo após a saída do úbere, é necessário que o leite produzido tenha sempre as contagens de células somáticas baixas.

2. Controlo das mastites

O real objectivo do controlo de mastites é a produção de leite de qualidade, uma vez que as mastites causam grandes perdas económicas à produção de leite. A depreciação do valor do leite entregue, devido a contagens de células somáticas elevadas é efectuado por quase todas as organizações de recolha de leite, o que reflecte por um lado os limites impostos por lei, mas também a preocupação das indústrias de lacticínios em garantir produtos com mais tempo de prateleira, maiores quantidades de queijo produzidas, menores índices de rancificação, além da cada vez maior atenção dos consumidores sobre a salubridade dos produtos alimentares que adquire (Radostitis *et al*; 1994).

Aproximadamente 70% das perdas da produção leiteira devida a mastites, correspondem a perdas de produção de leite. As perdas são tanto maiores, quanto mais cedo ocorrer a mastite clínica durante a lactação. As mastites subclínicas não apresentam as descidas de produção drásticas das anteriores, mas as perdas acumuladas ao longo de uma lactação, num conjunto mais alargado de animais pode atingir somas significativas (Sandholm *et al*; 1995).

Na sequência do aparecimento de uma mastite, é frequentemente necessário recorrer à antibioterapia, o que leva à rejeição do leite que é produzido pelos animais em tratamento, devido à sua contaminação com resíduos de antibióticos. Para além das perdas de leite, há custos com medicamentos, consultas veterinárias e refugo precoce de animais implicando também a perda de potencial genético (Radostitis *et al*; 1994).

Assim, é imperativo a adopção de estratégias de prevenção de mastites que idealmente devam ser seguidas de igual forma por todas as explorações. No entanto, como podem existir limitações nas explorações, é crucial definir por exploração, objectivos a atingir, verificar o cumprimento desses objectivos, implementar as medidas mais adequadas para atingir as metas definidas e efectuar monitorizações, para avaliar o sucesso das medidas tomadas (Radostitis *et al*; 1994).

É por isso importante que nas explorações leiteiras se formem equipas que incluam o veterinário e o produtor, para que decidam quais são as melhores formas de fazer face aos problemas de saúde animal que põem em causa o bem estar animal, mas também a viabilidade económica da exploração (Radostitis *et al*; 1994).

Seguindo a metodologia do “National Mastitis Council” (National Mastitis Council, n. d.) analisaremos os pontos de maior relevância num programa de controlo e prevenção de mastites.

2.1 Definição de objectivos

A definição de objectivos tendo em vista a saúde do úbere, é um paço importante no controlo de mastites, na medida em que pode motivar e melhorar

a aplicação de medidas necessárias á sua prevenção e controlo. Estes objectivos devem ser claros e facilmente mensuráveis, como por exemplo os resultados de CCS do tanque de leite (Leslie & Dingwell, 2002). O estabelecimento destes objectivos deve ter um significado económico, como é o caso da desvalorização do preço pago por litro de leite relativamente às CCS do tanque de leite, ou as perdas que ocorrem na sequência de um aumento da incidência de mastites. Os valores destes objectivos devem ser realistas e atingíveis face às condições da exploração, caso contrário, perdem todo o sentido. Estes objectivos devem ser periodicamente revistos e discutidos para se manterem actualizados (National Mastitis Council, n. d.).

Deve ser estabelecida uma prioridade na ordem com que as alterações na exploração devem ser efectuadas, directamente relacionada com os objectivos estabelecidos (National Mastitis Council, n. d.).

2.2 Ambiente

O ambiente em que as vacas vivem tem uma influência preponderante no aparecimento de mastites, uma vez que existem uma série de factores que determinam a exposição aos microrganismos causadores destas patologias, como o tipo de estabulação, a sua higiene e a ventilação. Por regra, é a soma deste conjunto de factores que acaba por estar na origem de um problema de mastites, pelo que a melhoria de apenas um aspecto, pode acabar por não resolver os problemas existentes (Radostitis *et al*; 1994).

A estabulação é um factor importante a considerar; a falta de planeamento na construção de uma exploração, pode originar problemas difíceis de corrigir, que complicam o trabalho das pessoas, aumentam o risco de infecção dos animais e diminuem o bem estar animal. Leslie & Dingwell (2002) verificaram que, em estábulos com características de insegurança, os animais eram impedidos de expressar o seu comportamento normal e apresentavam comportamentos anormais e de medo.

A estabulação pode ser livre ou presa, conforme os animais têm liberdade para se deslocarem, comer, beber ou deitarem-se, ou estão confinados a um local onde dispõem de alimentação, abeberamento e camas.

Existem inúmeras variações destes sistemas, mas considera-se que a estabulação presa tem mais desvantagens por se ter verificado uma maior incidência de mastites, mas também de outros problemas como piores índices de fertilidade (Sandholm *et al*; 1995). Outro problema verificado na estabulação presa é o aumento da incidência de tetos traumatizados e lesões no úbere, devidos à restrição de movimentos (Sandholm *et al*; 1995). Os cubículos demasiado curtos também estão associados a este género de problemas e é frequente alguns animais demonstrarem dificuldades na sua utilização ou evitarem utiliza-los por completo. Na realidade, pequenas alterações no posicionamento de barras limitadoras dos cubículos podem resultar em melhorias do comportamento animal, melhorias na utilização do estábulo e diminuição de lesões nos curvilhões (Leslie & Dingwell, 2002; House *et al*; 2003).

O material das camas também desempenha um papel de relevo na saúde do úbere. Estábulos inteiramente em cimento são escorregadios e bastante abrasivos, originando lesões articulares. A pele dos tetos e do úbere sofre mais lesões, favorecendo o desenvolvimento de microrganismos patogénicos (Sandholm *et al*; 1995). A utilização de tapetes ou de outros materiais nas camas é comum, e tem como objectivo evitar lesões e melhorar o conforto das vacas. No entanto, qualquer que seja o material utilizado nas camas, este pode conter grandes quantidades de microrganismos patogénicos, especialmente se estiver contaminado com dejectos, o que obriga a que diariamente se faça a limpeza das camas e remoção dos dejectos (Radostitis *et al*; 1994). A palha e a serradura são materiais muito utilizados, mas estão relacionados com aumentos da incidência de mastites, nomeadamente, estreptococos no caso da palha e *Escherichia coli* na serradura (Radostitis *et al*; 1994). Para além disso, a serradura húmida pode estar contaminada com quantidades de *Klebsiella spp.* semelhantes às quantidades encontradas na serradura contaminada com fezes (Sandholm *et al*; 1995). A areia também pode ser utilizada nas camas com claras vantagens em relação à palha e à serradura, no que diz respeito às mastites, apesar do trabalho de manutenção das camas ter, em qualquer dos casos, sempre que ser efectuado diariamente. Vacas em camas com serradura tiveram contagens de *Klebsiella spp.* nos tetos, seis vezes superior a vacas em camas de areia (Zdanowicz *et al*; 2004).

No entanto a utilização de areia em algumas explorações é impraticável, quer pela dificuldade em obtê-la, quer pelos problemas de armazenamento que levanta.

A densidade de animais num estábulo, para além de influenciar directamente a existência de coxeiras e problemas de locomoção (Leonard, 1997), também aumenta a contaminação pelas fezes e aumenta o risco de ocorrerem traumatismos entre as vacas.

As condições climáticas também interferem muito na incidência de mastites uma vez que nos períodos mais quentes e húmidos do ano ocorrem em maior número (Morse *et al*; 1988). Esta variação sazonal ocorre devido ao aumento do número de bactérias nos parques e pastos, pelo que, é necessário garantir áreas de descanso com o mínimo de contaminação possível (National Mastitis Council, n. d.). É importante fornecer aos animais protecção contra condições climáticas extremas como calor ou frio excessivo, de maneira a evitar os danos causados na sua saúde como o congelamento de tetos, ou as diminuições de produção e da imunidade, causadas pelo stress térmico (Poelarends *et al*; 2000). A ventilação dos estábulos também pode causar alterações da humidade e levar a um aumento de susceptibilidade às mastites (Radostitis *et al*; 1994).

As maternidades devem ser confortáveis, espaçosas e limpas com frequência, uma vez que no periparto a incidência de mastites é maior como consequência de uma maior susceptibilidade das vacas (Radostitis *et al*; 1994).

É igualmente importante assegurar a existência de abeberamento e comida fresca nos recintos onde as vacas se encontram após a ordenha, de maneira a garantir que não se deitem enquanto o canal do teto não está completamente fechado (Anónimo, n. d.).

2.3 Maneio da ordenha

O maneio de ordenha reúne toda uma série de práticas que tem grande influência na saúde do úbere (Galton *et al*; 1982; Moxley *et al*; 1978).

A preparação dos tetos para a ordenha, deve incluir a remoção dos primeiros jactos de leite, a sua limpeza e secagem. O principal objectivo da preparação dos tetos é efectuar a sua limpeza, reduzindo toda a carga

microbiana presente na pele dos tetos, possibilitando que a ordenha seja feita diminuindo o risco de ocorrer uma infecção do úbere (*Radostitis et al*; 1994), ao mesmo tempo que também deve permite a correcta estimulação do reflexo de descida do leite.

A remoção dos primeiros jactos tem por objectivo a detecção de mastites e a estimulação do reflexo de descida do leite (Reneau, 2001). A detecção precoce de mastites permite a rejeição desse leite, garantido a manutenção da qualidade do leite recolhido no tanque de refrigeração, mas acima de tudo, permite avaliar atempadamente a situação sanitária do animal e agir em conformidade, minimizando os prejuízos resultantes dos estragos provocados pelas mastites. Existe muita discussão sobre qual a melhor altura para executar esta tarefa, mas nenhum estudo provou haver vantagens claras em retirar os primeiros jactos antes ou depois da limpeza dos animais (Fuhrmann, 2002). Para prevenir a contaminação da sala de ordenha os primeiros jactos devem ser removidos para um recipiente com fundo escuro que facilite a detecção de alterações no leite.

A contaminação das mãos dos ordenhadores durante a preparação dos animais para a ordenha, deve ser minimizada com a utilização de luvas. As mãos dos ordenhadores podem desempenhar um papel importante no contágio de animais com *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus* (Blowey & Edmonson, 2000).

Existem muitas formas de efectuar a limpeza das vacas para a ordenha, mas para obter a máxima eficácia devem atender-se alguns aspectos. A limpeza deve incidir principalmente sobre os tetos e não sobre o úbere, uma vez que a utilização de demasiada água pode originar a contaminação dos tetos através da água que escorre pelo úbere até aos tetos (Galton *et al*; 1984).

A utilização de água na ordenha também tem sido apontada como responsável por infecções por *Pseudomonas aeruginosa* (*Radostitis et al*; 1994), pelo que a limpeza com água só é recomendada quando estritamente necessária. A desinfecção dos tetos antes da ordenha ou “predipping” é uma prática cada vez mais comum, que tem mostrado conseguir reduzir a quantidade de microrganismos presentes nos tetos antes da ordenha (Galton *et al*; 1984; Galton *et al*; 1986; Cook, 2002; Ruegg, 2003). Vários estudos referem que a utilização deste método de limpeza reduz a incidência de mastites

ambientais mas não a de mastites contagiosas (Radostitis *et al*; 1994). A aplicação do desinfectante deve durar entre 20 a 30 segundos para garantir a sua acção, sendo depois necessário removê-lo para que não haja acumulação de resíduos de desinfectante no leite.

A secagem é, provavelmente, a etapa mais importante na preparação dos tetos para a ordenha (Iziak & Ataya, 2006; Ruegg, 2003). Alguns estudos mostram que a secagem manual reduz a quantidade de bactérias presentes nos tetos antes da ordenha (Galton *et al*; 1984; Galton *et al*; 1986) levando a que explorações onde não se efectue a secagem dos tetos, tenham contagens de microrganismos presentes no tanque de leite significativamente maiores (Iziak & Ataya, 2006; Galton *et al*; 1982) e em média, as contagens de células somáticas sejam mais altas (Moxley *et al*; 1978). Existem muitos tipos de panos e toalhetes disponíveis para se efectuar a secagem, no entanto, deve garantir-se que, não há utilização do mesmo pano ou toalhete em mais do que um animal. A contaminação a que os panos são expostos, só é eficazmente removida por máquinas de lavar com água quente ou com desinfecções durante várias horas (Ruegg, 2003). O Hipoclorito de Sódio é desaconselhado como desinfectante para os panos, por acelerar a sua degradação e obrigar a que se faça a sua substituição à medida que fiquem gastos (Ruegg, 2003).

O posicionamento das tetinas no úbere deve ser feito com a menor entrada possível de ar para evitar variações do vácuo. As tetinas devem ficar correctamente alinhadas, de maneira a que todos os quartos sejam ordenhados de igual forma, caso contrário o desconforto causado pela ordenha pode levar que os animais retirem as tetinas mais frequentemente (Blowey & Edmonson, 2000).

A desinfecção após a ordenha é uma maneira eficaz de reduzir a incidência de mastites, particularmente as mastites contagiosas. Trata-se de uma prática simples e eficaz de conseguir uma redução da quantidade de bactérias presentes na pele do teto após a ordenha, evitando assim novas infecções. Entre 50 a 90% de infecções podem ser prevenidas com a desinfecção dos tetos (Radostitis *et al*; 1994), desde que bem efectuada. A desinfecção apropriada implica a cobertura dos tetos e não a desinfecção da ponta ou só de um lado, o que ocorre frequentemente quando os ordenhadores fazem a desinfecção demasiado rápido. Uma outra vantagem da desinfecção é

a melhoria da condição da pele dos tetos, em consequência da acção de emolientes, desde que presentes na composição do desinfectante (Sandholm *et al*; 1995; Radostitis *et al*; 1994). A eficácia da desinfecção é, no entanto, limitada para os agentes ambientais, porque a sua actividade bactericida só dura em média até 4 horas após a ordenha (Sandholm *et al*; 1995).

É grande a variedade de desinfectantes disponíveis no mercado, mas todos devem reunir as seguintes características para poderem ser utilizados: têm que ter uma actividade bactericida rápida e de largo espectro, não podem ser irritantes para a pele, não podem corroer o material de ordenha, não podem apresentar resíduos no leite que representem um perigo para a saúde pública e têm que ser pouco dispendiosos (Radostitis *et al*; 1994).

A segregação dos animais na ordenha pode ser útil na prevenção de novas infecções. As novilhas e as vacas recém paridas devem ser sempre os primeiros animais a serem ordenhados. Os animais com mastite clínica e com descargas de células somáticas crónicas devem ser ordenhadas por último. A segregação de animais infectados com mastites contagiosas também deve ser uma medida a tomar de forma a evitar ao máximo novas infecções (Anónimo, n. d.).

A desinfecção é uma prática que pode remover uma parte significativa da carga microbiana presente nas tetinas após a ordenha, mas até ao momento não foi demonstrado o seu papel na prevenção de mastites (Radostitis *et al*; 1994). Existem sistemas de desinfecção automática das tetinas durante a ordenha que permitem a desinfecção das tetinas sem as desvantagens da desinfecção manual, mas exigem tempo e condições que muito dificilmente podem ser implementadas durante uma ordenha (Anónimo, n. d.).

O esgotamento, tanto mecânico como manual, é efectuado no final da ordenha para remover o leite que ainda se encontra na cisterna da glândula mamária. Esta prática não deve ser efectuada, pois aumenta a probabilidade de ocorrerem infecções do úbere. O esgotamento mecânico e a remoção das tetinas com o vácuo ligado, aumentam a probabilidade de ocorrência de impactes de leite que estão directamente relacionados com o aparecimento de novas infecções intramamárias (Anónimo, n. d.).

2.4 Manutenção e utilização da máquina de ordenha

Os sistemas de ordenha mecânica automática, comuns em algumas regiões, veiram alterar radicalmente a vida das explorações. No entanto, os princípios pelos quais as máquinas de ordenha funcionam ainda são os mesmos. Apesar da variedade de sistemas de ordenha, a sua avaliação deve ser efectuada de forma regular, preferencialmente enquanto decorre a ordenha e segundo padrões de avaliação cientificamente aceites, como a norma ISO 6690 de 1996. A própria construção e montagem das salas de ordenhas deve obedecer a estas normas de maneira a garantir que o seu funcionamento não comprometerá o bom funcionamento e os resultados da exploração.

A substituição das tetinas ou outros componentes da máquina de ordenha, deve ser efectuada com a periodicidade recomendada pelo fabricante ou quando ocorre alguma avaria.

Deve, também, existir um plano de sanitização e desinfeção para a máquina de ordenha que assegure a sua correcta limpeza após cada ordenha.

2.5 Registos

A presença de registos numa exploração constitui uma peça importante, tanto para o seu funcionamento diário, como para a tomada de decisões de uma forma fundamentada sobre a situação da exploração, face a objectivos definidos. Os programas informáticos de gestão das explorações, são outra forma de efectuar registos, mas mesmo assim, continua a ser complicado obter registos completos e conseguir efectuar as análises que se pretende. Um bom sistema de registo da saúde do úbere deve permitir saber que animais tiveram mastites clínicas, quando ocorreram, em que quartos, o tratamento efectuado, o resultado desse tratamento e os resultados de análises do contraste leiteiro (National Mastitis Council, n. d.). Existe, ainda, a necessidade de integrar toda esta informação com os resultados das análises microbiologias do leite de animais com mastite, para uma melhor tomada de decisões (Leblanc *et al*; 2006).

2.6 Biossegurança para as mastites

Todas as tarefas que envolvam a protecção da saúde do úbere de um rebanho contra a entrada ou disseminação de novas mastites, são tarefas que dizem respeito à biossegurança. Assim, antes da compra de animais, deve fazer-se uma avaliação ao nível das CCS do tanque da exploração de origem e completar essa análise com resultados microbiológicos do leite do tanque ou resultados de análises anteriores, caso existam. Sempre que possível, deve analisar-se bacteriologicamente o leite dos animais que se vai adquirir. Os animais que entrem na exploração devem ser mantidos em quarentena até se dispor de resultados que comprovem que estão saudáveis. O leite das novilhas recém paridas também deve ser analisado microbiologicamente porque estes animais podem estar infectados com mastites contagiosas como as provocadas por *Staphylococcus aureus* (Leslie & Dingwell, 2002). O refugo de animais cronicamente infectados com agentes como o *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma spp.*, *Nocardia spp.*, *Pseudomonas spp.* e *Arcanobacterium pyogenes* deve ser efectuado sempre que possível; no entanto, estas medidas devem ser cuidadosamente estudadas para animais infectados com este género de agentes, mas com mastites subclínicas (Leslie & Dingwell, 2002). Segundo Hoe e Ruegg (2006), estas medidas de biossegurança têm tendência a ser mais facilmente adoptadas em explorações maiores do que em explorações de pequenas dimensões.

2.7 Monitorização da saúde do úbere

A forma mais comum de monitorização da saúde do úbere é a análise das CCS do tanque de leite, mas como o leite de animais com mastite é rejeitado pelos ordenhadores, a informação dada por este indicador é variável e não permite saber qual é a prevalência ou a incidência de mastites subclínicas, como acontece com as contagens de CCS individuais obtidas pelo contraste leiteiro (Leslie & Dingwell, 2002). A utilização dos dados do contraste leiteiro para apreciação da evolução da situação dos animais, deve ser

complementada por análise microbiológica ao leite dos animais com mastites crónicas.

O cálculo de taxas de incidência de mastites deve ser feito regularmente e deve incluir a análise dos vários grupos de animais da exploração, como as novilhas, que, quer pela sua resistência às mastites, quer pela importância que têm para o futuro da exploração, devem ser um indicador importante das mastites numa exploração.

Estas medidas de monitorização permitem uma vigilância sobre as mastites, mas só permitem que se actue depois de já ter ocorrido um aumento do número de infecções, tendo a desvantagem de, frequentemente, não permitirem concluir qual a origem de um problema que se verifique na exploração. Por isso, é importante desenvolver medidas de monitorização que permitam prevenir o risco de infecção dos animais e ao mesmo tempo forneçam informação sobre onde possam estar a ocorrer falhas no controlo de mastites.

2.8 Revisão do programa de controlo de mastites

Ponto por ponto, todo o plano de controlo de mastites deve ser periodicamente revisto quanto à forma como está a ser cumprido e relativamente a oportunidades de melhoria. Para isso, a opinião de todos os intervenientes na exploração é importante (National Mastitis Council, n. d.).

Deve-se tentar obter, por parte de veterinários, técnicos extensionistas e representantes da indústria avaliações objectivas, sobre os resultados e as opções tomadas pela exploração (National Mastitis Council, n. d.).

3. Reflexo de descida do leite

Este reflexo desempenha um papel fulcral no êxito da ordenha, por isso é importante compreender bem os mecanismos envolvidos.

Antes da ordenha se iniciar o leite está armazenado em dois compartimentos distintos do úbere. Menos de 20% do leite encontra-se nas cisternas do teto e da glândula, pronto a ser ordenhado (Bruckmaier & Bloom,

1998), enquanto o restante se encontra nos pequenos ductos galatóforos e nos alvéolos, sendo necessário que ocorra o reflexo de ejeção do leite para ficar disponível. Este reflexo é regulado pela libertação de ocitocina pela glândula pituitária. A estimulação do reflexo de libertação do leite pode ocorrer quando a vaca sente o vitelo a mamar ou, como ocorre nas explorações comerciais, quando as mãos do ordenhador estimulam os receptores neuronais presentes na pele dos tetos, os quais emitem um sinal por via nervosa para o hipotálamo, onde são produzidas moléculas precursoras da ocitocina. A ocitocina é transportada por extensões axonais para terminais situados na parte posterior da glândula pituitária. Estes neurónios secretores, ao serem activados por sinais nervosos, libertam a ocitocina na circulação sanguínea. Os pequenos ductos galatóforos e os alvéolos estão rodeados por células mioepiteliais compostas por músculo liso, que se contraem quando os seus receptores são estimulados pela ocitocina, expulsando o leite presente no lúmen alveolar e nos ductos. A excreção do leite dos alvéolos provoca um aumento da pressão nas cisternas, que se mantém enquanto as concentrações da ocitocina não diminuem. A estimulação dos tetos também pode ser produzida pelas tetinas da máquina de ordenha, mas as concentrações de ocitocina obtidas são mais baixas. Estímulos auditivos e visuais também podem provocar este reflexo mas essa relação não foi completamente demonstrada (Bruckmaier & Bloom, 1998).

A acção da ocitocina no úbere é influenciada pela estimulação simpática exercida por receptores α e β adrenérgicos do músculo liso. Enquanto se processa a ordenha, observa-se uma diminuição do tónus simpático com o relaxamento dos músculos do esfíncter do canal do teto. A estimulação dos receptores α adrenérgicos através da administração de catecolaminas, durante a ordenha, leva à contracção do canal do teto, diminui a circulação sanguínea no úbere e bloqueia os receptores da ocitocina. Mesmo aumentando a concentração de ocitocina não se observa qualquer efeito que contrarie o aumento do tónus simpático (Bruckmaier & Bloom, 1998). Julga-se que este efeito de bloqueio estará relacionado com uma diminuição do efeito da ocitocina durante as mastites por *Escherichia coli*. Já a estimulação dos receptores β adrenérgicos durante a ordenha, aumenta o fluxo de leite aumentando também o relaxamento do esfíncter (Bruckmaier & Bloom, 1998).

Após o parto, algumas novilhas têm distúrbios do reflexo de descida do leite, o que também acontece com alguns animais em estro, ou quando são ordenhados em situações não habituais. Nestas situações verificou-se que não ocorria libertação de ocitocina. Após a administração de ocitocina, ocorreu a descida do leite, mostrando que não havia qualquer tipo de bloqueio dos receptores α adrenérgicos (Bruckmaier & Bloom, 1998). Quando se provoca stress nos animais, ocorre uma inibição ao nível do sistema nervoso central, pelo aumento da concentração de β -endorfinas libertadas pela glândula pituitária, que impedem a libertação de ocitocina (Bruckmaier & Bloom, 1998). A electricidade estática também provoca stress suficiente, para causar distúrbios no processo de descida do leite. As vacas têm uma maior susceptibilidade à electricidade estática, mesmo com voltagens baixas, pois o seu corpo tem uma resistência relativamente mais baixa, sentindo voltagens que podem passar despercebidas aos ordenhadores, até porque muito frequentemente usam botas de borracha que são bons isoladores (Sandholm *et al.*, 1995).

O tempo que medeia entre a preparação do úbere e a colocação das tetinas, designa-se de tempo “lag” e deve variar entre 60 a 90 segundos (Reneau, 2001). O tempo “lag” está directamente ligado ao aproveitamento de efeito do reflexo de descida do leite, e segundo Rasmussen *et al.* (1992), este tempo é o factor mais importante na optimização da eficiência da ordenha. Tempos “lag” demasiado longos limitam a produção leiteira das vacas, não devendo exceder mais de 3 minutos (Rasmunssen *et al.*, 1992; Reneau, 2001). A descida do leite ocorre em média, 20 segundos após o início da preparação, em vacas altas produtoras e 90 segundos em vacas com baixas produções (Weiss & Bruckmaier, 2004). Por esta razão, tempos “lag” demasiado curtos também não são desejáveis pois a ordenha dos tetos vazios causa o colapso da cisterna do úbere provocando uma ordenha mais demorada (Bruckmaier & Bloom, 1998).

O reflexo de descida do leite também provoca o engurgitamento de um conjunto de vasos linfáticos interligados, que permite que durante a ordenha o teto se mantenha rígido permitindo a saída do leite e evitando o colapso da cisterna do teto (Hamann, 2000).

4. Defesas do úbere

Os mecanismos de defesa do úbere contra as bactérias envolvem mecanismos de defesa anatómicos, celulares e factores de protecção solúvel. A primeira defesa do úbere e a principal defesa anatómica é o canal do teto. Assim que as bactérias ultrapassam o canal do teto entram em contacto com células do sistema imunitário, que têm um papel importante na resposta inflamatória que é gerada (Sordillo *et al*; 1997). Estas células que aparecem em quantidades aumentadas no leite mastítico, são macrófagos, linfócitos e principalmente neutrófilos (Sandholm *et al*; 1995). Os elementos de defesa solúveis podem ser divididos em componentes de defesa inatos ou específicos. Os anticorpos, são proteínas produzidas pelos linfócitos B e são responsáveis pela defesa específica. O complemento, a lactoferrina, a lactoperoxidase, a lisozima são proteínas bacteriostáticas e bactericidas, envolvidas na defesa inata ou não específica do úbere.

4.1 Lactoferrina

Esta glicoproteína produzida pelas células fagocitárias e pelas células produtoras do leite, é parte importante do sistema de defesa do úbere, com importantes propriedades antimicrobianas, além de intervir na regulação da produção de anticorpos, influencia a proliferação dos linfócitos, aumenta a produção dos radicais hidroxilo pelos neutrófilos e regula a actividade citotóxica dos leucócitos (Wang & Hurley, 1998). Mas a sua função mais importante é, talvez a capacidade para sequestrar iões de ferro, competindo com algumas bactérias aeróbias por este mineral, que regula o crescimento bacteriano. Para os estafilococos e para os coliformes o ferro é um componente fundamental das enzimas da cadeia respiratória bacteriana e por isso são susceptíveis à presença da lactoferrina (Sandholm *et al*; 1995). Quanto maior a concentração de lactoferrina, maior é o seu efeito, apesar da sua actividade também ser regulada pelo balanço entre os iões bicarbonato e citrato. Quando o citrato é absorvido do úbere para o sangue, o bicarbonato difunde-se para o úbere e potencia a acção da lactoferrina, ao contrário do citrato, que se combina com o

ferro formando citrato de ferro, que é facilmente utilizado pelas bactérias no seu metabolismo (Blowey & Edmonson, 2000).

A lactoferrina tem ainda, um efeito anti-inflamatório pois pode minimizar os efeitos oxidativos resultantes de um processo inflamatório (Zecconi & Smith, 2000).

A altura em que o papel da lactoferrina é mais importante, é durante o período de secagem, em que atinge concentrações mais elevadas no úbere, juntamente com o ião bicarbonato (Zecconi & Smith, 2000).

A lactoferrina tem a capacidade de se ligar entre si mas também pode ligar-se a outras moléculas como à albumina, à caseína, à lisozima, às imunoglobulinas, aumentando o seu poder antimicrobiano (Wang & Hurley, 1998).

4.2 Lactoperoxidase

A lactoperoxidase é uma enzima que requer a presença de tiocianato e de peróxido de hidrogénio para poder oxidar determinadas estruturas da parede celular das bactérias, sendo bactericida para bactérias Gram negativas e bacteriostática para a generalidade das bactérias Gram positivas (Sordillo *et al*; 1997). As concentrações de tiocianato presente no leite variam com o regime alimentar; já o peróxido de hidrogénio é gerado pela glândula mamária e também por bactérias como os estreptococos e os lactobacilos (Sordillo *et al*; 1997). A concentração de tiocianato e de peróxido de hidrogénio condicionam fortemente a acção da lactoperoxidase, razão pela qual, se julga que a sua acção no úbere não é muito importante, uma vez que a baixa pressão de oxigénio no úbere inibe a produção de peróxido de hidrogénio (Sordillo *et al*; 1997)

4.3 Oxidase da xantina

A oxidase da xantina é uma enzima existente no epitélio do canal do teto e no tecido glandular, que na presença de oxigénio e hipoxantina produz peróxido de hidrogénio. Esta flavoproteína utiliza o ácido úrico presente no leite

na produção de superóxido de oxigénio e peróxido de hidrogénio para ser utilizado pelo sistema oxidativo da lactoperoxidase (Collins *et al*; 1988).

4.4 Lisozima

A lisozima é uma proteína bactericida, presente no leite, capaz de criar fissuras na parede celular das bactérias, actuando sobre os peptidoglicanos, e provocando a lise osmótica das bactérias (Sordillo *et al*; 1997). Os fragmentos dos peptidoglicanos da parede celular resultantes da acção da lisozima, também são importantes activadores da resposta infamatória (Zecconi & Smith, 2000). A lisozima existente no leite tem um efeito bactericida inferior ao da lisozima presente no sangue, porém, esta proteína interage com outros componentes do sistema de defesa presentes no leite, como o complemento, as imunoglobulinas e com a lactoferrina (Sandholm *et al*; 1995). Está ainda por esclarecer a total importância e o real alcance destas propriedades bactericidas e imunomoduladoras, na glândula mamária bovina.

4.5 Complemento

O complemento designa um conjunto de proteínas presentes no leite e no plasma que reconhecem e destroem microorganismos, iniciam e aumentam a resposta dos anticorpos e desagregam precipitados complexos de imunoglobulinas (Korhonen *et al*; 2000). As concentrações do complemento variam com as fases da lactação, sendo mais elevadas no colostro, durante a involução do úbere, ou quando ocorrem inflamações, devido ao aumento da permeabilidade vascular. Durante o resto da lactação, num úbere saudável, as suas concentrações são mais baixas, o que limita a sua acção durante grande parte da lactação (Sordillo *et al*; 1997). Como consequência, pode detectar-se a presença de actividade hemolítica e bactericida do complemento no leite mastítico, mas no leite normal só se detecta uma fraca actividade bactericida. A excepção a esta ausência no leite normal, é o elemento do complemento C3 que pode estar envolvido na opsonização de bactérias (Zecconi & Smith, 2000). No leite mastítico o elemento do complemento C5a pode ser um dos

principais mediadores inflamatórios, responsável pelo influxo de células inflamatórias e activação da sua actividade. O C5a também tem uma grande capacidade para activar o sistema do complemento, no entanto, o real significado destas valências do C5a e de outros elementos do complemento é ainda muito incompleto, pelo que a presença do complemento no leite e os seus mecanismos de opsonização ainda são desconhecidos (Zecconi & Smith, 2000).

Sabe-se no entanto, que o complemento parece desenvolver um papel importante em mastites causadas por *Escherichia coli* (Sandholm *et al*; 1995; Sordillo *et al*; 1997).

4.6 Imunoglobulinas

São quatro os tipos de anticorpos que normalmente estão envolvidos na defesa da glândula mamária: IgG1, IgG2, IgA e IgM. Estas imunoglobulinas têm funções diferentes entre si e a sua concentração no leite varia com o estado de sanidade do úbere e a fase da lactação (Zecconi & Smith, 2000). As concentrações de anticorpos no úbere são baixas durante toda a lactação excepto quando ocorrem inflamações mamárias, em que há alterações da permeabilidade vascular que provocam um aumento de imunoglobulinas no leite. Durante o período de secagem os anticorpos vão aumentando progressivamente até ao parto, quando atingem um pico de concentração durante a produção do colostro (Sordillo *et al*; 1997).

A IgG1 é a imunoglobulina mais abundante no leite dos bovinos e tem a capacidade de estimular macrófagos e neutrófilos, mas é a IgG2 que tem maior capacidade opsonizante, particularmente com os neutrófilos (Sandholm *et al*; 1995). A IgG1 e a IgM, também são opsonisantes, ou seja, também têm a capacidade de se ligarem às bactérias directamente ou através do complemento formando complexos que facilitam a fagocitose por parte dos macrófagos e dos neutrófilos. A IgA não tem uma actividade opsonizante, mas neutraliza toxinas e impede a adesão e colonização da glândula mamária ao cobrir a superfície dos patógenos (Sordillo *et al*; 1997).

4.7 Leucócitos

As principais células presentes no leite são os macrófagos, os neutrófilos, os linfócitos e algumas células epiteliais. O leite produzido por um úbere saudável, tem contagens de células somáticas inferiores a 100 000 cél./ml (Hamann, 2002). Quando uma mastite se instala, estes números sobem rapidamente para contagens de vários milhões, devido à migração dos leucócitos para o local da infecção.

Os macrófagos, são as células que normalmente, estão presentes no desencadeamento de uma reacção inflamatória a uma bactéria patogénica. Estas células produzem a interleucina 1 que activa a síntese de prostaglandinas e leucotrienos que são potentes quimioestáticos de neutrófilos. Os macrófagos podem ser activados pela presença de microrganismos patogénicos mas também pela presença de toxinas microbianas, agentes inflamatórios, complexos antígeno anticorpo e linfocinas (Smith, 1996).

Os neutrófilos são as células mais abundantes no leite mastítico e sem elas a vaca seria incapaz de resolver infecções do úbere (Sandholm *et al*; 1995). O complemento, os anticorpos, os factores quimioestáticos, as enzimas e algumas hormonas regulam o funcionamento destas células, que têm como principal função a fagocitose e destruição de bactérias. Os neutrófilos têm dois sistemas de provocar destruição de microrganismos, que são o sistema oxigénio-dependente e o oxigénio-independente. Os neutrófilos podem destruir bactérias pela utilização de um sistema oxigénio dependente, a mieloperoxidase, sistema análogo ao da lactoperoxidase, que utiliza peróxido de hidrogénio e aniões superóxido para reagir com radicais hidroxilo e com o oxigénio, eliminando com eficácia bactérias Gram negativas. Porém, algumas bactérias produtoras da enzima catalase como o *Staphylococcus aureus* conseguem resistir à acção deste sistema transformando o péroxido de hidrogénio em água e oxigénio (Zecconi & Smith, 2000). O sistema oxigénio-independente é composto por proteínas granulares como a catepsina-G que aumenta a permeabilidade bacteriana, ou as defensinas, que são pequenos péptidos que representam 5 a 7% do conteúdo proteico dos neutrófilos e têm um amplo espectro de acção antimicrobiana (Smith, 1996). Os neutrófilos presentes no leite têm as suas capacidades fagocíticas e bactericidas

diminuídas, devido à falta de suprimento energético causada pela ausência de glicose e glicogénio, pela falta de opsinas como elementos do complemento e anticorpos, por causa do revestimento da sua superfície com caseína, pela ingestão de glóbulos de gordura que leva à perda de pseudópodes e pela falta de suprimento de enzimas hidrolíticas (Smith, 1996).

4.8 Teto

Os tetos dos bovinos são estruturas altamente especializadas na função de libertar o leite armazenado nas cisternas do úbere e em impedir a invasão de microrganismos. Os tetos podem ter posição, orientação, tamanho e forma muito variável, mas em média medem 8 cm de tamanho e têm uma parede com 6 mm de espessura (Dyce *et al*; 1990).

Os tetos (Fig. 1) são formados pelo canal do teto (Ductus papillaris mammae) e por uma cisterna que tem ligação directa com a cisterna da glândula. A parede dos tetos é composta por três camadas: a parte externa é composta por pele glabra desprovida de glândulas; a camada intermédia é composta por tecido conjuntivo, músculo liso e uma quantidade considerável de veias que fazem parte do plexo venoso (Dyce *et al*; 1990); a parte mais interna é constituída por um epitélio com uma dupla camada de células cubóides (Giesecke *et al*; 1972). Na parte distal da mucosa situa-se a roseta de Furstenberg, que separa a mucosa da cisterna do teto do canal do teto e é composta por um complexo de veias dispostas em anel (Hamann, 2000). O canal do teto separa a cisterna do teto do exterior e é a continuação do epitélio estratificado esquamoso da pele, mas com uma camada de queratina mais desenvolvida (Paulrud, 2003). A epiderme dos tetos é composta por várias camadas, a camada basal é composta por uma camada de células cubóides, separada da derme por uma membrana basal. São estas as células que se dividem e efectuam mitose. A seguir segue-se a camada espinhosa, constituída por células de forma poliédrica, consequência das extensões citoplasmáticas, causadas pelos vários desmossomas que as unem às células adjacentes. Nessas extensões citoplasmáticas encontram-se tonofibrilas, que são

agregados da proteína citoqueratina, que se ligam aos desmossomas e são o principal produto destas células.

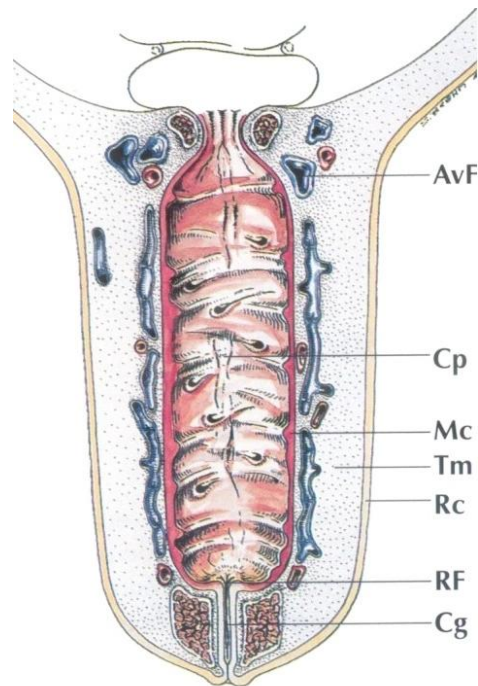


Figura 1: Corte longitudinal do teto bovino (adaptado de Hospes and Seeh, 2000) Avf – Plexo venoso; Cp – Cisterna do teto; Mc – Mucosa da cisterna; Tm – Camada intermédia; Rc – Epiderme; Rf – Roseta de Fustenberg; Cg – Canal do teto.

A camada granulosa é caracterizada pela presença de células com grânulos basófilos que são constituídos de querato-hialina, um precursor da queratina. A querato-hialina e alguns fosfolípidos associados a glicosaminoglicanos são libertados para o espaço inter-celular, onde formam uma camada impermeabilizadora da pele. Nas camadas mais externas da camada granulosa observam-se células mortas pela libertação do conteúdo de vesículas lisossomais, em processo final de queratinização.

A camada mais externa é a camada córnea, e é uma camada onde só existem células cornificadas, mortas, achatadas, desprovidas de núcleo ou organéolos citoplasmáticos com queratina no interior (Burkitt *et al*; 1994; Fawcett, 1995; Junqueira & Carneiro, 1995).

4.8.1 Canal do teto

O canal do teto é a primeira defesa do úbere contra as mastites e uma das mais eficazes. Newbould & Neave (1965), inocularam *Staphylococcus aureus* na cisterna do teto, de que resultou quase sempre a infecção do úbere; também Murphy (1959), comprovou que a remoção de uma quantidade significativa da queratina presente no canal do teto alterava radicalmente a resistência dos tetos a infecções causadas por *Streptococcus agalactiae* demonstrando a importância da queratina na estrutura epitelial diferenciada, que é o canal do teto.

O canal do teto tem em média um comprimento de 10 mm (Giesecke *et al*; 1972), podendo variar entre os 3 e os 18 mm (Paulrud, 2003). Este comprimento parece, diminuir durante os primeiros dias da secagem e no periparto, o que pode constituir ser uma das razões para o aumento de susceptibilidade da glândula mamária nestes períodos (Oldham *et al*; 1991). Durante a primeira semana de secagem, também se verificou uma atrofia da camada granulosa do epitélio do canal do teto, o que denotava uma descida do índice mitótico das células da camada basal e um aumento do lúmen do canal do teto que depois era preenchido por queratina (Comalli *et al*; 1984).

O diâmetro do canal do teto é uma característica que está associada a contagens de células somáticas mais elevadas e a um aumento da perda de leite fora da ordenha (Jorstad *et al*; 1989). Esta associação entre mastites e diâmetro do canal do teto, pode dever-se ao facto de tetos com maiores diâmetros permitirem altas velocidades de fluxo de leite (Klaas *et al*; 2005), característica que segundo vários autores aumenta a susceptibilidade de infecção dos quartos (Klaas *et al*; 2005; Grindal *et al*; 1991; Lacy-Hulbert & Hillerton, 1995).

O epitélio estratificado escamoso existente no canal do teto difere do epitélio da pele pela maior espessura da camada granulosa e da camada córnea. A camada granulosa apresenta uma camada de transição para a camada córnea que normalmente não se observa na pele, denominada de camada lúcida (Paulrud, 2003). Esta camada é composta por células achatadas sem núcleo, que se distinguem pela sua aparência homogénea que lhes é conferida pela dispersão homogénea de grânulos, separa as camadas

compostas por células vivas, das camadas compostas por células mortas que do extracto córneo. Nas camadas mais externas da camada córnea o desgaste e decomposição da filigrina gera aminoácidos e ácidos gordos livres que ajudam a manter a hidratação epidérmica, mas também podem ser utilizados como nutrientes por bactérias colonizadoras do canal do teto (Paulrud, 2003).

Na superfície do canal do teto, a queratina forma pregas em espiral (“junctional folds”), que têm diferentes graus de inclinação, sendo quase horizontais quando chegam à roseta de Furstenberg (Giesecke *et al*; 1972).

Van der Mewe (1985), observou a presença de numerosas células de Langerhans, que desempenham um importante papel no reconhecimento de antígenos do sistema imunitário logo no canal do teto.

Apesar da presença significativa de músculo liso na parede do teto, nas proximidades do canal do teto a quantidade de células musculares é menor, encontrando-se uma concentração maior de fibras elásticas, particularmente na parte mais distal. Estas fibras elásticas são essenciais no fecho do canal do teto, que é feito pela acção passiva destas fibras. A acção do tecido muscular liso também pode contribuir para o fecho do canal e paragem da saída do leite, mas de uma forma diferente. A estimulação dos receptores α do músculo liso estão na origem de contracções, que começam no canal do teto e progridem em direcção ao úbere, que vão empurrando o leite no sentido ascendente, diminuindo a pressão nas cisternas dos tetos (Van der Mewe, 1985). A inibição dos receptores α e estimulação dos receptores β induz o aumento da pressão dentro das cisternas e culmina na libertação do leite.

4.8.2 Queratina

A queratina é uma proteína produzida por células especializadas denominadas queratinócitos, que possuem uma estrutura fibrosa que lhes confere propriedades como a elasticidade, a resistência e a impermeabilidade à água.

Existem dois tipos de queratina, quanto à forma tridimensional, as α hélices (α queratina), produzidas pelos mamíferos, e as folhas pregueadas de β queratina produzidas por aves e répteis. A diferença entre estes dois tipos de queratina, vem da diferente quantidade e variedade de aminoácidos que as

constituem e também da quantidade de ligações bissulfito e de pontes de hidrogénio que existem entre elas (Paulrud, 2003).

A queratina presente na pele das vacas é a α queratina, que corresponde a 85% da constituição de um queratinócito diferenciado e é o principal produto de síntese da epiderme. Esta queratina tem um peso molecular que varia entre os 40 e os 80 kDa e é composta por filamentos intermédios denominados citoqueratinas. A citoqueratina I tem um baixo peso molecular e é ácida, ao passo que a citoqueratina II tem um peso molecular maior, é básica ou neutra e as duas interligam-se entre si, para formar dímeros. Aproximadamente 20.000 heterodímeros de queratina I e II interligam-se para formar filamentos intermediários com 10 nm de diâmetro. O facto de estes fragmentos se ligarem automaticamente *in vitro*, sem a presença de enzimas, leva a concluir que a formação dos ligamentos intermédios é feita pela informação contida nos próprios elementos de construção (Paulrud, 2003).

As citoqueratinas são constituídas por 4 fragmentos helicoidais 1A, 1B, 2A, 2B e três elementos ligantes L-1, L1-2, L-2.

As citoqueratinas I e II contêm nas suas extremidades terminais não α helicais NH₂ e terminais COOH que são muito heterogéneos. Pelo contrário, os segmentos α helicoidais que compõem a queratina têm 50 a 90% de homologia entre queratinas do mesmo tipo e 30% entre queratina de tipo diferente (Paulrud, 2003).

A produção de queratina varia ao longo dos vários extractos da epiderme. Na camada basal os queratinócitos produzem as queratinas K5 e K14. À medida que os queratinócitos se vão diferenciando, deixam de efectuar mitose e progridem para a camada espinhosa onde aumenta a produção das queratinas K1 e K10. Os queratinócitos que se encontram na camada granulosa produzem filagrina e loricrina e cessam a produção das queratinas K1 e K10. A queratina pode sofrer reorganizações com vários processos de fosforilação, proteólise ou de interacção com outras substâncias.

A taxa de produção de queratina pelo canal dos tetos é de 0,6 mg peso seco ou 1,5 mg de peso inteiro em 24 horas, ou seja a camada de queratina é completamente regenerada 1 a 2,5 dias após ter sido retirada (Capuco *et al*; 1990).

A regulação da divisão das células basais da epiderme e a diferenciação dos queratinócitos ainda não é completamente compreendida, mas sabe-se que existem várias substâncias reguladoras destes processos. Os queratinócitos da camada basal têm receptores para o “Insulin-like growth factor” I e II (IGF-I e IGF-II) que quando estimulados promovem a sua proliferação e migração. O “Epidermal growth factor” (EGF) e o “Transforming growth factor α ” TGF- α são outras substâncias reguladoras que parecem ter um efeito semelhante ao do IGF-I e do IGF-II. O “Transforming growth factor β_1 ” (TGF- β_1) e o “Transforming growth factor β_2 ” (TGF- β_2) pelo contrário suprimem a proliferação epitelial. Um potente estimulador da divisão dos queratinócitos é o “Keratinocyte growth factor” (KGF) que é produzido por fibroblastos.

O cálcio tem uma grande influência na regulação da diferenciação e multiplicação dos queratinócitos. Existe um gradiente de cálcio ao longo das camadas da epiderme, uma vez que as suas concentrações aumentam progressivamente da camada basal para a camada córnea. Estudos *in vitro* demonstraram que os queratinócitos na presença de baixas concentrações de cálcio multiplicavam-se e a presença de concentrações maiores promovia a sua diferenciação celular, pelo que, animais com hipocalcémia podem ter distúrbios na formação de queratina, assim como alterações da contractibilidade do músculo liso do canal do teto (Paulrud, 2003).

A vitamina D3 produzida por queratinócitos é inibidora da sua proliferação mas estimula a sua diferenciação nas camadas mais externas. Já a vitamina A e os retinóides são substâncias que inibem a diferenciação dos queratinócitos tendo um efeito anti-queratinizante (Paulrud, 2003).

A basonuclina é uma proteína que tem como função manter os queratinócitos em divisão impedindo a sua diferenciação final, razão pela qual esta proteína se encontra em todos queratinócitos excepto naqueles que já se encontram no final da sua diferenciação (Paulrud, 2003).

Deficiências em zinco estão relacionadas com alterações na síntese de queratina e colagénio, e com insuficientes quantidades de queratina no canal do teto (Paulrud, 2003).

4.8.3 Lípidos na queratina

Aproximadamente 4 a 5% da queratina são lípidos (Bitman *et al.*; 1988; Paulrud, 2003), que são fundamentais na impermeabilização da epiderme e têm uma acção bactericida.

Esses lípidos são formados no estrato espinhoso e granuloso da epiderme, pelo complexo de Golgi e são armazenados em queratinossomas. Estes grânulos migram pelo citoplasma para a membrana, onde acabam por libertar o seu conteúdo para o espaço extracelular. Para além de vários percursores dos lípidos, também são libertadas enzimas hidrolíticas responsáveis pela formação final da barreira lipídica (Paulrud, 2003).

O processo de cornificação inclui a perda de água e a compressão celular em 40% do volume celular (Paulrud, 2003). Capuco *et al.* (1990), observou que, durante o processo de regeneração da queratina, as camadas mais próximas da epiderme chegam a ter o dobro da quantidade de lípidos das camadas mais externas da camada córnea. Acredita-se que a ordenha é um factor que contribui para a remoção desses elementos celulares e que contribui para uma ligeira concentração lipídica da queratina.

A composição lipídica da queratina parece variar com a raça (Wood *et al.*; 1988) e a fase da lactação (Bitman *et al.*; 1988). Em vacas lactantes, 50% dos lípidos presentes na queratina são triglicéridos e 23% colesterol. Estas proporções são consideravelmente diferentes das quantidades de lípidos encontrados na queratina de vacas secas, na qual 31% são triglicéridos e 39% corresponde a colesterol (Bitman *et al.*; 1988). As proporções de ácidos gordos também variam, sendo em vacas em lactação semelhantes às proporções do leite, o que corresponde a concentrações maiores de ácidos gordos de cadeia média ou curta. Nos animais secos observam-se maiores concentrações de ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa (Bitman *et al.*; 1988).

A capacidade antibacteriana dos ácidos gordos é influenciada pela sua concentração e pelas suas características lipofílicas para poderem ser adsorvidos pela parede celular das bactérias (Hogan *et al.*; 1987). Os ácidos gordos da queratina, podem ter actividade bactericida, como os polienos C_{18:2} (ácido linoleico) e o C_{18:3}, ou podem ter actividade bacteriostática como o C₁₂ (ácido laurico), o C₁₄ (ácido mirístico) ou o C₁₆ (ácido palmítico) (Hogan *et al.*;

1987, Hogan *et al*; 1988). No entanto, a proporção de ácido linoleico, é relativamente baixa representando 6,3% dos lípidos na queratina extra celular, sendo a maioria, 72,6%, ácidos gordos como o C₁₆ (ácido palmítico), C₁₈ (ácido esteárico), ou C_{18:1} (ácido oleico), que parecem estimular o crescimento de alguns microrganismos que normalmente colonizam a pele do úbere, como o *Corynebacterium bovis* (Hogan *et al*; 1987).

A susceptibilidade das bactérias às propriedades antibacterianas dos ácidos gordos, varia com o tipo de ácido gordo e a espécie da bactéria. Os coliformes não parecem ser afectados pelos ácidos gordos de cadeia longa, e outros agentes ambientais como *Streptococcus uberis* e *Streptococcus faecalis* são menos susceptíveis que os agentes contagiosos; no entanto, os agentes ambientais têm uma menor capacidade de colonizar o canal do teto em relação aos agentes contagiosos, o que leva a concluir que existem outros mecanismos de defesa com relevância no canal do teto para além dos ácidos gordos (Hogan *et al*; 1988).

A albumina sérica e a hemoglobina inibem a acção antibacteriana dos ácidos gordos, sendo uma razão para que ocorra um aumento do risco de infecção quando ocorrem lesões no canal do teto ou na mucosa interna da cisterna do teto (Adams & Rickard, 1963)

5. Condição dos tetos

As alterações dos tecidos do canal do teto podem aumentar o risco de penetração de microrganismos patogénicos no úbere (Neijenhuis *et al*; 2004). Têm sido utilizados vários instrumentos e técnicas na observação das alterações da condição dos tetos, entre as quais paquímetros para medir variações na espessura dos tetos (Hamann & Mein, 1996), a observação dos tetos com ecógrafos (Neijenhuis *et al*; 2001b), a observação dos tetos com termografia por infra-vermelhos (Paulrud & Rasmussen, 2003), a medição da tensão de oxigénio subcutânea e a oximetria (Mein *et al*; 2001).

As lesões nos tetos podem tomar várias formas e ter origem traumática, ambiental, infecciosa, por contacto com químicos ou ainda ser causadas por máquinas de ordenha que não funcionem convenientemente (Sieber & Farnsworth, 1984).

5.1 Agentes infecciosos causadores de lesões nos tetos

São vários os agentes infecciosos que causam lesões nos tetos, mas as bactérias são as mais prevalentes, não só por poderem causar infecções na pele dos tetos, mas também por poderem infectar lesões traumáticas ou víricas já existentes (Hillerton *et al*; 2001). Bactérias como o *Staphylococcus aureus*, o *Streptococcus dysgalactiae* e o *Arcanobacterium pyogenes* são microorganismos ubiqüitários, colonizando a pele dos tetos, que rapidamente se multiplicam nas lesões existentes, aumentando o risco de mastites e causando lesões purulentas (Hillerton *et al*; 2001). A desinfecção dos tetos é a forma mais adequada de resolver e prevenir muitas destas infecções.

O *Fusobacterium necrophorum* é uma bactéria anaeróbia que causa infecções necróticas no canal do teto, conhecida por “blackspot”. Frequentemente causa a oclusão do canal do teto, permitindo as mastites por outras bactérias (Hillerton *et al*; 2001).

Entre os vírus que podem causar lesões nos tetos, o *Parapoxvirus* é o mais comum, causando pequenas pápulas eritematosas. Formam-se vesículas nas pápulas que acabam por ulcerar, originando crostas muito características em forma de anel ou ferradura (Hillerton *et al*; 2001). Estas lesões também podem aparecer na boca e mucosa nasal dos vitelos de explorações afectadas (Sieber & Farnsworth, 1984). Esta doença também pode causar a tumefacção e o aparecimento de nódulos nas mãos dos ordenhadores (Sieber & Farnsworth, 1984).

O herpes também é uma das doenças que afecta os tetos, causando inicialmente inflamações dolorosas e depois vesículas com forma irregular que podem alastrar até à região perineal. Tanto os Herpesvirus tipo II como tipo IV podem causar estas lesões, provocando uma seroconversão duradoura dos animais infectados. Normalmente as novilhas são as mais afectadas, ainda que possam aparecer lesões nos tetos de vacas em pré-parto (Sieber & Farnsworth, 1984).

Os papilomas são frequentes nos tetos de novilhas chegando a ter 10 mm de altura, podendo causar dificuldades na sua limpeza e ordenha conforme

o local onde se situam. Em casos persistentes, há necessidade de recorrer à remoção cirúrgica. Causados por uma grande variedade de *Pappilomavirus* podem sangrar e até mesmo infectar, mas a sua influência nas mastites não parece ser significativa (Hillerton *et al*; 2001).

O tratamento das doenças víricas dos tetos passa pela aplicação de medidas de higienização, segregação dos animais infectados e pela desinfecção dos tetos após a ordenha para controlo de infecções bacterianas secundárias.

5.2 Alterações não infecciosas da condição dos tetos

A observação de determinadas características dos tetos resultantes da ordenha, tem sido descrita por vários autores, propondo vários sistemas de avaliação da ponta dos tetos e da sua pele (Mein *et al*; 2001, Neijenhuis *et al*; 2000). O “Teat Club International”, propõe uma sistematização das alterações não infecciosas da condição dos tetos, em factores de curta, média e longa duração, com o objectivo de sistematizar métodos de avaliação simples e objectivos das alterações, reduzindo a interferência da avaliação na rotina de ordenha e o esforço de observação (Mein *et al*; 2001).

Nos factores de curta duração estão incluídas alterações da cor dos tetos, aparecimento de marcas das tetinas na base do teto, dureza da ponta dos tetos e abertura da parte distal do canal do teto.

As alterações da cor dos tetos são observáveis 30 a 60 segundos após terem sido retiradas as tetinas. Os tetos aparecem total ou parcialmente avermelhados chegando, em casos extremos, a ficar azuis (Mein *et al*; 2001). Na origem desta alteração podem estar problemas relacionados com sobreordenha, tetinas com diâmetro demasiado largo, colectores demasiado pesados, vácuo demasiado alto, má pulsação, tetos demasiado finos ou curtos e tetinas desajustadas para o tamanho médio dos tetos de uma exploração (Mein *et al*; 2001).

O aparecimento de uma marca visível ou palpável na base dos tetos pode ser causado por vácuo alto na câmara superior das tetinas, sobreordenha com tetinas largas ou cónicas, ou tetinas demasiado estreitas e apertadas. Na

observação desta alteração as vacas com edema do úbere ou paridas à menos de uma semana devem ser excluídas (Mein *et al*; 2001).

No final da ordenha, os tetos têm normalmente uma textura suave, mas alguns tetos aparecem com uma textura mais firme e em casos extremos estão duros com sinais de congestão e com perda de sensibilidade ao toque. O aparecimento de um marcado achatamento da ponta, é outra característica de tetos endurecidos como reacção a tetinas endurecidas, tetinas montadas sob alta tensão e falhas na pulsação. Alterações na textura dos tetos podem resultar de sobreordenha, tetinas largas, vácuo alto na câmara superior das tetinas, vácuo alto de ordenha e falhas na pulsação como as fases de transição, A e C demasiado curtas (Mein *et al*; 2001).

Após a ordenha, o canal do teto pode aparecer fechado ou aberto com 2 mm de diâmetro. Em casos extremos o canal pode estar aberto em forma de funil, com largura suficiente para caber a cabeça de um fósforo, ou seja 3mm de diâmetro. O aparecimento do canal do teto aberto após a ordenha tem sido relacionado com aumento de mastites mas é necessário que se efectuem estudos mais rigorosos sobre o assunto. O vácuo de ordenha, a sobreordenha, a forma das tetinas, a tensão com que as tetinas são montadas e colectores demasiado pesados, podem estar na origem de alterações deste parâmetro (Mein *et al*; 2001).

Grande parte destas alterações de curto prazo tem na sua origem a acção mecânica das tetinas e do vácuo, capaz de causar edema e congestão da ponta dos tetos, mesmo em condições normais (Neijenhuis *et al*; 2001b). O edema e a congestão ocorrem devido a uma dilatação dos vasos sanguíneos e à acumulação de fluidos no compartimento intersticial, que podem causar hipoxia nos tecidos do teto (Hamann *et al*; 1994).

Estudos radiográficos revelaram que os tetos podem aumentar de diâmetro e comprimento entre 33 a 50% no final da ordenha (Mein *et al*; 1973). É devido ao edema e à congestão dos tetos, que a velocidade do fluxo de leite baixa para 60% após 0,5 a 1,5 segundos do início de um ciclo da pulsação, depois de atingir o máximo aos 100 milisegundos. Se a tetina continuar aberta (fase B), a velocidade de fluxo de leite ainda desce mais 10% nos próximos 10 a 15 segundos, no entanto quanto maior e mais longa for a compressão aplicada na oclusão das tetinas, maior vai ser a velocidade de fluxo de leite no

próximo ciclo de pulsação (Williams *et al*; 1981). A força compressiva aplicada pelas tetinas colapsadas obriga à deslocação dos fluidos acumulados nos tecidos à volta do canal do teto, aumentando o respectivo diâmetro o que permite um maior débito de leite (Williams *et al*; 1981). Hamann *et al.* (1993) verificou que as diferenças de espessura da parede do teto ao nível da cisterna, após a ordenha, foram 40 a 50% maiores que as variações de espessura na ponta do teto, indicando que as forças compressivas são mais fortes na ponta do teto. Variações da espessura da ponta do teto superiores a 5% aumentam a vulnerabilidade do canal do teto a microrganismos patogénicos (Zecconi *et al*; 1992; Hamann & Mein, 1996). A força compressiva aplicada pelas tetinas varia entre os 8 a 12 kPa sendo suficiente para provocar a oclusão dos vasos sanguíneos do teto e contrariar os efeitos da congestão (Mein *et al*; 1987). A aplicação de forças compressivas superiores à pressão arterial média não vão provocar uma melhoria na diminuição da congestão, mas podem causar erosões e danos nos tetos (Mein *et al*; 1987).

A influência do vácuo na formação de edema e congestão é considerável; a aplicação 40 e 50 kPa no vácuo de ordenha provocou o aumento na espessura dos tetos comparativamente a vácuos de ordenha de 25 e 30 kPa (Hamann *et al*; 1993).

A congestão pode também ser consequência de uma massagem deficiente do teto, devido ao envelhecimento das tetinas. Este problema também pode permitir o deslize das tetinas durante a ordenha, provocando inclusive, uma diminuição da velocidade de fluxo de leite na ordenha e o aparecimento mais frequente de marcas das tetinas na base dos tetos (Boast *et al*; 2003; Hillerton *et al*; 2003). Este processo de endurecimento das tetinas ocorre particularmente nas regiões em que há mais contacto mecânico e acontece ao longo do tempo, com a deposição de sais de fósforo e de cálcio, e a absorção de gordura e água pela borracha (Boast *et al*; 2003). A acção mecânica da ordenha e as altas temperaturas de lavagem também diminuem a tensão da tetina (Hillerton *et al*; 2003).

As alterações de média duração são a condição da pele dos tetos e o aparecimento de petéquias hemorrágicas. Após o início da agressão, estas alterações podem levar dias a semanas a aparecer ou a desenvolverem-se (Mein *et al*; 2001).

O aparecimento de pequenas petéquias hemorrágicas ou lesões hemorrágicas mais extensas são um sinal de falha na pulsação, associada a sobreordenação ou até mesmo a vácuo de ordenha alto (Mein *et al*; 2001).

A pele dos tetos, quando exposta a agressões ambientais como tempo húmido, ventoso e frio, ou irritações provocadas por produtos químicos utilizados na sua desinfecção, pode tornar-se mais seca e áspera, e em casos mais graves chegar mesmo a gretar ou a congelar (Nickerson, 1998).

A degradação da condição da pele dos tetos implica a diminuição da capacidade de defesa contra infecções, como foi demonstrado por Fox *et al.* (1996) provando a existência de uma correlação entre o aparecimento de gretas na pele e uma diminuição da resistência à colonização por *Staphylococcus aureus*. Esta diminuição da resistência da pele, pode estar ligada a: uma diminuição da sua composição em lípidos com propriedades antibacterianas, à redução da hidratação da epiderme que também pode alterar a microflora presente na pele dos tetos, à presença de gretas que produzem exsudados e locais com boas condições para o desenvolvimento de microrganismos patogénicos (Fox *et al*; 1991). Ainda que alguns estudos revelem resultados que não são completamente concordantes, a presença de gretas tem sido repetidamente apontada como o factor mais importante para a alteração da flora microbiana da pele dos tetos (Rasmussen & Larsen 1998).

Um inquérito efectuado em explorações do Noroeste Americano, concluiu que tetos com gretas eram mais frequentes em explorações onde se utilizavam desinfectantes dos tetos sem condicionador para a pele, e de uma forma generalizada a sua frequência aumentava durante o Inverno (Burmeister *et al*; 1995).

O aparecimento de gretas é muito variável, podendo a proporção de tetos gretados numa exploração, oscilar 20 a 30 % no espaço de 2 a 3 dias (Timms, 2004). Normalmente ocorrem com mais frequência quando, ocorrem temperaturas muito baixas ou quando há diminuições súbitas da temperatura. Muitos tetos acabam por curar espontaneamente, mesmo mantendo-se as mesmas condições climatéricas adversas (Timms, 2004).

O congelamento dos tetos está relacionado com a exposição a temperaturas inferiores a -25° Faraday (Timms, 2004). Normalmente tetos húmidos após a ordenha, por leite ou desinfectante, expostos a rajadas de

vento podem sofrer congelamento completo ou localizado, conforme os locais onde ocorra congelamento ou evaporação dos líquidos presentes no teto (Sieber & Farnsworth, 1984). As vacas mais afectadas acabam por ser refugadas devido à dificuldade na ordenha, por oclusão do canal do teto após a queda de tecido necrótico e formação de crostas que recobrem os tecidos da glândula, com aparecimento frequente de mastites (Sieber & Farnsworth, 1984).

Para evitar os efeitos nefastos causados pelas baixas temperaturas, os estábulos devem ter quebra ventos que previnam correntes de ar e sempre que as condições climáticas piorarem os animais devem estar abrigados no seu interior, principalmente após o final da ordenha, altura em que os tetos estão mais vulneráveis (Timms, 2004).

Outros factores podem exacerbar os efeitos das condições climáticas sobre a pele dos tetos, como o estado nutricional e imunológico do animal, o funcionamento da máquina de ordenha e a utilização de alguns desinfectantes (Timms, 2004).

A desinfecção dos tetos após a ordenha pode aumentar o risco de congelamento dos tetos e de aparecimento de gretas, pelo que é importante tomar algumas precauções, como não utilizar desinfectantes formadores de película protectora ou pomadas, os quais demoram muito tempo a secar aumentando o risco de congelamento. A utilização de desinfectantes com grandes concentrações de emolientes como o glicol a 50%, minimiza os efeitos da congelação ao impedir a evaporação pela pele, diminuindo o número de gretas mas não eliminando por completo o aparecimento de lesões nos tetos sob más condições climáticas (Timms, 2004).

A desinfecção antes e depois da ordenha tem por função reduzir a população de bactérias presente nos tetos, diminuindo o risco de novas infecções (Radostitis *et al*; 1994). Mas a utilização de desinfectantes pode, por si só, estar na origem da degradação das condições da pele dos tetos tornando-a mais seca e frágil (Sieber & Farnsworth, 1984). A concentração dos desinfectantes, a formação de película, a utilização de desinfectantes sem condicionadores, ou de desinfectantes demasiado ácidos ou alcalinos, podem estar na origem de irritações da pele dos tetos (Nickerson, 1998; Burmeister *et al*; 1998b). Sendo dos mais utilizados, os desinfectantes iodados têm mais

casos registados de situações anómalas, mas também já foram observados problemas com desinfetantes à base de amónio quaternário, clorexidina, hipoclorito ou ácido dodecil benzeno sulfónico (Sieber & Farnsworth, 1984). Estes episódios caracterizam-se pelo aparecimento de lesões na parte distal dos tetos em 40 a 50% do efectivo, melhorando 10 a 14 dias após a substituição do desinfetante (Sieber & Farnsworth, 1984).

O pH é um factor importante tanto para a acção de alguns desinfetantes como para a saúde da pele pois o pH ácido de alguns desinfetantes pode provocar a exfoliação da pele. O valor de pH desejável para uma boa compatibilidade com a pele deve variar entre 6,5 e 8,5 (Hemling, 2002). Porém, alguns ácidos utilizados e o iodo, são eficazes em meios mais ácidos, daí existirem restrições legais em algumas regiões, definindo 4 como o pH mínimo do desinfetante utilizado (Hemling, 2002).

A adição de agentes condicionadores pode mitigar os efeitos adversos dos desinfetantes. Os humidificadores ou humectantes são aditivos que atraem a humidade para as camadas exteriores da pele a partir do ar ou das camadas internas da pele, tornando-a mais suave. A glicerina, o propilenoglicol e o sorbitol são alguns dos humectantes mais utilizados (Hemling, 2002). Vários autores demonstram a eficácia de desinfetantes contendo glicerina no tratamento de tetos gretados (Fox *et al*; 1991; Fox, 1992; Rasmussen & Larsen, 1998; Hemling, 2002).

Outro grupo de agentes condicionadores é o dos surfactantes que formam uma barreira impedindo a evaporação da humidade da pele. Exemplos desta categoria de químicos são os óleos minerais e o petrolatum, mas os mais utilizados são a lanolina e os seus derivados por serem solúveis na água (Hemling, 2002). No homem, uma forma de medir esta função de barreira da pele é através da medição da perda de água trans-epidémica, mas apesar da estrutura epidémica ser semelhante nos animais, as propriedades da barreira à humidade são diferentes inviabilizando a utilização destes instrumentos na avaliação da integridade da pele dos tetos e na eficácia dos produtos que ajudam a formar essa barreira na pele (Busmeister *et al*; 1998a).

A mistura de desinfetante e agentes condicionadores nas proporções adequadas parece ser a solução para obter desinfetantes que melhor protejam a pele, uma vez que a utilização de preparações só com emolientes

na recuperação de tetos gretados, foi menos eficaz que soluções com surfactantes, emolientes e com um desinfectante (Hemling, 2002).

A possibilidade de interacção entre desinfectantes tem sido considerada, mas dos ensaios efectuados não foi observado qualquer resultado que aponte nesse sentido (Nickerson, 1998).

Os desinfectantes formadores de uma película na superfície do teto, foram concebidos para reduzir a exposição dos tetos a agentes ambientais durante as ordenhas. Porém alguns ensaios demonstraram que alguns produtos não são eficazes na redução de novas infecções e causam irritação da pele dos tetos (Nickerson, 1998).

6. Hiperqueratose - calosidade e rugosidade do canal dos tetos

A principal alteração de longa duração é a hiperqueratose, uma das mais frequentes alterações do canal do teto.

Histologicamente a hiperqueratose corresponde a um aumento da espessura e rugosidade do canal do teto, causado pelo aumento da camada granulosa (Hamann *et al*; 1994) e da camada córnea, acompanhada de uma infiltração perivascular de linfócitos e granulócitos (Neijenhuis *et al*; 2004). O aumento da espessura das camadas do epitélio constitui a resposta fisiológica do canal dos tetos ao esforço que é a ordenha, pelo que alguns animais ordenhados à mão ou a alimentar vitelos também apresentam hiperqueratose só que em menor proporção que os animais ordenhados mecanicamente (Hamann *et al*; 1994; Mein *et al*; 2003a).

Ao contrário do que se julgava, a queratina do epitélio do canal dos tetos tem uma rápida capacidade de regeneração, demorando 1 a 2,5 dias a renovar-se completamente (Capuco *et al*; 1990). Durante a ordenha mecânica o leite ao sair pelo canal provoca a separação e remoção de cerca de 45% da queratina presente, além de contribuir para a alteração da sua composição química (Hamann *et al*; 1994). Alguns estudos indicam que a perda de maiores quantidades de queratina induzem um aumento da sua produção no canal do teto por mecanismos ainda não completamente esclarecidos (Lacy-hulbert, 1998). A hiperqueratose é a resposta do canal do teto para se manter

completamente fechado e impedir a entrada de microrganismos no úbere (Neijenhuis *et al*; 2004).

As lesões dos tetos estão associadas a uma maior incidência de mastites (Fox & Cumming, 1996; Sieber & Farnsworth, 1981), mas a presença de calosidade moderada nos tetos não tem sido relacionada com um aumento da vulnerabilidade do úbere às mastites (Neijenhuis *et al*; 2001a). De facto, segundo alguns estudos, canais do teto com níveis moderados de hiperqueratose têm menor incidência de mastites clínicas que canais do teto sem calosidade (Hamann *et al*; 1994; Neijenhuis *et al*; 2001a). Contudo canais do teto muito espessos e rugosos, têm uma maior incidência de mastites clínicas (Fox & Cumming, 1996) e de mastites subclínicas (Lewis, 2000), talvez porque podem ser mais facilmente transponíveis ou podem albergar um maior número de bactérias (Neijenhuis *et al*; 2004), uma vez que algumas delas encontram nas grandes quantidades de queratina os nutrientes e o ambiente que necessitam para se desenvolver (Newbould & Neave, 1965).

A quantidade de animais que podem ter hiperqueratose num rebanho varia muito, chegando em alguns casos a 80% do efectivo (Shearn & Hillerton, 1996).

A razão desta variabilidade tem a ver com vários factores que influenciam a hiperqueratose do canal dos tetos como a máquina de ordenha, o manejo de ordenha e as características do próprio animal.

6.1 Máquina de Ordenha

A ordenha mecânica tem uma grande influência nas alterações que ocorrem no canal do teto.

O nível do vácuo de ordenha é um factor que influencia a hiperqueratose porque altera a velocidade do fluxo de leite como verificaram Williams & Mein (1986), que determinaram que a velocidade no pico do fluxo de leite a 50 kPa, era de 8,5 m/s, mas reduzindo o vácuo para 40 kPa essa velocidade passava a ser de 7,5 m/s. Uma vez que a pressão aplicada pelo leite sobre a queratina do canal do teto é directamente proporcional à velocidade de fluxo de leite, aumentando o vácuo de ordenha aumenta também a quantidade de queratina

arrastada pelo leite na sua passagem estimulando a hiperqueratose (Williams & Mein, 1986; Hamann *et al*; 1994).

Parece existir uma importante relação entre a pulsação e a hiperqueratose. Segundo alguns estudos, a ordenha sem pulsação remove menos de 10% da queratina presente no canal do teto no início da ordenha, mas animais ordenhados com pulsação convencional perdem cerca de 40%. Nesses estudos, a diminuição da remoção da queratina levou a um aumento na incidência de mastites e a um aumento da susceptibilidade dos quartos a infecções por *Streptococcus uberis* e por *Streptococcus agalactiae* (Lacy-Hulbert, 1998; Lacy-Hulbert *et al*; 1996; Capuco *et al*; 1994). Para alguns autores, o aumento da incidência de mastites é consequência da congestão dos tetos provocada pela ordenha e pela proliferação de bactérias que se encontravam adsorvidas na queratina que não foi removida, principalmente pelas bactérias mais aptas a desenvolverem-se no canal do teto (Capuco *et al*; 1994).

O movimento cíclico da tetina promove a fractura das camadas externas da queratina que depois é removida pelo fluxo de leite (Mein *et al*; 2004). O papel da pulsação na remoção de queratina parece ser mais importante que o papel desempenhado pelo vácuo de ordenha uma vez que vacas ordenhadas sem pulsação mas com vácuos diferentes sofreram perdas de queratina semelhantes (Lacy-Hulbert, 1998).

Um conceito importante na compreensão do papel das tetinas sobre os tetos é a sobrepressão. A sobrepressão consiste na força aplicada pela tetina colapsada sobre o teto (Mein *et al*; 2003a). O valor desta força pode ser calculado pelo nível de vácuo na câmara de pulsação no momento em que deixa ou começa a haver fluxo de leite no canal do teto. Esta força é a responsável pela diminuição da congestão dos tetos. A sobrepressão aumenta sempre que:

- Se verifica um aumento no vácuo de ordenha, pois existe uma maior diferença de pressões entre os dois lados da parede da tetina.
- Se aumenta a tensão de montagem das tetinas.
- Se diminui a duração da fase C e das fases de transição, o que implica uma compressão mais curta e forte.
- Se aumenta a espessura das tetinas (Mein *et al*; 2003a).

A exposição dos tetos a valores elevados de sobrepressão causa a interrupção da circulação aumentando a pressão local, e ao nível do extracto córneo do canal do teto, ocorrem microfissuras que aumentam a produção de queratina pelo canal do teto (Mein *et al*; 2003a).

A perda de flexibilidade que ocorre com o aumento da tensão, resulta num aumento da pressão das tetinas sobre os tetos e também no aparecimento de tetos com cianose (Capuco *et al*; 2000). Tetinas sob alta tensão ou mais inflexíveis necessitam de uma maior diferença de pressão entre a câmara de vácuo e a câmara de pulsação para colapsar, aumentando a força de sobrepressão (Mein *et al*; 1987). Capuco *et al.* (2000), verificaram que o aumento da tensão das tetinas, aumentou a queratina no canal dos tetos, sem que tenha ocorrido uma maior perda, sugerindo que o próprio aumento da sobrepressão causado pelo aumento de tensão estimulou a hiperplasia e a hiperqueratose do canal do teto.

O tipo de tetinas também tem influência sobre a hiperqueratose. Schukken *et al.* (2006) demonstraram que tetinas com formas diferentes causavam hiperqueratose em diferentes proporções.

6.2 Maneio

A desinfecção pode causar irritação na pele do teto, especialmente da parte distal incluindo o canal do teto (Sieber & Farnsworth, 1981; Pankey *et al*; 1984). A irritação faz com que a pele desta zona fique mais seca induzindo a hiperqueratose (Sieber & Farnsworth, 1981; Mein *et al*; 2001).

Em geral, a hiperqueratose do canal dos tetos piora durante os meses mais frios (Timms *et al*; 1998a, b). As variações de temperatura e as baixas temperaturas em conjunto com ambientes húmidos e lamacentos, provocam a secagem e o endurecimento da queratina (Mein *et al*; 2001) favorecendo o aparecimento da hiperqueratose. Julga-se que este processo é diferente da queimadura da geada pela diferença das características das lesões (Timm *et al*; 1998a). Estes processos não foram completamente esclarecidos e desconhece-se a real extensão da influência das condições climáticas sobre a hiperqueratose do canal dos tetos (Timms *et al*; 1998b).

O tempo de ordenha com fluxos de leite inferiores a 1 Kg de leite por minuto tem uma grande importância na condição dos tetos. Este tempo de ordenha é principalmente influenciado pela preparação do úbere para a ordenha e pela afinação dos retiradores automáticos das tetinas quando existem (Mein *et al*; 2001).

A sobreordenha começa quando o fluxo de leite para a cisterna do teto é inferior ao fluxo de leite no canal do teto (Rasmussen, 2004). A partir deste ponto, o vácuo na cisterna do teto começa a aumentar, atingindo 90% do vácuo na tetina, aumentando também o vácuo na câmara superior da tetina causando o aparecimento da marca das tetinas na base do teto (Rasmussen, 2004). Outras consequências da sobreordenha são o aparecimento de lesões na mucosa da cisterna do teto e a redução da quantidade de queratina presente no canal (Gleeson *et al*; 2003). A sobreordenha é um dos principais factores relacionados com uma deterioração da condição dos tetos, particularmente quando se aplicam níveis de vácuo mais altos (Olney & Mitchel, 1983). Alguns estudos utilizando a termografia nos tetos, evidenciaram que a sobreordenha tem influência na circulação sanguínea, explicando porque frequentemente tetos expostos a sobreordenha apresentam congestão e alteração da cor. A termografia também permitiu concluir que a sobreordenha faz com que os tetos demorem mais tempo a recuperar e a voltar ao normal (Paulrud & Rasmussen, 2003).

6.3 Factores intrínsecos do animal

Os níveis de hiperqueratose do canal dos tetos são baixos no parto, mas normalmente aumentam durante os primeiros 4 meses da lactação, estando correlacionados com o aumento da quantidade de leite produzida e do tempo de ordenha; aparecendo mais cedo nas novilhas do que nos animais com mais do que duas lactações, nos quais é mais frequente (Sieber & Farnsworth, 1981; Neijenhuis *et al*; 2000). Durante o resto da lactação, a frequência de tetos com calosidade persiste ou diminui, mas é durante o período de secagem que ocorre uma diminuição significativa da hiperqueratose dos tetos.

Os tetos anteriores têm, normalmente mais calosidade que os posteriores (Sieber & Farnsworth, 1981), porque permanecem mais tempo em

sobreordena pois o fluxo de leite acaba primeiro, que nos canais dos tetos posteriores, que beneficiam do amortecimento fornecido pelo leite ainda presente (Neijenhuis *et al*; 2000).

A forma dos tetos também influencia a presença hiperqueratose; tetos pontiagudos e redondos têm mais calosidade e rugosidade do que tetos com o canal invertido, porque nos primeiros o canal do teto está mais exposto às forças de compressão das tetinas (Mein *et al*; 2001; Neijenhuis *et al*; 2000).

O comprimento do teto é, frequentemente, apontado como importante no aparecimento da hiperqueratose, mas Neijenhuis *et al*. (2001) verificaram que não contribuía significativamente para a presença de calosidade e rugosidade nos tetos. No entanto esta característica tem influência na sobrepressão aplicada pela tetina colapsada sobre o teto. Quanto maior for o teto, maior é a profundidade que vai atingir na tetina e maior vai ser a sobrepressão, até um determinado ponto, em que esta força começa a decrescer, ao aproximar-se do fundo da copa de ferro (Mein *et al*; 2003b).

A influência genética sobre hiperqueratose do canal dos tetos está indirectamente ligada a factores com alta heritabilidade, como a forma e o comprimento dos tetos (Timms, 2004; Mein *et al*; 2001; Seykora & Mcdaniel, 1986; Chrystal *et al*; 1999).

7. Hiperqueratose e as mastites

A existência de uma relação entre a hiperqueratose e as mastites não está completamente esclarecida. Esta relação é mais clara quando se fala de lesões agudas do canal do teto como erosões ou traumatismos, especialmente se afectarem a capacidade de oclusão do canal (Sieber & Farnsworth, 1981). No entanto, alguns autores não conseguiram demonstrar a existência de uma relação entre a hiperqueratose e novas infecções do úbere (Sieber & Farnsworth, 1981), ou contagens elevadas de células somáticas (Mein *et al*; 1986; Shearn & Hillerton, 1996); pelo contrário, outros trabalhos demonstraram a correlação entre hiperqueratose e a existência de mastites clínicas (Neijenhuis *et al*; 2001) e mastites subclínicas (Lewis, 2000). Esta contradição pode dever-se ao facto de os primeiros estudos não distinguirem canais com e sem rugosidade, ou não diferenciarem níveis de hiperqueratose pequeno a

moderado de níveis elevados (Lewis, 2000). Outra razão tem a ver com o facto de a hiperqueratose ser uma característica dinâmica, pelo que, estudos transversais podem não ser tão indicados como estudos longitudinais para avaliar esta característica e, particularmente, a dinâmica de aumento ou diminuição de hiperqueratose, num animal, com o estado sanitário do úbere (Neijenhuis *et al*; 2000).

8. Hiperqueratose e o bem-estar animal

Os animais têm uma grande variedade de necessidades, que são consequência dos vários sistemas vitais que operam num organismo e tornam possível a vida. As necessidades são deficiências que podem ser resolvidas pelo acesso a um determinado recurso ou pela resposta a um estímulo particular. Estas necessidades geram no animal respostas comportamentais ou fisiológicas, que são a forma de fazer frente às condições que lhe são apresentadas. As dificuldades ou até a inexistência destas respostas, vão afectar o bem-estar do animal (Broom, 1991). Assim, o bem-estar animal é um conceito que ultrapassa o sofrimento, uma vez que o bem-estar animal pode ser afectado sem a existência de sofrimento (Broom, 1991). A condição dos tetos, e particularmente a hiperqueratose, é um bom exemplo disso, uma vez que constitui a resposta do animal à remoção de quantidades acrescidas de queratina do canal dos tetos, onde desenvolve um papel importante na defesa contra a invasão do úbere por microrganismos patogénicos. Mas, a partir de um determinado nível, esta resposta do animal começa a falhar e torna-se, ela mesma, um motivo de debilidade, ao permitir que nas camadas de queratina se possam desenvolver microrganismos, comprometendo a função de barreira efectuada pela queratina, e aumentando a incidência de mastites clínicas (Neijenhuis *et al*; 2001a).

Pode então afirmar-se que a hiperqueratose do canal dos tetos é um indicador do bem-estar animal, face aos efeitos produzidos por um maneio de ordenha deficiente, ou uma ordenha mecânica com falhas. A hiperqueratose é, também, influenciada por factores que são características intrínsecas dos animais, razão pela qual é necessário analisar este problema com base em

dados do rebanho e não com base em alguns resultados individuais. Alguns investigadores têm analisado o bem-estar animal durante a ordenha, tendo em conta indicadores da condição dos tetos e a frequência de determinados comportamentos, como forma de avaliação de equipamentos de ordenha (Ohnstad, 1998).

A vida de uma vaca leiteira tem mudado muito ao longo das últimas décadas. A intensificação da produção com o aumento da eficácia da conversão dos alimentos, trouxe associados problemas podais, problemas reprodutivos, mais mastites e, conseqüentemente, um refugio precoce. Segundo alguns autores, mesmo que estes animais não fossem refugados, a sua esperança de vida iria ser inferior em relação ao que se verificava no passado (Broom, 1991). Apesar de estes animais não apresentarem sinais de alterações do seu bem estar animal, o aumento da incidência de doenças de produção, mas acima de tudo a diminuição da sua esperança de vida, são indicadores de um bem estar reduzido, durante a sua vida ou, pelo menos, durante algumas partes dela. Ajudar um animal a atingir o seu potencial produtivo é o desejável, desde que não haja sinais de alterações do seu bem-estar (Broom, 1991).

Indicadores como a hiperqueratose dos tetos, têm a grande vantagem de permitir que se faça um acompanhamento do bem estar durante a vida produtiva dos animais e ainda conseguir que se faça uma aposta na prevenção, ao permitir a correção em tempo útil, de situações anómalas, que possam levar ao aumento da incidência de mastites; neste caso em particular a condição dos tetos.

Capítulo III - Objectivos

Vários estudos têm mostrado que a hiperqueratose do canal dos tetos, tem um importante papel na susceptibilidade dos animais às mastites (Lewis, 2000; Neijenhuis *et al*; 2001a). Esta influência não está completamente esclarecida pois, no passado, não se avaliou a hiperqueratose sempre da mesma forma e também porque as mastites são uma doença multifactorial, bastante complexa, o que dificulta a interpretação dos resultados.

Assim, neste trabalho, utilizou-se um sistema de avaliação da hiperqueratose, que é reconhecido por ter uma boa repetibilidade entre observadores e por fornecer informação bastante detalhada sobre as lesões dos animais. Ao mesmo tempo, também se observaram os principais factores envolvidos no aparecimento da hiperqueratose e recolheu-se informação sobre as mastites existentes, para melhor caracterizar as explorações envolvidas neste estudo.

Os objectivos propostos foram:

- 1 - Caracterizar a hiperqueratose dos tetos, numa amostra de conveniência de explorações portuguesas.
- 2 - Correlacionar a hiperqueratose com a presença de factores de risco, como o funcionamento da máquina de ordenha, as características do animal, o maneo de ordenha e o maneo de estábulo.
- 3 - Fazer a descrição da prevalência dos factores de risco mais importantes na amostra.
- 4 - Verificar se existe alguma associação entre a hiperqueratose e a presença de infecções por microrganismos causadores de mastites, e as mastites clínicas.

Capítulo IV - Materiais e métodos

Foi realizado um estudo observacional transversal, tendo como amostra algumas explorações agropecuárias produtoras de leite de Portugal Continental, com o objectivo de caracterizar a hiperqueratose dos tetos. Esta caracterização foi efectuada, utilizando o método de avaliação holandês, por ser o único sistema de avaliação da hiperqueratose dos tetos com dados publicados sobre a sua repetibilidade entre observadores, além de permitir recolher informação sobre a calosidade e a rugosidade do canal dos tetos de uma forma distinta (Neijenhuis *et al*; 2000).

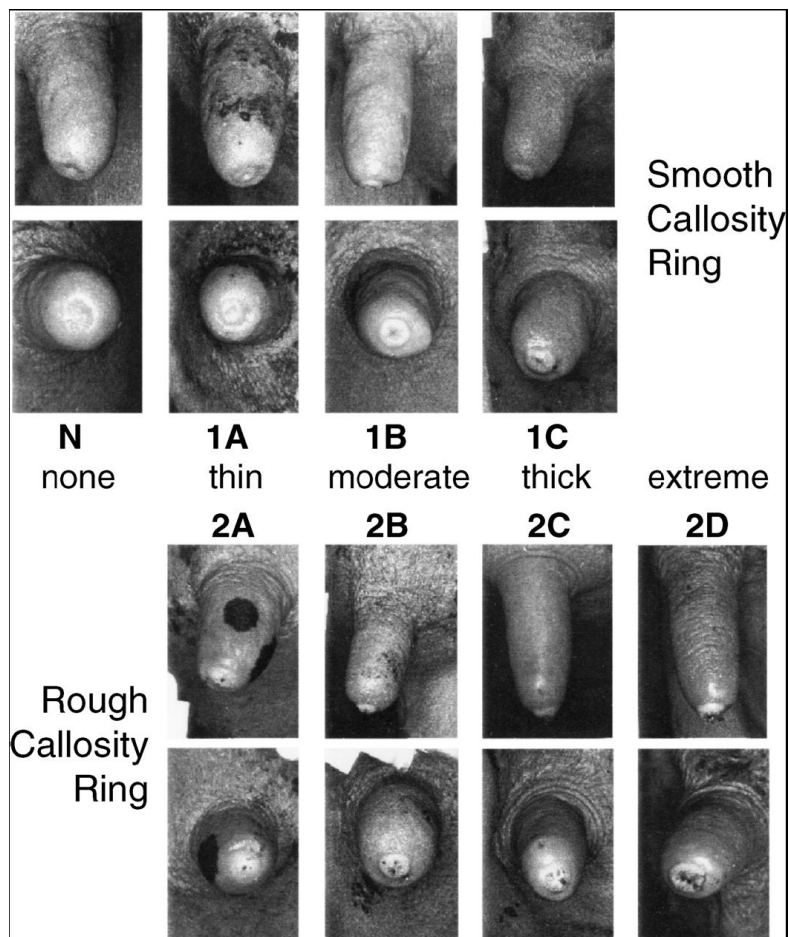


Figura 2: Sistema de classificação da hiperqueratose dos tetos (adaptado de Neijenhuis *et al*; 2000).

Por isso, este método de avaliação do canal dos tetos, é o método recomendado pelo “Teat Club International” para estudos de investigação (Mein *et al*; 2001).

Na figura 2, as classificações 2B e 2C, correspondem a canais do teto com altos níveis de hiperqueratose, e indicam algum comprometimento da integridade epitelial. Os canais do teto com níveis de hiperqueratose extremamente alta, têm a classificação 2D e, nestes casos, as camadas de queratina podem elevar-se a mais de 4 milímetros da superfície do teto, conferindo um aspecto rugoso ao canal do teto, a que vulgarmente se denomina “flor do teto” (Mein *et al*; 2001).

A máquina de ordenha foi avaliada, segundo as normas ISO 6690/1996 relativamente à pulsação e ao vácuo de ordenha.

A forma e comprimento dos tetos, também foram avaliados, após a limpeza e preparação dos tetos para a ordenha. Os tetos foram classificados quanto à forma da ponta como redondos, lisos, pontiagudos e invertidos. A medição do seu comprimento foi efectuada utilizando um tubo transparente com 5 centímetros de diâmetro com uma escala de 10 centímetros de comprimento.

A observação do canal dos tetos foi realizada de acordo com Mein *et al*. (2001) após o final da ordenha, antes da aplicação do desinfectante, utilizando uma boa fonte de luz e removendo restos de leite da ponta do teto com toalhetes de papel.

A visita a cada exploração para avaliação da condição do canal dos tetos, foi efectuada a seguir à visita de prova de estábulo. Na visita de prova de estábulo, técnicos especializados efectuaram o teste californiano de mastites (TCM) e a colheita de uma amostra composta, para análises microbiológicas e contagem de células somáticas. As colheitas eram efectuadas nos quatro quartos dos animais de todo o efectivo, com excepção daqueles com mastite clínica, nos quais, a amostra era colhida em separado. Todas as amostras foram colhidas de forma aséptica e imediatamente refrigeradas, sendo transportadas para o laboratório no próprio dia para a análise microbiológica.

No laboratório, de cada amostra de leite retirava-se uma ansa de 10 µl que se semeava em cada um de três meios de cultura Colombia agar ANC com sangue de cordeiro (Oxoid Limited, Wade road, Basingstoke, England), Agar MacConkey (BioMérieux SA, Marcy L`Etoile. France) e Brain heart infusion (Oxoid Limited, Wade road, Basingstoke, England). Após incubação nocturna a 37°C, efectuava-se a contagem das diferentes colónias desenvolvidas. Quando

existiam 4 ou mais colónias diferentes, a amostra era dada como contaminada. Quando não se observava crescimento de colónias no meio de MacConkey ou menos de 5 colónias no meio de Colombia agar ANC com sangue de cordeiro, nem se verificava crescimento no meio de Brain heart infusion (BHI), o resultado era considerado negativo. Sempre que houvesse crescimento de uma colónia ou mais em MacConkey, ou houvesse crescimento de 5 ou mais colónias semelhantes em Colombia agar ANC com sangue de cordeiro, fazia-se a identificação das colónias. A identificação foi efectuada com recurso aos testes da catalase, da oxidase, de Camp, ao teste Staphylect Plus® (Oxoid Limited, Wade road, Basingstoke, England), ao teste Pyr® (Oxoid Limited, Wade road, Basingstoke, England), à observação no microscópio óptico e à utilização das galerias de identificação Gp e Gn para o Vitek 2 compact® (BioMérieux SA, Marcy L'Etoile. France). Este procedimento respeita as normas delineadas pelo "National Mastitis Council" (National Mastitis Council, 1999). De maneira a permitir a análise estatística dos resultados obtidos nas análises microbiológicas, as espécies de bactérias identificadas foram agrupadas em 13 conjuntos, tendo em conta a sua classificação taxonómica, a epidemiologia e a sua importância clínica. Os agrupamentos efectuados estão na Tabela do Anexo 3.

As condições climáticas não foram analisadas, porque a recolha de dados ocorreu entre Fevereiro e Abril de 2007, e durante esse período as temperaturas oscilaram entre os 4°C de temperatura mínima e os 22°C de temperatura máxima (Inst. Nac. Meteorologia, 2007), o que não justifica alterações importantes da hiperqueratose dos tetos (Timms, 2004).

1. A amostra

De uma população de 15.600 explorações leiteiras existentes em Portugal (Anil, 2005), foi visitada uma amostra de conveniência de 17 explorações, as quais estavam integradas num programa de controlo da qualidade do leite do Segalab, o que permitiu que durante Fevereiro a Junho de 2007 fossem feitas as visitas necessárias à execução deste estudo. Esta amostra de conveniência, não permite tirar conclusões relativamente às

prevalências reais da hiperqueratose nas explorações leiteiras portuguesas, mas permite identificar alguns dos problemas mais comuns na origem desta alteração da condição dos tetos e observar alguns efeitos associados.

As 17 explorações da amostra pertenciam a 8 concelhos de Portugal continental, com a seguinte distribuição:

Concelho	Explorações
Braga	1
Barcelos	2
V. N. Famalicão	6
Vila Conde	4
Maia	1
Murtosa	1
Figueira Foz	1
Alcacer do Sal	1
Total	17

Tabela 1: Distribuição das explorações visitadas por concelho

Existe uma clara assimetria entre as diversas regiões do país, sendo que 14 pertencem à região do Entre Douro e Minho, 2 são da zona centro e 1 do sul do país.

Quanto ao tamanho das explorações visitadas a mediana de animais em lactação das explorações visitadas foi de 72 animais, sendo 23 o mínimo e 183 o máximo.

Em cada exploração foram avaliados, todos os animais em lactação. No entanto, e por motivos vários, não foram incluídas todas as vacas nas bases de dados e integradas na análise estatística. Uma vez que a exclusão destes animais foi completamente devida ao acaso, os animais amostrados por exploração nunca foram menos de 80% do total de animais da exploração, conforme é recomendado por Reinemann *et al.* (2001) ou, tomando como prevalência esperada 38% (Neijenhuis *et al.*; 2000), com um intervalo de confiança de 95% e uma precisão de 5%, é uma amostra representativa dos efectivos visitados seguindo os cálculos efectuados no WinEpiscope 2.0.

Desta forma, nas 17 explorações constituintes da amostra, foi observada a hiperqueratose na totalidade dos animais em produção, o que fez uma população de 1209 animais. Desta população foi utilizada uma amostra de

1116 animais, para análise da relação da hiperqueratose com o TCM e a microbiologia do leite (BD3), e uma amostra de 1110 animais, para análise dos factores que influenciavam a hiperqueratose (BD2).

Número da exploração	Número de animais em ordenha	Percentagem de animais amostrados BD3	Percentagem de animais amostrados BD2
1	47	98	100
2	183	83	91
3	41	100	100
4	23	100	96
5	46	91	91
6	49	88	100
7	135	81	82
8	47	96	96
9	98	95	92
10	67	99	99
11	51	88	88
12	43	95	93
13	90	92	93
14	54	98	91
15	111	94	98
16	50	100	94
17	74	84	92

Tabela 2: Número de animais por exploração e percentagem amostrada por base de dados

Em média, houve um intervalo de 9 dias entre a visita de prova de estábulo e a visita de avaliação da condição dos tetos. Uma vez que não se registaram más condições climáticas durante esse período em Portugal, esse intervalo não ultrapassou as 2 a 8 semanas, que segundo a bibliografia é o tempo necessário para observar diferenças consideráveis na hiperqueratose dos tetos (Mein *et al*; 2001).

2. Inquérito

Durante as visitas de avaliação dos tetos, efectuou-se um inquérito (Anexo 1) que visava caracterizar as explorações relativamente aos factores que, de

acordo com a bibliografia, podem influenciar a hiperqueratose dos tetos e estava estruturado nos seguintes temas:

- Higiene e condições de estabulação;
- Caracterização da máquina de ordenha;
- Maneio de ordenha.

3. Análise estatística

Para o tratamento estatístico dos dados utilizaram-se duas bases de dados, uma dedicada à observação da relação da hiperqueratose com os resultados da sanidade do úbere provenientes das visitas de prova de estábulo, e uma segunda base de dados para análise da relação entre a hiperqueratose e factores que a influenciam. Estas bases de dados foram construídas em Excel (versão 2000). Para análise das associações de risco, foi utilizado o programa estatístico SPSS (versão 10.0), recorreu-se a tabelas dinâmicas e a tabelas de frequência para a análise descritiva dos dados. Para análise das associações de risco, procedeu-se primeiro à análise univariada de todas as variáveis resultantes da aplicação do inquérito, dos dados obtidos nas visitas, e escolheram-se as variáveis significativas ($p < 0,05$) para entrarem num modelo de regressão logística multifactorial, sendo a classe de referência e a classe teste a classe de risco permitiram a análise descritiva dos dados através de tabelas dinâmicas, tabelas de frequências em conjunto com o programa informático SPSS (versão 10.0).

Com o objectivo de identificar as relações de risco entre as várias variáveis e a hiperqueratose conforme descrito na bibliografia, procedeu-se à transformação de algumas variáveis em variáveis binomiais (Anexo 2). Esta análise foi feita a dois níveis, no que diz respeito à unidade epidemiológica, uma vez que variáveis como a posição dos tetos, a sua forma ou comprimento, só é possível analisar tomando como unidade epidemiológica os tetos. Todas as outras variáveis foram analisadas sendo as vacas a unidade epidemiológica conforme está expresso na tabela do Anexo 2. Uma vez que só foram analisadas 17 explorações, a análise de associações de risco por exploração perdeu significância e optou-se por não explorar esses resultados.

Das variáveis que mostraram estar associadas a diferenças estatisticamente significativas na análise univariada, foi feita a análise multivariada utilizando três modelos de regressão logística com o SPSS (versão 15.0), um para as variáveis cuja unidade epidemiológica é o teto (modelo I) e dois para as variáveis cuja unidade epidemiológica é a vaca (modelo II e III).

Para o cálculo dos intervalos de confiança do OR, utilizaram-se as seguintes formulas:

$$\text{Limite superior} = \exp(\ln OR + Z_{1-\alpha} \text{se}(\ln OR))$$

$$\text{Limite inferior} = \exp(\ln OR - Z_{1-\alpha} \text{se}(\ln OR))$$

Capítulo V - Resultados

1. Resultados das observações

1.1 Factores intrínsecos do animal

O número médio de lactações por animal era de 2,3, sendo que 64,7% dos animais (n=711) tinham uma ou duas lactações, o que demonstra a presença de uma grande quantidade de animais novos no efectivo amostrado (Gráfico 1).

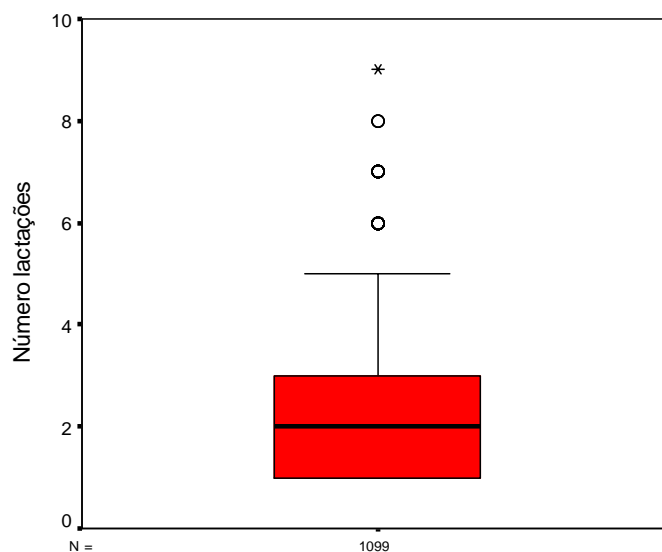


Gráfico 1: Distribuição do número de lactações do efectivo amostrado.

A média e a mediana de dias em lactação da amostra foi de 208 e 192 dias, respectivamente, sendo o máximo 927 dias (Gráfico 2).

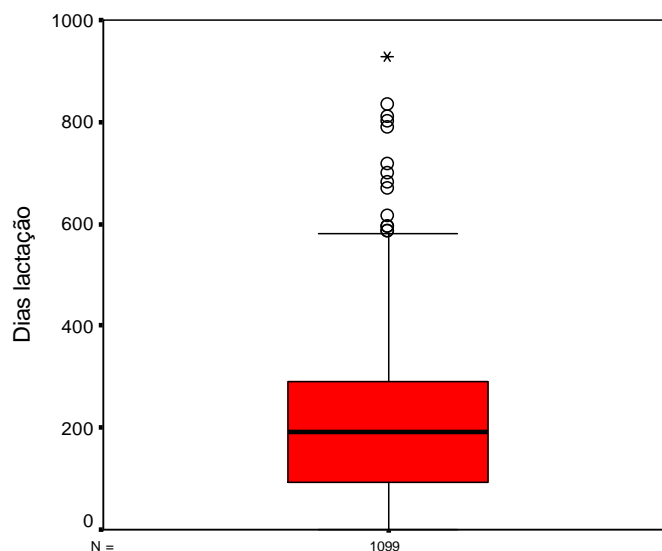


Gráfico 2: Distribuição dos dias de lactação do efectivo amostrado

A média e a mediana das produções de leite por ordenha observadas foram de 13 litros, com um máximo de 31 litros.

Cerca de 53,6% dos tetos observados eram redondos (n=2358), os tetos pontiagudos representaram 25% (n=1098) e os tetos lisos e invertidos representaram 14,5% (n=637) e 3,9% (n=170) respectivamente. Os tetos de quartos secos ou que tinham ferimentos, foram classificados como “excluídos” e representaram 3% (n=133) da amostra (Gráfico 3).

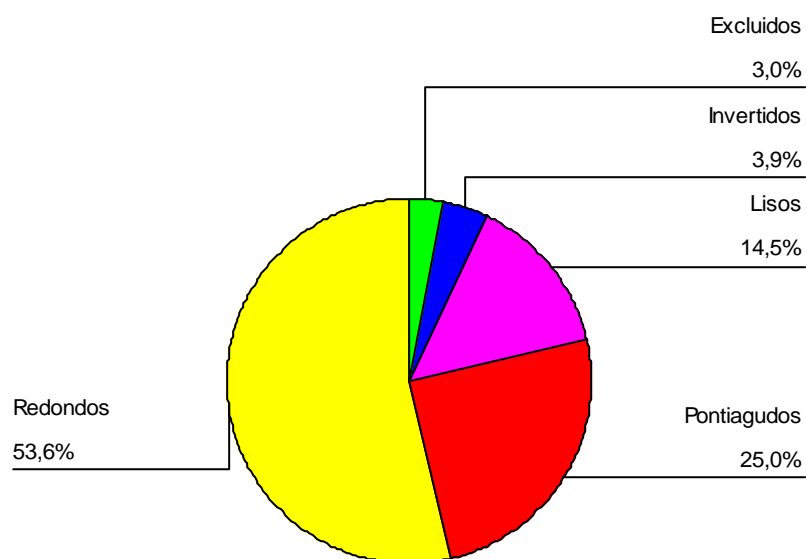


Gráfico 3: Percentagem das formas das pontas dos tetos.

No gráfico 4 verifica-se que, em média o comprimento dos tetos anteriores era 5,2 cm e o dos tetos posteriores 4,2 cm. Da análise de todos os tetos (anteriores e posteriores) verificou-se um comprimento médio de 4,69 cm, com um desvio padrão de 1,05 cm. Os tetos com maior comprimento tinham 10 cm. e os mais pequenos 1 cm.

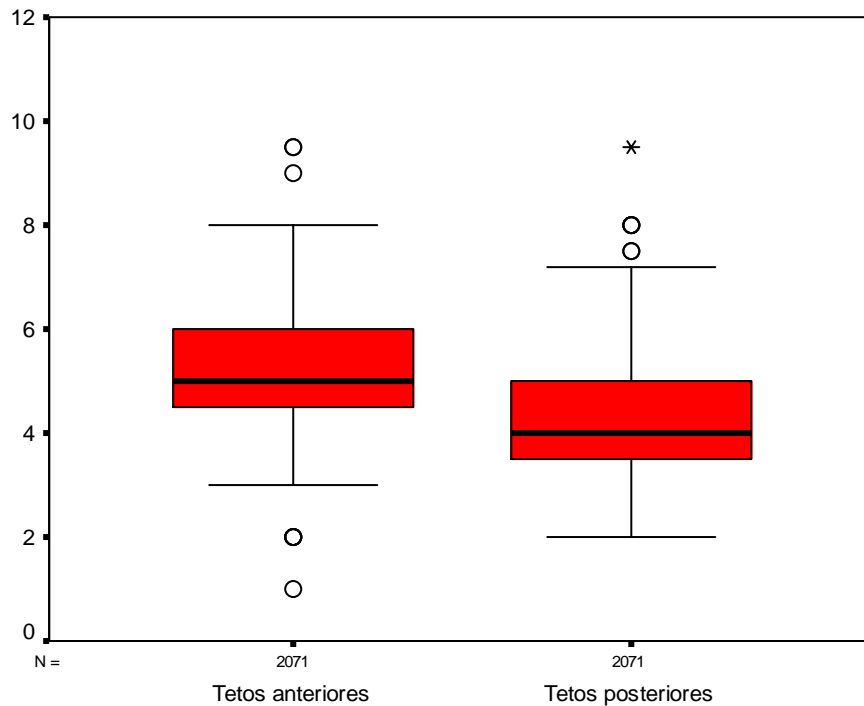


Gráfico 4: Distribuições do comprimento dos tetos anteriores e posteriores

1.2 Caracterização da hiperqueratose – Calosidade e rugosidade

1.2.1 Calosidade dos tetos

Em 4263 canais dos tetos avaliados, a calosidade média foi de 2,3. Cerca de 59,9% dos tetos anteriores (n=1277), tinham níveis de calosidade inexistente (N) ou pouco espessa (A), sendo que os mesmos níveis de calosidade representavam 72,2% (n=1538), dos tetos posteriores (Gráfico 5).

1.2.2 Rugosidade dos tetos

Aproximadamente 22,8% dos tetos (n=974) observados apresentaram canais rugosos. Tendo em conta a posição dos tetos, observou-se que 27,8% dos tetos anteriores eram rugosos (n=583), em comparação com 18,4% dos posteriores (n=391).

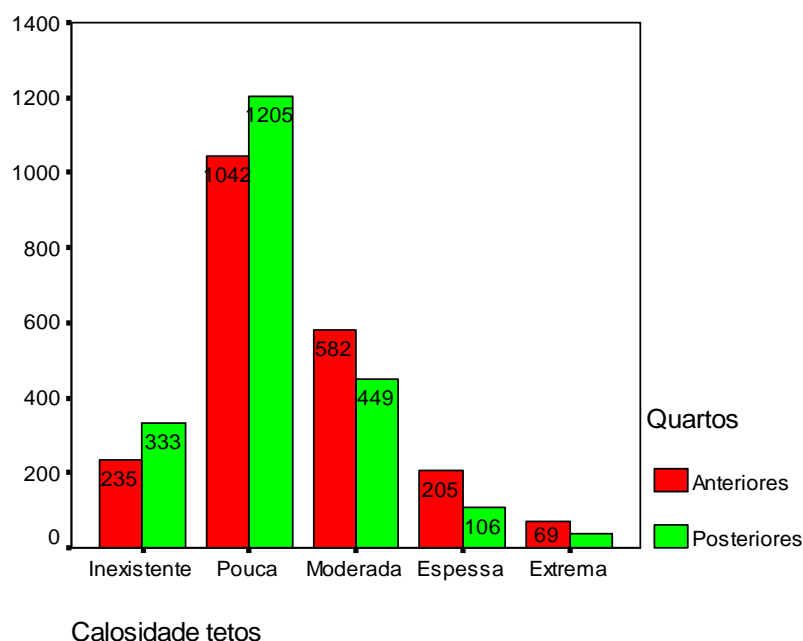


Gráfico 5: Frequência de calosidade dos quartos anteriores e posteriores.

Legenda: Nível N – calosidade inexistente; Nível A – pouca calosidade; Nível B – calosidade moderada; Nível C – calosidade espessa; Nível D – calosidade extrema

1.2.3 Hiperqueratose

Para a avaliação da hiperqueratose nas explorações, tomando como unidade epidemiológica as vacas, a proporção de animais com, pelo menos, um teto com hiperqueratose alta, (2B, 2C e 2D) variou entre os 5,4% (n=5) e os 43,3% (n=45) por exploração. Sendo o limite considerado aceitável de animais com este nível de hiperqueratose de $\leq 20\%$ (Mein *et al*; 2001), observou-se que a maioria das explorações (71%, n=12), ultrapassavam este limite.

No que se refere à presença de animais com hiperqueratose extrema (2D), em três explorações não existia nenhum animal com este grau de hiperqueratose extrema e o máximo foi de 15,4% (n=16), que foi o único caso de uma exploração ultrapassar o limite considerado aceitável dos $\leq 10\%$ (Mein *et al*; 2001).

1.3 Sanidade do úbere – Mastites e TCM

Foram observadas 66 mastites clínicas, correspondente a 1,5% dos quartos em que se realizou o TCM (TCM 3). Aproximadamente 77% dos quartos (n=3359) não apresentaram qualquer reacção ao TCM (TCM 0). Os restantes quartos tiveram reacção 1 ou 2 no TCM a que correspondem descargas de células somáticas moderadas ou altas, mas sem sinais de mastite clínica.

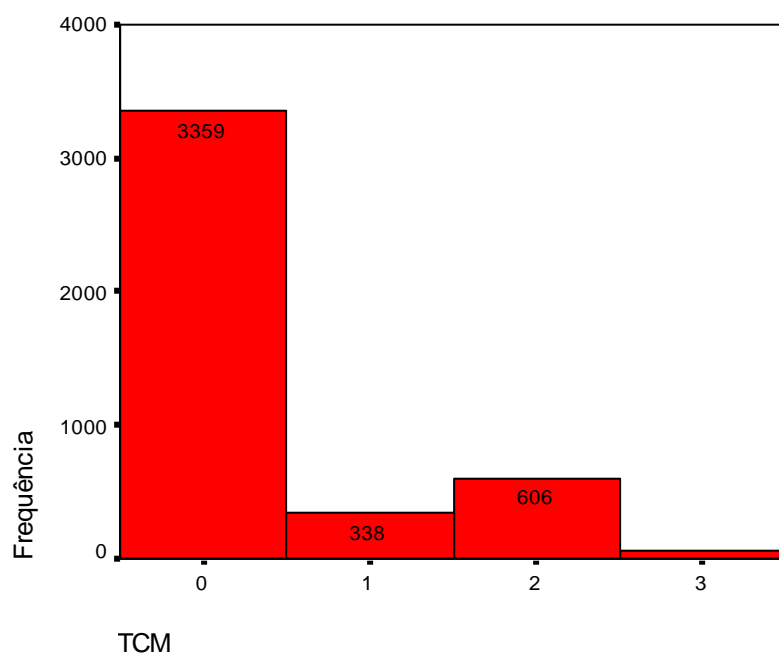


Gráfico 6: Frequência dos resultados do TCM dos quartos

Interpretação: TCM 0 – Sem reacção no TCM; TCM 1 – Reacção fraca; TCM 2 – Reacção forte; TCM 3 – Leite alterado (mastite clínica)

Os resultados das análises microbiológicas mostraram que 38% (n=415) das vacas não estava infectada com qualquer tipo agente (culturas negativas), e 20% (n=226) dos animais analisados estavam infectados com *Streptococcus spp.* Entre os agentes contagiosos, a percentagem de animais infectados com estafilococos coagulase negativos, foi de 15% (n=169), de 13% (n=142) para o *Staphylococcus aureus* e 2% (n=25) para o *Streptococcus agalactiae*.

	Percentagem vacas infectadas (%)	(n)
CULTURAS NEGATIVAS	38	415
<i>Streptococcus spp</i>	20	226
Estaf.coag.neg	15	169
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	142
<i>Corynebacterium spp</i>	9	97
<i>Enterobacteriaceae</i>	7	76
<i>Enterococcus spp</i>	3	34
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2	25
CONTAMINADA	2	21
<i>Bacillus spp</i>	1	17
Gram negativas não enterobactereaceas	1	16
Leveduras	1	15
<i>Prototheca spp</i>	0	1

Tabela 3: Percentagem de animais infectados por agente microbiológico.

2. Resultados do inquérito

2.1 Higiene e condições de estabulação

O tipo de estabulação e a sua higiene pode influenciar decisivamente a limpeza dos tetos. O contacto com a lama e os dejectos pode tornar a epiderme mais seca e, como consequência, aumentar a hiperqueratose do canal do teto. Nas 17 explorações observadas, 71% (n=12) apresentavam estábulos limpos, com camas e corredores em boas condições higiénicas, que eram limpos diariamente. Entre as 5 explorações que apresentaram condições de estabulação sujas, 2 não dispunham de cubículos, o que dificulta a manutenção das condições higiénicas de estabulação. Das 12 explorações com cubículos, 2 tinham “lodgets” de má qualidade, que pela sua forma e dimensão não permitiam boas condições de conforto, por isso, nessas 2 explorações, existiam parques alternativos sem cubículos para as vacas se poderem deitar. A densidade animal dos estábulos observados era alta, pois havia em média 1,1 animais por cubículo nas explorações observadas. Isto leva a que 35% das explorações observadas (n=6) ofereçam parques de exercício adicionais, de maneira a melhorar o conforto animal.

O conforto animal também é influenciado pelo material com que as camas são feitas, por isso aproximadamente 72% das explorações (n=14), utilizavam serrim de pinho nas camas. Nas restantes explorações, 2 tinham tapetes nos cubículos, onde regularmente se espalhava cal morta ou pó de pedra e numa única exploração as camas eram feitas com serrim de cortiça.

2.2 Caracterização das máquinas de ordenha

São vários os aspectos da máquina de ordenha, como a pulsação e o vácuo, que podem contribuir para a variação da hiperqueratose. Cerca de 59% das explorações (n=10) tinham máquinas de ordenha em espinha, sendo as restantes máquina de ordenha em tandem (n=7). O número de unidades de ordenha por exploração variava, sendo em média de 8, mas na máquina de ordenha mais pequena existiam 3 unidades em tandem e a maior sala de ordenha tinha 16 unidades dispostas em espinha. As salas de ordenha em espinha permitem que se ordene um maior número de animais com menos pessoas, em relação às ordenhas em tandem. Por outro lado, as salas em tandem permitem que se tenha um melhor controlo sobre os animais em ordenha. Por este motivo, foi observado em média, um maior número de unidades de ordenha por ordenhador nas salas em espinha (5,7) do que nas ordenhas em tandem (3,6). Este rácio pode influenciar a qualidade do trabalho desempenhado pelos ordenhadores, porque quanto maior for o número de unidades de ordenha a cargo de cada ordenhador, menor será a atenção dispensada a cada vaca, e assim influenciar o maneio de ordenha.

A necessidade de ter a máquina de ordenha a funcionar convenientemente, levou a que 65% (n=11) das explorações tivessem feito pelo menos uma revisão de manutenção durante o último ano, para além da visita de avaliação do funcionamento da máquina de ordenha, que é feita pelos serviços do Segalab. Mesmo assim, 29% das explorações observadas (n=5), tinham pelo menos um pulsador a funcionar em más condições. Da mesma forma, foi observado que em 35% das explorações o vácuo nas tetinas durante a ordenha sofria variações superiores a 5 kPa (Anónimo, n. d.). A influência do vácuo sobre a hiperqueratose dos tetos não é um assunto que reúna consenso, mas em 77% das explorações analisadas (n=13), verificou-se existirem vácuos

de ordenha superiores a 42 kPa. Isto vai permitir velocidades de fluxo do leite maiores e como consequência torna a ordenha mais rápida (Gráfico 7).

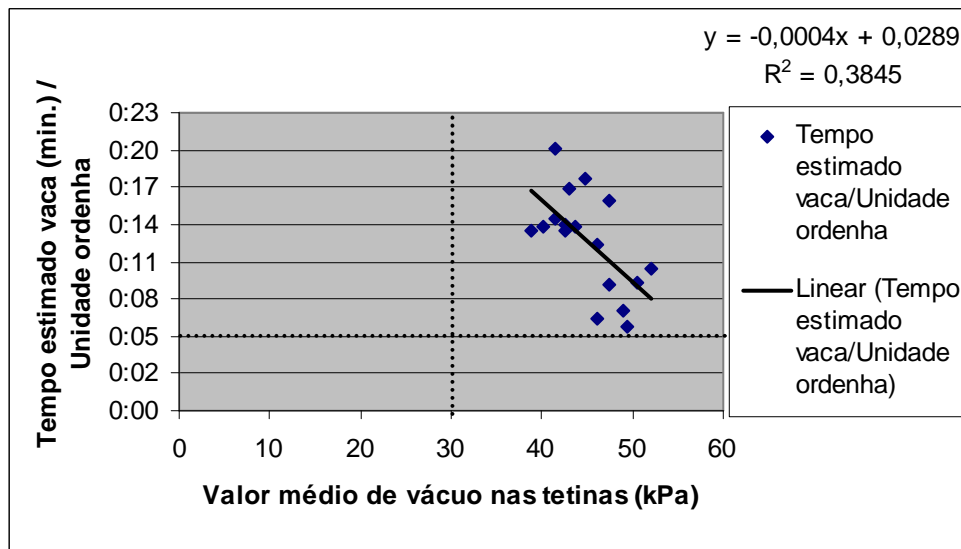


Gráfico 7: Tempo médio gasto por animal, por unidade de ordenha, em função do vácuo médio de ordenha, de cada exploração visitada

Existe uma grande variedade de tetinas, tanto no que respeita às medidas, como à forma e material de que são feitas. Nas 17 explorações visitadas foram observados 14 tipos diferentes de tetinas. Todos os modelos eram feitos de borracha, a qual com o número de utilizações e o passar do tempo sofre desgaste e perde tensão e flexibilidade, pelo que é, em geral, aconselhada a sua substituição após os 6 meses de utilização (Anónimo, n. d.). Observou-se que 47% das explorações (n=8) não renovava as tetinas há mais de 6 meses e 24% (n=4) tinham as tetinas com sinais de desgaste evidente.

2.3 Maneio de ordenha

A maioria das explorações realizava duas ordenhas diárias. No entanto, duas das explorações, no momento em que foram visitadas, realizavam três ordenhas diariamente.

A utilização de desinfetantes antes e depois da ordenha, a sobreordenha e o esgotamento, são alguns dos procedimentos no maneo de ordenha de uma exploração que têm grande importância para a ocorrência de hiperqueratose nos tetos.

Aproximadamente 35% das explorações (n=6) utilizavam desinfetantes em espuma ou toalhetes com desinfetante impregnado, na limpeza e preparação dos tetos para a ordenha. Cerca de 47% das explorações (n=8) utilizava panos húmidos na limpeza. Só uma exploração (5,9%) é que utilizava uma escova mecânica para a limpeza dos tetos.

O esgotamento mecânico é uma prática desaconselhável por promover a ocorrência de impactos de leite e, conseqüentemente, o aumento da incidência de novas infecções (Anónimo, n. d.), no entanto, em 76,5% das explorações (n=13) foi observada esta prática, em alguns animais. A sobreordenha, ou seja o prolongamento do tempo das tetinas acopladas aos tetos após o fluxo de leite ter acabado, de uma forma evidente foi observada em 23,5% das explorações (n=4). As tetinas devem ser retiradas depois de se desligar o vácuo, para evitar os impactos de leite. No entanto, em 23,5% das explorações (n=4) observadas as tetinas eram retiradas com o vácuo ligado.

A desinfecção dos tetos após a ordenha, é uma medida preventiva que está relativamente bem disseminada, pois 82% das explorações (n=14) efectuavam esta desinfecção aos tetos das quais, 11 utilizavam copos para aplicar o desinfetante e as restantes 3 aplicavam com “sprays”.

3. Análise dos factores de risco

3.1 Factores intrínsecos do animal que influenciam a hiperqueratose

As características do animal podem ser responsáveis por uma parte assinalável da variação observada na hiperqueratose dos tetos (Neijenhuis *et al*; 2000). A posição, a forma e o comprimento dos tetos mostraram ser algumas das características físicas dos animais que parecem estar relacionadas com o risco de ocorrência de canais do teto com hiperqueratose, conforme se podem observar na tabela 4 onde se encontram os intervalos de confiança do “odds” rácio (OR) e os valores de probabilidade (p) associados aos testes de qui-quadrado de Pearson da análise univariada de todas as variáveis.

Observando a tabela 4, verifica-se que os canais dos tetos anteriores apresentaram um risco em média 1,48 vezes superior, de terem níveis altos de hiperqueratose relativamente aos canais dos tetos posteriores. A diferença entre o risco de hiperqueratose dos tetos anteriores e dos posteriores, foi estatisticamente significativa. Também os tetos mais compridos tiveram um risco 1,91 maior de terem canais com hiperqueratose alta que os tetos com comprimento inferior a 5 centímetros. A forma da ponta dos tetos foi outra das características que mostrou influenciar duma maneira estatisticamente significativa a hiperqueratose. Mais concretamente, os tetos invertidos foram os tetos que apresentaram menor risco de ter altos níveis de hiperqueratose. Comparativamente aos tetos invertidos, os tetos que apresentavam maior risco de ter altos níveis de hiperqueratose, foram os tetos com canal do teto pontiagudo, seguidos dos tetos redondos e por fim dos tetos lisos; no entanto, as diferenças da hiperqueratose entre os tetos invertidos e os tetos lisos não foram estatisticamente significativas.

O número de lactações e os dias em lactação, foram dois factores que revelaram uma associação significativa com a hiperqueratose, uma vez que os animais com mais do que uma lactação tiveram um risco 2,62 vezes maior de ter altos níveis de hiperqueratose, do que os animais que estavam na primeira lactação. Verificou-se, também, que os animais com 94 dias de lactação ou mais, tinham uma probabilidade de terem níveis altos de hiperqueratose 2,23 superior do que os animais que se encontrassem a produzir há menos de 94 dias. A produção leiteira de cada vaca, por ordenha, foi um factor que não esteve associado a um aumento de risco de altos níveis de hiperqueratose, pois os níveis de significância do teste de qui-quadrado de Pearson mostraram não haver diferenças estatisticamente significativas entre os animais que tiveram produções superiores ou inferiores a 10, 13 ou 16 litros.

Variáveis	"Odds" rácio	Intervalo de confiança a 95% do "odds" rácio		P
		Limite inferior	Limite superior	
Pulsação	0,56	0,386	0,806	0,002
Sobreordenha	0,92	0,658	1,297	0,648
Esgotamento	1,73	1,300	2,304	0
Desinfectante	3,51	2,083	5,898	0
Higiene	1,29	0,975	1,702	0,054
Retiradores automáticos	3,99	1,924	8,289	0
Nr lactações	2,62	1,883	3,654	0
Idade tetinas	1,65	1,233	2,201	0,01
Vácuo tetinas	1,63	1,201	2,209	0,01
Dias de lactação 94	2,23	1,539	3,239	0
Produção leiteira 10	0,96	0,691	1,338	0,818
Produção leiteira 13	0,05	0,576	0,995	0,757
Produção leiteira 16	0,79	0,583	1,081	0,143
Tetos anteriores Vs posteriores	1,48	1,226	1,776	0
Forma invertidos Vs lisos	1,864	0,869	3,997	0,104
Forma invertidos Vs redondos	3,414	1,663	7,008	0
Forma invertidos Vs pontiagudos	4,929	2,386	10,180	0
Comprimento 5 Cm.	1,91	0,438	0,624	0

Tabela 4: Intervalo de confiança dos "odds" rácio e dos valores da probabilidade (p) associados ao teste de qui-quadrado de Pearson da análise univariada

3.2 Factores do maneo e da máquina de ordenha que influenciam a hiperqueratose

Várias características de maneo de ordenha e da máquina de ordenha estavam também associadas à hiperqueratose. A prática de esgotamento no final da ordenha, a desinfeção dos tetos após a ordenha, a inexistência de retiradores automáticos na máquina de ordenha, a utilização de tetinas com mais de 6 meses e vácuos nas tetinas superiores a 42 kPa, foram factores cujos resultados demonstraram estarem associados a um aumento de risco de os animais terem maiores níveis de hiperqueratose, sendo essas diferenças estatisticamente significativas, na análise univariada. No entanto, outros factores como a sobreordenha ou a falta de condições higiénicas do estábulo, não estiveram associados a diferenças significativas da hiperqueratose. Já a presença de pulsadores com pulsação anómala foram responsáveis por diferenças estatisticamente significativas da hiperqueratose, mas o "odds" rácio

envolvido é inferior a um, indicando a presença de um factor de protecção. Estes resultados indicam que os critérios de avaliação da pulsação não terem sido os mais indicados para avaliar a influência da pulsação sobre a hiperqueratose.

3.3 Factores de sanidade do úbere que são influenciados pela hiperqueratose

Foi feito o mesmo tipo de análise entre os tetos com mastite clínica e mastite subclínica e pode observar-se que os tetos com hiperqueratose extrema (2D) têm um risco 3,53 vezes maior de desenvolver mastite, clínica ou subclínica, comparativamente aos tetos com níveis menores de hiperqueratose.

Esta associação entre hiperqueratose e mastites continuava a ser estatisticamente significativa adicionando aos tetos com hiperqueratose extrema (2D) tetos com níveis de hiperqueratose mais baixo, mas ainda acima do normal (2B e 2C), só que o valor do “odds” rácio foi mais baixo (1,56), mostrando que essa associação era mais fraca (Tabela 5).

Variáveis	Unidade epidemiológica	“Odds” rácio	Intervalo de confiança a 95% do “odds” rácio		P
			Limite inferior	Limite superior	
Hiperqueratose alta (2B, 2C)					
Tetos com mastite clínica e subclínica Vs tetos sem mastite	Tetos	1,56	1,274	1,912	0
Hiperqueratose extrema (2D)					
Tetos com mastite clínica e subclínica Vs tetos sem mastite	Tetos	3,53	2,45	5,10	0

Tabela 5: Intervalos de confiança dos “odds” rácios e os valores da probabilidade (p) do teste de qui-quadrado de Pearson entre os tetos com hiperqueratose 2B e 2C e tetos só com hiperqueratose extrema (2D) e a presença de mastites.

A presença de associações entre altos níveis de hiperqueratose (2B, 2C e 2D) nas vacas e os microorganismos que infectavam o úbere pode ser analisada na Tabela 6.

Para os grupos de agentes, estafilococos coagulase negativos, *Corynebacterium spp*, *Streptococcus spp* e *Staphilococcus aureus*, não foi verificada qualquer associação com a presença de hiperqueratose nos canais do teto. Os *Enterococcus spp* e as *Enterobactereaceae* tiveram diferenças significativas na presença de hiperqueratose entre animais infectados e não infectados com estes agentes, e os “odds” rácios foram 2,02 e 1,73, no entanto é necessário registrar que o intervalo de confiança deste indicador de risco tem valores próximos de 1 para as *Enterobactereaceae* e até mesmo inferiores para os *Enterococcus spp*.

O *Streptococcus agalactiae* foi o único agente microbiano que teve uma forte associação entre vacas com hiperqueratose e infecção, registrando um “odds” rácio de 5. Este indicador de risco baixava para 2,76 se só se tiver em conta os animais presentes nas explorações com este tipo de infecções, mas sempre com níveis de significância inferiores a 0,05.

Variáveis	"Odds" rácio	Intervalo de confiança a 95% do "odds" rácio		P
		Limite inferior	Limite superior	
Cult. Negativas	0,41	0,300	0,587	0
Estaf. Coag. Neg.	1,14	0,786	1,665	0,482
<i>Corynebacterium spp</i>	1,33	0,835	2,106	0,231
<i>Strept. spp</i>	1,34	0,963	1,862	0,082
<i>Staph. aureus</i>	1,4	0,948	2,068	0,09
<i>Enterobactereaceae</i>	1,73	1,052	2,833	0,029
<i>Enterococcus spp</i>	2,02	0,997	4,092	0,047
<i>Strept.agalactiae</i>	5	2,219	11,269	0
Explorações com <i>Staph. aureus</i>	1,46	0,985	2,167	0,058
Explorações com <i>Strept.agalactiae</i>	2,76	1,083	7,036	0,03

Tabela 6: Intervalos de confiança dos “odds” rácios e os valores da probabilidade (p) do teste de qui-quadrado de Pearson entre os animais com hiperqueratose alta (2B, 2C e 2D) e os resultados das análises microbiológicas.

3.4 Análise multivariada das variáveis

No modelo I, foi analisado o comprimento dos tetos, a posição dos tetos e a forma dos tetos. Para analisar o efeito da forma da ponta dos tetos criaram-se 3 variáveis “dummies”, respectivamente para a forma lisa, redonda e pontiaguda, as quais foram testadas contra os tetos com a forma invertida. Os resultados confirmaram que a forma pontiaguda tinha um maior risco de hiperqueratose, os tetos redondos tinham um risco menor e os tetos lisos tal como na análise univariada não eram significativamente diferentes dos tetos invertidos (Tabela 7).

O comprimento e a posição dos tetos demonstraram também ter uma influência significativa na hiperqueratose uma vez que tetos com comprimento igual ou superior a 5 centímetros tinham um risco 1,68 vezes maior de ter níveis altos de hiperqueratose que tetos com menos de 5 centímetros.

Os tetos anteriores tinham um risco de ter hiperqueratose 1,26 maior, relativamente aos tetos posteriores.

Os resultados do modelo II, demonstraram que a variável, idade das tetinas, não é responsável por diferenças significativas na hiperqueratose dos tetos da amostra. O esgotamento foi outra variável cujos resultados na análise multivariada demonstraram não estar relacionada com o aparecimento da hiperqueratose. As outras variáveis que foram integradas neste modelo, como a desinfecção após a ordenha, a higiene, o número de lactações, os dias de lactação, o vácuo de ordenha nas tetinas e a presença e utilização de retiradores automáticos das tetinas, mostraram ter influência significativa na hiperqueratose dos animais amostrados. As variáveis que mostraram uma associação mais forte com a hiperqueratose foram a utilização de retiradores automáticos e a desinfecção dos tetos após a ordenha, com “odds” rácios de 3,75 e 3,41, respectivamente.

Para observar melhor o efeito das variáveis sobre a hiperqueratose e as interacções entre si foi feito um terceiro modelo, com as mesmas variáveis do modelo II, mas excluindo as variáveis que tinham “missing values”, ou valores em falta, que foram, a idade das tetinas e os retiradores automáticos. Os

resultados deste modelo confirmaram as observações do modelo II, com excepção da variável higiene, que neste modelo não demonstrou influenciar significativamente a hiperqueratose e o intervalo de confiança do “odds” rácio tinha um limite inferior menor que 1.

Variáveis	Unidade epidemiológica	"Odds" rácio	Intervalo de confiança a 95% do "odds" rácio		P
			Limite inferior	Limite superior	
Modelo multivariado I					
Tetos anteriores Vs posteriores	Tetos	1,263	1,041	1,531	0,018
Comprimento 5 Cm.	Tetos	1,68	2,023	1,396	0
Forma invertidos Vs lisos	Tetos	2,008	0,935	4,310	0,074
Forma invertidos Vs redondos	Tetos	3,448	1,678	7,092	0,001
Forma invertidos Vs pontiagudos	Tetos	4,651	2,247	9,615	0
Modelo multivariado II					
Esgotamento	Vaca	0,42	0,235	0,752	0,03
Idade tetinas	Vaca	1,04	0,709	1,541	0,823
Vácuo tetinas	Vaca	1,64	1,033	2,611	0,036
Higiene	Vaca	1,95	1,295	2,915	0,01
Dias de lactação 94	Vaca	2,10	1,389	3,175	0
Nr lactações	Vaca	2,72	1,901	3,906	0
Desinfectante	Vaca	3,41	1,835	6,329	0
Retiradores automáticos	Vaca	3,75	1,953	7,194	0
Modelo multivariado III					
Esgotamento	Vaca	0,90	0,594	1,361	0,616
Higiene	Vaca	1,21	0,872	1,681	0,254
Vácuo tetinas	Vaca	1,63	1,067	2,494	0,024
Dias de lactação 94	Vaca	2,08	1,420	3,049	0
Nr lactações	Vaca	2,60	1,855	3,650	0
Desinfectante	Vaca	3,02	1,678	5,464	0

Tabela 7: Intervalos de confiança dos “odds” rácios e as significâncias (p) das variáveis incluídas nos diferentes modelos face aos níveis de hiperqueratose alta (2B, 2C e 2D).

Capítulo VI - Discussão

A hiperqueratose do canal do teto é um problema que tem alguma importância na população estudada, uma vez que 71% das explorações tinham mais de 20% dos animais com níveis de hiperqueratose altos. Isto demonstra que, nesta área, ainda existe bastante trabalho a ser efectuado, no sentido de corrigir erros de manejo e problemas da máquina de ordenha que estejam na origem desta situação. Também mostra que o potencial de melhoria não está esgotado e que a vigilância da hiperqueratose nestas explorações pode resultar numa melhor prevenção das mastites e, conseqüentemente, num aumento da rentabilidade.

Durante o estudo foi possível constatar que este género de avaliação é suficientemente prático para poder ser aplicado em todo o tipo de explorações leiteiras, sendo no entanto um trabalho que implica muita concentração para se conseguir efectuar estas avaliações de forma correcta e não atrasar o ritmo a que os animais passam pela ordenha, pelo que não é possível a um observador avaliar a hiperqueratose e ainda executar outro tipo de tarefas durante a ordenha.

1. Factores intrínsecos do animal que influenciam a hiperqueratose

Como referem Neijenhuis *et al.* (2000) são várias as características do animal que condicionam a ocorrência de hiperqueratose. Um desses factores em que se observou esta relação foi o número de dias de lactação, uma vez que os animais com 94 dias de lactação ou mais, tinham um risco maior de terem níveis altos de hiperqueratose (OR= 2,23). Estudos realizados por Neijenhuis *et al.* (2000) e Shearn & Hillerton (1996) referem que os níveis de hiperqueratose aumentam até aproximadamente aos 4 meses de lactação e a partir dessa altura começam a diminuir. Estes valores não puderam ser confirmados uma vez que este estudo foi transversal não sendo possível acompanhar a evolução da hiperqueratose ao longo da lactação, como num estudo longitudinal.

Segundo alguns investigadores, o leite ao passar pelo canal do teto arrasta quantidades significativas de queratina e estimula o aumento da sua

produção (Williams & Mein, 1986), no entanto os resultados obtidos não corroboraram esta teoria. Mesmo levando em conta o factor exploração, não se registaram diferenças significativas na hiperqueratose entre os animais da mesma exploração com diferentes níveis de produção leiteira. Uma vez que a hiperqueratose é uma característica com uma grande variabilidade entre os animais, só em estudos longitudinais, acompanhando a evolução tanto da produção como da hiperqueratose ao longo da lactação, é que é possível observar esta relação.

Neste estudo não se analisou a importante influência que o tempo que os animais passam em cada ordenha com as tetinas acopladas tem, sobre a hiperqueratose, por não se dispor dos meios necessários para recolher esta informação.

Os resultados deste estudo mostraram que vacas só com uma lactação tinham um menor risco de terem hiperqueratose que os animais com 2 ou mais lactações. Apesar de haverem algumas referências relativamente à influência do número de partos sobre a hiperqueratose (Shearn & Hillerton, 1996), os resultados entre os vários estudos não são completamente concordantes, uma vez que Neijenhuis *et al.* (2000), não observaram diferenças significativas entre as vacas destes dois grupos de animais, para a calosidade e a rugosidade do canal dos tetos.

A posição dos tetos também influenciou significativamente, a hiperqueratose. A razão pela qual os tetos anteriores têm mais hiperqueratose que os tetos posteriores, prende-se com o facto de os quartos anteriores produzirem menos leite, acabando primeiro a ordenha e conseqüentemente ficando expostos a períodos de sobreordenha maiores (Neijenhuis *et al.*; 2000).

O comprimento dos tetos está directamente relacionado com o posicionamento dos tetos nas tetinas. Tetos demasiado curtos ficam acima da zona de colapso das tetinas, mas para os tetos mais compridos a força de sobrepressão aplicada pelas tetinas colapsadas aumenta de uma forma directamente proporcional, à medida que a profundidade de inserção nas tetinas aumenta, até um determinado limite (Mein *et al.*; 2003a). Uma vez que aumentos na sobrepressão aplicada nos tetos aumentam a hiperqueratose, os tetos mais compridos têm maior probabilidade de ter hiperqueratose, tal como indicam os resultados observados, uma vez que os tetos mais compridos

tiveram um risco 1,91 vezes superior de terem níveis altos de hiperqueratose, em relação aos tetos com comprimentos inferiores a 5 centímetros.

A forma da ponta dos tetos também desempenha uma influência importante no desenvolvimento da hiperqueratose. Conforme é referido por Neijenhuis *et al.* (2000), os tetos pontiagudos, desenvolvem rugosidade do canal mais cedo e em conjunto com os tetos redondos desenvolvem níveis de hiperqueratose maiores que os tetos lisos e invertidos. Este factor de protecção dos tetos invertidos em relação, principalmente, aos tetos redondos e pontiagudos, pode estar relacionado com a protecção que é conferida pelos tecidos adjacentes ao canal do teto, aos movimentos de colapso das tetinas. A ponta dos tetos é o local onde é aplicada mais força pelas tetinas ao colapsar, pelo que o canal dos tetos lisos e invertidos estará mais protegido que nos tetos com a forma redonda ou pontiaguda (Mein *et al.*; 1973; 1987).

2. Factores do maneo e da máquina de ordenha que influenciam a hiperqueratose

São várias as práticas de maneo de ordenha que estão relacionadas com a hiperqueratose, porém foi possível observar que nem todas as variáveis tiveram influência significativa sobre a hiperqueratose dos tetos.

A sobreordenha é uma das principais causas de danos nos tetos e provoca perda de queratina do canal do teto (Gleeson *et al.*; 2003). Segundo Shearn & Hillerton (1996), a sobreordenha e a produção leiteira são dois factores muito importantes no desenvolvimento de hiperqueratose. No entanto, tal como para a produção leiteira, a sobreordenha também não produziu diferenças estatisticamente significativas na população amostrada. A avaliação da sobreordenha foi efectuada durante as visitas de avaliação dos tetos e uma vez que não foi possível recorrer a instrumentos técnicos que permitissem perceber quando as tetinas deveriam ser removidas, as observações efectuadas podem não ter o rigor e objectividade necessárias, o que poderá ter-se reflectido nestes resultados.

A utilização de retiradores automáticos das tetinas, permite que estas saiam assim que é detectada diminuição na velocidade de fluxo de leite,

impedindo que ocorra sobreordenação durante períodos muito longos. Por este motivo é que se observou que a ausência de retiradores automáticos estava associada a um aumento do risco de hiperqueratose da ordem de 3,75 em relação às explorações onde se utilizava este equipamento. A partir destes resultados pode inferir-se a importância da sobreordenação no aparecimento da hiperqueratose, e concluir que a forma como se efectuou a observação da sobreordenação neste estudo, não é a forma mais correcta e objectiva de o fazer.

O esgotamento não é uma prática aconselhável, mas está relativamente difundida entre as explorações, uma vez que 76,5% das explorações (n=13) recorrem a ela. O tempo dispendido no esgotamento mecânico, impede o ordenhador de fazer todas as tarefas atempadamente, implicando um aumento da sobreordenação dos animais. Assim, quando avaliado individualmente, observa-se que o esgotamento é um factor de risco, aumentando a probabilidade de ocorrer hiperqueratose 1,73 vezes comparativamente a explorações onde não se faz esgotamento mecânico. Mas considerando os resultados dos modelos multivariados, a prática de esgotamento não é responsável por diferenças significativas na hiperqueratose, e passa a ser um factor de protecção. A diferença entre os resultados das análises univariada e multivariada mostram que os efeitos observados pela análise univariada são fruto da influência de outros factores. Uma vez que o esgotamento é uma prática muito variável, os possíveis efeitos sobre a hiperqueratose são mais débeis. Daqui se conclui que os resultados da hiperqueratose não são válidos para analisar uma associação com a prática do esgotamento.

A presença de sujidade nos tetos pode secar a pele, incluindo a epiderme do canal do teto, e estimular o aparecimento de hiperqueratose (Mein *et al*; 2001). Apesar de não ser referida como uma das causas mais comuns de hiperqueratose, avaliaram-se as condições higiénicas dos estábulos onde os animais se encontravam para verificar se existia alguma relação. Os resultados levam a concluir que esta relação, a existir, é muito fraca porque tanto na análise univariada como na análise multivariada do modelo III não houve diferenças estatisticamente significativas entre a hiperqueratose de animais em estábulos sujos ou limpos. Apesar de no modelo II os níveis de significância já terem sido inferiores a 0,05, o facto de terem sido incluídas explorações com dados incompletos para algumas variáveis pode ter influenciado os resultados,

podendo os resultados desta variável ser o resultado da interacção de outras variáveis.

A utilização de desinfectante no final da ordenha, foi das variáveis que teve uma associação mais forte com o aparecimento de hiperqueratose, ao ter um “odds” rácio de 3,41. Os vários princípios activos dos desinfectantes utilizados nas explorações observadas incluíam na sua composição agentes condicionadores da pele. Estes resultados alertam para a possibilidade desta forte associação poder estar relacionada com o facto de a presença de desinfectantes em altas concentrações, podem interferir com a saúde da epiderme do canal dos tetos (Sieber & Farnsworth, 1981; Mein *et al*; 2001).

Para além das características dos animais e do maneo de ordenha, houve parâmetros da máquina de ordenha que foram avaliados como a média de vácuo de ordenha, o tempo de utilização das tetinas e o estado da pulsação. Verificou-se que nas explorações com média de vácuo superior a 42 kPa havia um risco 1,64 vezes maior de hiperqueratose que em explorações com vácuo inferior a 42 kPa. A forma segundo a qual ocorre a influência do vácuo sobre a hiperqueratose do canal dos tetos não é completamente clara, mas segundo Mein *et al.* (2003a), quanto maior é o vácuo, maiores vão ser as diferenças de pressão entre as diferentes fases da pulsação e, conseqüentemente, maior vai ser a força de sobrepressão exercida pelas tetinas sobre os tetos, estimulando a hiperqueratose. Outros investigadores também referem que aumentos da velocidade de fluxo de leite com vácuos de ordenha maiores, resultam numa maior remoção de queratina o que levará a uma estimulação da sua produção no canal do teto (Williams & Mein, 1986; Hamann *et al*; 1994).

Todas as explorações observadas utilizavam tetinas de borracha, provenientes de fabricantes europeus. Este tipo de tetinas tem, em média, um tempo de vida útil de 6 meses. A partir deste prazo, as tetinas devido ao esforço mecânico e ao contacto com os produtos de limpeza começam a perder a sua flexibilidade e tensão (Boast *et al*; 2003). A pulsação pode começar a ficar prejudicada e os tetos podem sofrer maior congestão. O que se verificou é que estas alterações que podem ocorrer em tetinas mais velhas não alteram significativamente a hiperqueratose dos tetos dos animais que são ordenhados com elas, segundo os resultados do modelo II.

Observou-se também a influência da presença de pulsadores com pulsação anômala sobre a hiperqueratose. Os resultados mostraram que as anomalias detectadas na pulsação, que correspondiam essencialmente a alterações na duração das diferentes fases da pulsação e não a aumentos da frequência da pulsação, não produziram diferenças estatisticamente significativas na hiperqueratose, segundo a análise dos resultados pelo teste de qui-quadrado de Pearson. Este tipo de alterações nos pulsadores pode provocar uma maior vulnerabilidade às mastites, não pelo aumento da hiperqueratose, mas pelo aumento da congestão dos tetos.

3. Factores de sanidade do úbere que são influenciados pela hiperqueratose

Os resultados mostraram que os tetos com hiperqueratose extrema (2D) têm um risco superior de terem mastite, que aqueles que não têm hiperqueratose tão pronunciada. Esta associação é mais fraca quando se observa o efeito em animais com níveis de hiperqueratose 2B e 2C ao grupo anteriormente mencionado. Estes resultados levam a concluir que tetos com hiperqueratose extrema têm uma maior probabilidade de terem mastite clínica que tetos com hiperqueratose alta, apesar de, em ambos os casos, o risco de infecção estar sempre aumentado face aos animais com níveis baixos ou normais de hiperqueratose. Face a alguns resultados contraditórios de alguns estudos sobre a hiperqueratose e as mastites (Sieber & Farnsworth, 1981; Mein *et al*; 1986; Shearn & Hillerton, 1996), conclui-se que o sistema de avaliação que foi utilizado neste estudo, ao levar em conta a presença de rugosidade no canal do teto, permite avaliar melhor as alterações que têm maior relevância no aparecimento das mastites e que estão relacionadas com uma maior vulnerabilidade do canal do teto aos agentes patogénicos.

Relativamente à existência de associação entre a hiperqueratose e as infecções microbianas, observou-se que os animais com níveis normais de hiperqueratose tinham 2,42 menos risco de ter qualquer tipo de infecção no úbere que animais com níveis altos de hiperqueratose (2B, 2C e 2D). Verificou-se que dois grupos de bactérias ambientais, os *Enterococcus spp* e as

Enterobacteriaceae, estavam associados à presença de hiperqueratose. Os “odds” rácios foram 2,02 e 1,73 respectivamente, porém o intervalo de confiança do “odds” rácio dos *Enterococcus spp* atingia valores ligeiramente inferiores a 1, o que pode ter sido uma consequência de terem sido detectadas menos infecções por este agente. Vários agentes incluídos no grupo das *Enterobacteriaceae* já tinham sido correlacionados com mastites clínicas em tetos com níveis mais altos de hiperqueratose ou com alterações da máquina de ordenha correlacionadas com a hiperqueratose (Neijenhuis *et al*; 2001b).

A presença de hiperqueratose nos animais infectados com *Streptococcus agalactiae* teve uma forte relação, pois o “odds” rácio foi de 5. Porém, como este agente é contagioso, os animais em explorações onde não existe esta infecção não correm risco de infecção, pelo que o “odds” rácio utilizando só animais de explorações com este tipo de infecção foi de 2,76. Esta associação também já tinha sido anteriormente descrita noutros estudos (Falkenberg *et al*; 2003), e poderá ser devida às características desta bactéria, que aumenta a sua infecciosidade quando a taxa de remoção de queratina diminui (Lacy-Hulbert, 1998).

Pankey & Murdough (1998), já tinham observado que algumas bactérias do grupo das *Enterobacteriaceae*, o *Streptococcus agalactiae* e algumas bactérias que se encontram na pele do úbere têm a capacidade de utilizar a queratina do canal dos tetos para proliferarem. Assim, os canais dos tetos com hiperqueratose podem fornecer o substrato para que algumas destas bactérias se multipliquem, aumentando a susceptibilidade do quarto a novas infecções.

Os mecanismos utilizados pelas bactérias para infectar os úberes ainda não estão completamente esclarecidos, características como a capacidade de algumas bactérias se desenvolverem tendo a queratina como substrato, podem desempenhar um papel importante na forma como algumas bactérias podem tirar partida da hiperqueratose do canal dos tetos para causar mastites. Interessa aprofundar o conhecimento sobre a relação das bactérias e a hiperqueratose poder perceber melhor a influência da hiperqueratose sobre a saúde do úbere.

Capítulo VII - Conclusões

Conclui-se pelos resultados deste estudo que a hiperqueratose do canal dos tetos é um problema presente em muitas das explorações observadas.

Verificou-se e de acordo com muita bibliografia que muitos dos factores de risco envolvidos no aparecimento deste problema, estão presentes nas explorações visitadas.

Dos factores ligados às características dos animais como a fase de lactação, o número de lactações, e ainda as características físicas dos tetos como o seu comprimento, a sua forma e posição, demonstraram estar associados com a hiperqueratose observada.

Verificou-se que características como o vácuo de ordenha e a presença de retiradores automáticos, estavam significativamente associadas com a hiperqueratose do canal dos tetos das explorações visitadas. Importa por isso regular os níveis de vácuo das máquinas de ordenha e retirar as tetinas atempadamente, para minimizar a ocorrência da hiperqueratose. A detecção das consequências de um incorrecto maneio e de problemas da máquina de ordenha, são uma das vantagens de aplicar esta avaliação nas explorações.

Na análise dos problemas resultantes da hiperqueratose, verificou-se que, tetos com níveis maiores de hiperqueratose têm um risco maior de sofrerem mastite, clínica ou subclínica.

A relação entre a hiperqueratose e os microrganismos causadores das mastites, não é completamente clara pois ainda se desconhece muito sobre a sua forma de invasão do úbere, mas foi possível observar uma associação entre a hiperqueratose e algumas infecções microbianas, como as causadas por *Enterobactereaceae* e principalmente os *Streptococcus agalactiae* como é referido por alguma bibliografia.

Deste modo, a hiperqueratose demonstrou que é um factor importante na presença de infecções do úbere e a sua avaliação é uma ferramenta fundamental num programa de prevenção de mastites.

Bibliografia

Adams, E. W. & Rickard C. G. 1963. The antistreptococcic activity of bovine teat canal keratin. *American Journal of Veterinary Research* 24:122.

ANIL. 2005. http://www.anilact.com/documentos/dadsec_dgagri.pdf. Consultado em 1 de Junho 2007.

Anónimo. n. d. *Managing milk quality*. 2 Ed. Institut de technologie agroalimentaire de La Proctière, Dairy Farmers of Canada, Fédération des Producteurs de Lait du Québec, Canadian Farm Business Management Council, Gouvernement du Québec, Agriculture and Agri-food Canada, Association des Médecins Vétérinaires Praticiens du Québec. Coordenação P. Lévesque.

Barbano, D. 2004. The role of milk quality in addressing future dairy food marketing opportunities in a global economy. *National mastitis council annual meeting proceedings*. Charlotte. USA. 47-51.

Bitman, J., Wood, D. L., Bright, S. A. & Miller, R. H. 1988. Lipid composition of bovine teat canal keratin. *Journal of Dairy Science*. 71: 1389-1395.

Blowey, R. & Edmondson, P. 2000. *Mastitis Control in Dairy Herds*. Farming Press Books, United Kingdom.

Boast, D., Hale, M., Bennet, M. & Hillerton, J.E. 2003. The milking liner. *Proceedings of the British Mastitis Conference*, Garstang. 35-43.

Bright, S. A., Bitman, J., Capuco, A. V. & Wood, D. L., Miller, R. H. 1990. Methods of collection and lipid composition of teat canal keratin in dry and lactating cows. *Journal of Dairy Science*. 73:98-106.

Broom, D. M. 1991. Animal welfare: concepts and measurement. *Journal Animal Science* 69: 4167-4175.

Bruckmaier, R. M. & Blum, J. W. 1998. Oxytocin release and milk removal in ruminants. *Journal of Dairy Science*. 81: 939-949.

Bruckmaier, R. M., Weinfurter, M. & Weiss, D. 2004 Teat anatomy and teat canal closure: Relationship with milk flow. *National mastitis council annual meeting proceedings*. 132-134.

Burmeister, J. E., Fox, L. K., Hancock, D. D., Gay, C. C., Gay, J. M., Parish, S. M. & Tyler, J. W. 1995. Survey of dairy managers in the pacific northwest identifying factors associated with teat chapping. *Journal of Dairy Science*. 78: 2073-2082.

- Burmeister, J. E., Fox, L. K., Hillers, J. K. & Hancock, D. D. 1998a. A comparison of two methods of evaluation of teat skin pathology. *Journal of Dairy Science*. 81: 1904-1909.
- Burmeister, J. E., Fox, L. K., Hillers, J. K. & Hancock, D. D. 1998b. Effects of premilking and postmilking teat disinfectants on teat skin condition. *Journal of Dairy Science*. 81:1910-1916.
- Burkitt, H. G., Young, B. & Heath, J. W. 1994. *Wheater Histologia Funcional. Guanabara/ Koogan 3ª Ed. Rio de Janeiro. Cap. 9. 153-169.*
- Capuco, A. V., Mein, G. A., Nickerson, S. C., Jack, L. J. W., Wood, D. L., Bright, S. A., Aschenbrenner, R. A., Miller R. H. & Bitman, J. 1994. Influence of pulsationless milking on teat canal keratin and mastitis. *Journal of Dairy Science*. 77: 64-74.
- Capuco, A. V., Wood, D. L., Bright, S. A., Milller, R. H. & Bitman, J. 1990. Regeneration of teat canal keratin in lacting dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 73: 1745-1750.
- Capuco, A. V., Wood, D. L. & Quast, J. W. 2000. Effects of teatcup liner tension on teat canal keratin and teat condition in cows. *Journal of Dairy Research*. 67: 319-327.
- Chrystal, M. A., Seykora, A. J. & Hansen, L. B. 1999. Heritabilities of teat end shape and teat diameter and their relationships with somatic cell score. *Journal of Dairy Science*. 82: 2017-2022.
- Collins R. A., Parsons, K. R., Field, T. R. & Bramley, A. J. 1988. Histochemical localization and possible antibacterial role of xanthine oxidase in the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Research*. 55: 25-32.
- Comalli, M. P., Eberhart, R. J., Griel Jr., L. C. & Rothenbacher, H. 1984. Changes in the microscopic anatomy of the bovine teat canal during mammary involution. *American Journal of Veterinary Research*. 45, 11: 2236-2242.
- Cook, C. 2002. Teat preparation – remove dirt, reduce the risks. *Proceedings of the Brititish Mastitis Conference. Brockworth. 51-57.*
- Dyce, K., Sack, W. & Wensing, C. 1990. *Tratado de anatomia veterinária. Editora Guanabara. Rio de Janeiro. Cap. 21. 477-482.*
- Falkenberg, U., Tenhagen, B., Baumgartner, B., Heuwieser, W. 2003. Relationship between teat duct characteristics and prevalence of intramammary infections with *St. agalactiae* in dairy cows. *National mastitis council annual meeting proceedings. Fort Worth. USA. 300-301.*
- Fawcett, D. W. 1995. *Tratado de Histologia. Interamericana Macgraw-Hill 12ª Ed. Madrid. Cap. 22. 577-610.*

Foret, C., Janowicz, P. & Mckinzie, M. 2004. Mitigation of teat end conditions under adverse weather conditions. National mastitis council annual meeting proceedings. 329-330.

Fox, L. K. 1992. Colonization by *Staphylococcus aureus* on chapped teat skin: effect of iodine and chlorexidine postmilking disinfectants. *Journal of Dairy Science*. 75: 66-71.

Fox, L. K. & Cumming, M. S. 1996. Relationship between thickness, chapping and *Staphylococcus aureus* colonization of the bovine teat tissue. *Journal of Dairy Research*. 63: 369-375.

Fox, L. K., Nagy J. A., Hilters J. K., Cronrath J. D. & Ratkowsky D. A. 1991. Effects of postmilking teat treatment on the colonization of *Staphylococcus aureus* on chapped teat skin. *American Journal of Veterinary Research*. 52, 6: 799-802.

Fuhrmann, T. J. 2002. Quality milk starts with quality management. National mastitis council annual meeting proceedings. 131-139.

Galton, D. M., Adkinson, R. W., Thomas, C. V. & Smith, T. W. 1982. Effects of premilking udder preparation on environmental bacterial contamination of milk. *Journal of Dairy Science*. 65: 1540-1543.

Galton, D. M., Petersson, L. G. & Merrill, W. G. 1986. Effects of premilking udder preparation practices on bacterial counts in milk and on teats. *Journal of Dairy Science* 69: 260-266.

Galton, D. M., Petersson, L. G., Merrill, W. G., Bandler, D. K. & Shuster, D. E. 1984. Effects of premilking udder preparation on bacterial population, sediment, and iodine residue in milk. *Journal of Dairy Science*. 67: 2580-2589.

Geisecke, W. H., Gerneke, W. H. & Van Rensburg, I. B. J. 1972. The morphology of the bovine teat canal. *Journal of South African Veterinary Association*. 43: 351-354.

Geishauser, T. & Querengasser, K. 2000. Investigation on teat length in teats with milk flow disturbances. *Journal of Dairy Science*. 83: 1976-1980.

Gleeson, D. E., Kilroy, D., O`Callaghan, E., Fitzpatrick, E. & Rath, M. 2003. Effect of machine milking on bovine teat sinus injury and teat canal keratin. *Irish Veterinary Journal*. 56: 46-50.

Grindal, R. J., Walton, A. W. & Hillerton, J. E. 1991. Influence of milk flow rate and streak canal length on new inflammatory infection in dairy cows. *Journal of Dairy Research*. 58: 383-388.

Hamann, J. 2000. Teat tissue resistance mechanisms with special regard to machine milking. Proceedings IDF symposium on immunology of ruminant mammary gland. Stresa. Italy. 102-111.

- Hamann, J., Mein, G. A. & Wetzel, S. 1993. Teat tissue reactions to milking: Effects of vacuum level. *Journal of Dairy Science*. 76: 1040-1046.
- Hamann, J., Burnevich, C. Mayntz, M., Ostteras, O. & Halder, W. 1994. 2. Machine induced changes in the status of the bovine teat with respect to the new infection risk. *Bulletin of the IDF*: 297: 13-22.
- Hamann, J. & Mein, G. A. 1996. Teat thickness changes may provide biological test for effective pulsation. *Journal of Dairy Research*. 63: 179-189.
- Hamann, J. 2002. Milk quality and udder health in relation to modern milking technique. *Proceedings XXII World buiatrics congress*. Hannover. Germany. 334-345.
- Hamann, J. & Zecconi, A. 2003. Machine effects on cytological defence mechanisms in the teat tissue. *Proc. IDF World dairy summit & centenary*. Bruges. Belgium. 469-474.
- Hemling, T. C. 2002. Teat condition – Prevention and cure through teat dips. *Proceedings of the British Mastitis Conference*. Brockworth Institute for animal health/ Milk development council. 1-14.
- Hillerton, J.E., Morgan, W. F., Farnsworth, R., Neijenhuis, F., Baines, J. R., Mein, G. A., Ohnstad, I., Reinemann, D. J. & Timms, L. 2001 Evaluation of bovine teat condition in commercial dairy herds: 2. Infectious factors and infections. *Second international symposium on mastitis and milk quality proceedings*. 13-15 September, Vancouver, BC, Canada. 352-356.
- Hillerton, J. E., Boast, D., Middleton, N. & Ohnstad, I. 2003. Changes in milking liner performance with age. *Proc. IDF world dairy summit & centenary. Conference on 100 years of liners and pulsators*. 7-12 September Bruges, Belgium. 455-462.
- Hoe, F. G. H. & Ruegg, P. L. 2006. Opinions and practices of Wisconsin dairy producers about biosecurity and animal well-being. *Journal of Dairy Science* 89: 2297-2308
- Hogan, J. S., Smith K. L., Todhunter, D. A. & Schoenberger, P. S. 1988. Growth responses of environmental mastitis pathogens to long-chain fatty acids. *Journal of Dairy Science* 71: 245-249.
- Hogan, J. S., Pankey, J. W. & Duthei, A. H. 1987. Growth inhibition of mastitis pathogens by long-chain fatty acids. *Journal of Dairy Science* 70: 927-934.
- Hospes, R., Seeh, C. 2000. *Ecografia y Endoscopia de la Ubre de la Vaca. Principios Fundamentales – Ecografia – Volumen I*. Temis Pharma S. L. Rambla Catalunya. Barcelona. 9-12.

House, H. K. Rodenburg, J., Lang, B. R. 2003. The effect of neck rail and mounting rail position on cow behavior. www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/dairy/facts/info_cowbwhav.htm. Consultado em 26-08-2007.

Hutton, C. T., Fox, L. K. & Hancock, D. D. 1990. Mastitis control practices: Differences between herds with high and low milk somatic cell counts. *Journal of Dairy Science* 73: 1135-1143.

Inst. Nac. Meteorologia. <http://www.meteo.pt/pt/clima/clima.jsp>. Consultado em 01-07-2007

Iziak, E., Araya, J. P. 2006. Evolution of sanitizing cloth towels method for premilking udder preparation. National mastitis council annual meeting proceedings. Tampa. USA. 266-267.

Jorstad, A., Farver, T. B. & Reimann, H. 1989. Teat canal diameter and other factors with possible influence on somatic cell counts in cow milk. *Acta vet. Scand.* 30: 239-245

Junqueira, L. C. & Carneiro J. 1995. *Histologia Básica*. Guanabara/ Koogan 8ª Ed. Rio de Janeiro. Cap. 18. 301-312.

Klaas, I. C., Enevoldsen, C., Ersbøll, A. K. & Tölle, U. 2005. Cow-related risk factors for milk leakage. *Journal of Dairy Science*. 88: 128-136.

Klaas, I. C., Enevoldsen, C., Vaarst, M. & Houe, H. 2004. Systematic clinical examinations for identification of latent udder health types in Danish dairy herds. *Journal of Dairy Science*. 87: 1217-1228.

Korhonen, H., Marnila, P. & Gill, H. S. 2000. Milk immunoglobulins and complement factors. *British Journal of Nutrition*. 84 Suppl. 1: S75-S80.

Lacy-Hulbert, S. J. 1998. Physical characteristics of teat canal and the relationship with infection. National mastitis council annual meeting proceedings. 54-61.

Lacy-Hulbert, S. J. & Hillerton, J. E. 1995. Physical characteristics of the bovine teat canal and their influence on susceptibility to streptococcal infection. *Journal of Dairy Research*. 62: 395-404.

Lacy-Hulbert, S. J., Hillerton, J. E. & Woolford, M. W. 1996. Influence of pulsationless milking on teat canal keratin growth and turnover. *Journal of Dairy Research*. 63: 517-524.

Langlois, B. E., Jr. Cox, J. S., Hemken, R. H. & Jr. Nicolai, J. 1981. Milking vacuum influencing indicators of udder health. *Journal of Dairy Science*. 64: 1837-1842.

- Leblanc, S. J., Lissemore, K. D., Kelton, D. F., Duffield, T. F., Leslie, K. E. 2006. Major advances in disease prevention in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 89: 1267-1279.
- Leonard, F. C., O`Connell, J. M. & O`Farrell, K. J. 1997. Housing conditons and foot lesions in friesland hiefers. *Proceedings of V Livestock Enviroment International Symposium*. 250-257.
- Leslie, K. E., Dingwell, R. T. 2002. Mastitis control: where are we and where are we going? *Proceedings XXII World buiatrics congress*. Hannover. Germany. 370-382
- Lewis, S. 2000. The likelihood of subclinical mastitis in quarters with different types of teat lesions in dairy cows. *BCVA Cattle practice*. 8, part. 3: 293-299.
- Ma, Y., Ryan, C., Barbano, D. M., Galton, D. M., Rudan, M. A. & Boor, K. J. 2000. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*. 83: 264-274.
- McDonald. J.S. 1976. Radiographic method for anatomic study of the teat canal: Changes between milking periods. *American Journal of Veterinary Research*. 36: 1241.
- Mein G. A., Thiel, C. C. & Akam, D. N. 1973. Mechanics of the teat and teatcup liner during milking: information from radiographs. *Journal of Dairy Research* 40: 179-189.
- Mein, G. A., Brown, M. R. & Williams, D. M. 1986. Effects on mastitis of overmilking in conjunction with pulsation failure. *Journal of Dairy Research*. 53: 17-22.
- Mein, G. A., Williams, D. M. 1987. & Thiel C. C. 1987. Compressive load applied by the teatcup liner to the bovine teat. *Journal of Dairy Research*. 54: 32-337.
- Mein, G. A., Neijenhuis, F., Morgan, W. F., Reinemann, D. J., Hillerton, J.E., Baines, J. R., Ohnstad, I., Rasmussen, M. D., Timms, L., Britt, J. S., Farnsworth, R., Cook, N. & Hemling, T. 2001. Evaluation of bovine teat condition in commercial dairy herds: 1. Non-infectious factors. *Second international symposium on mastitis and milk quality proceedings*. Vancouver, BC, Canada. 347-351.
- Mein, G., Williams, D. & Reinemann, D. 2003a. Effects of milking on teat end hyperkeratosis: 1. Mechanical forces applied by the teatcup liner and responses of the teat. *National mastitis council annual meeting proceedings*. Fort worth. USA. 114-123.
- Mein, G., Reinemann, D., O`Callaghan, E. & Ohnstad, I. 2003b. Where the rubber meets the teat and what happens to milking characteristics. *IDF world*

dairy summit & centenary proceedings. Conference on 100 years of liners and pulsators. Bruges, Belgium. 431-438.

Mein, G., Reinemann, D., Shuring, N. & Ohnstad, I. 2004. Milking machines and mastitis risk: a storm in a teatcup. National mastitis council annual meeting proceedings. Charlotte. USA. 176-188.

Mein, G. 2006. The contribution of science to progress in machine milking. National mastitis council annual meeting proceedings. Tampa. USA. 168-176.

Moroni, P., Beltrame, S., Casale, P., Gnemmi, G., Pisoni, G. & Spreafico, G. 2004. Evaluation of bovine teat lesions in mountain Italian dairy herds. National mastitis council annual meeting proceedings. Charlotte. USA. 343-344

Morse, D., Delorenzo, M.A., Wilcox, C. J., Collier, R. J., Natzke, R. P. & Bray, D. R. 1988. Climatic effects on occurrence of clinical mastitis. Journal of Dairy Science. 71: 848-853.

Moxley, J. E., Kennedy, B. W., Downey, B. R. & Bowman, J. S. T. 1978. Survey of milking hygiene practices and their relationships to somatic cell counts and milk production. Journal of Dairy Science. 61: 1636-1644.

Murphy, J. M. 1959. The effect of certain mild stresses to the bovine teat canal on infection with *Streptococcus agalactiae*. Cornell Vet. 49: 411- 421.

National Mastitis Council. 1999. Laboratory handbook on bovine mastitis. Revised Ed. National Mastitis Council, Inc. 2820 Walton Commons West. Madison. Wisconsin.

National Mastitis Council. n. d. Recommended mastitis control program. www.nmconline.org/docs/NMCchecklistINT.pdf. Consultado em 01-06-2007.

Neijenhuis, F., Barkema, H. K., Hogeveen, H. & Noordhuizen, J. P. T. M. 2000. Classification and longitudinal examination of callused teat ends in dairy cows. Journal of Dairy Science. 83: 2795-2804.

Neijenhuis, F., Barkema, H. W., Hogeveen, H. & Noordhuizen, J. P. T. M. 2001a. Relationship between teat-end callosity and occurrence of clinical mastitis. Journal of Dairy Science. 84: 2664-2672.

Neijenhuis, F., Klungel, G. H. & Hogeveen, H. 2001b. Recovery of cow teats after milking as determined by ultrasonographic scanning. Journal of Dairy Science. 84: 2599-2606.

Neijenhuis, F., Mein, G. A., Britt, J. S., Reinemann, D. J., Hillerton, J.E., Farnsworth, R., Baines, J. R., Hemling, T., Ohnstad, I., Cook, N., Morgan, W. F. & Timms, L. 2001c. Evaluation of bovine teat condition in commercial dairy herds: 4. Relationship between teat end callosity or hyperkeratosis and mastitis. Second international symposium on mastitis and milk quality proceedings. Vancouver, BC, Canada. 362-366.

Neijenhuis, F., Hillerton, J.E., Paulrud, C. O., Rasmussen, M. D. & Baines, J. R. 2004. Teat condition and mastitis. National mastitis council annual meeting proceedings. Charlotte. USA.122-131.

Newbould, F. H. & Neave, F. K. 1965. The effect of inoculating the bovine teat duct with small numbers of *Staphylococcus aureus*. Journal of Dairy Research. 32: 171-179.

Nickerson, S. C. 1998. Teat end interactions with germicides. National mastitis council annual meeting proceedings. 67-73.

Nickerson, S. C. & Pankey, J. W. 1983. Cytological observations of the bovine teat end. American Journal Veterinary Research. 44: 1433-1441.

Nickerson, S. C. & Pankey, J. W. 1984. Neutrophil migration through teat end tissues of bovine mammary quarters experimentally challenged with *Staphylococcus aureus*. Journal of Dairy Science. 67: 826-834.

ISO 6690. 1996. Milking machine installations – Mechanical tests. Second edition.

Oldham, E. R., Eberhart R. J., Lange B. S. & Brusio S. L.. 1991. Changes in the bovine teat canal during the nonlactating period and early lactation, as measured by teat canal impressions. American Journal Veterinary Research. 52: 2075-2079.

Olney, G. R. & Mitchell, R. K. 1983. Effect of milking machine factors on the somatic cell count of milk from cows free of intramammary infection - II Vacuum level and overmilking. Journal of Dairy Research. 50: 141-148.

Ohnstad, I. 1998. Machine milking and well-being of the dairy cow. Proceedings of the British Mastitis Conference. 62-67.

Pankey, J. W., Eberhart, R. J., Cuming, A. L., Daggett, R. D., Farnsworth, R. J. & McDuff, C. K. 1984. Uptake on postmilking teat antisepsis. Journal of Dairy Science. 67: 1336-1353.

Pankey, J. W. & Murdough, P. A. 1998. Bacteria – keratin interactions. National mastitis council annual meeting proceedings. 62-66.

Paulrud, C. O. 2003. Teat canal associated defence mechanisms against mastitis. PhD thesis. The Royal Veterinary and Agricultural University. Copenhagen. Denmark.

Paulrud, C. O. & Rasmussen, M. D. 2003. Infra-red thermography as tool to evaluate the influence of liner characteristics and over-milking. Proc. IDF world dairy summit & centenary. Conference on 100 years of liners and pulsators. Bruges, Belgium. 475-479.

- Paulrud, C. O. & Rasmussen, M. D. 2004. Teat thermography, hot or not. . National mastitis council annual meeting proceedings. Charlotte. USA. 159-168.
- Poelarends, J. J., Hogeveen, H., Sampimon, O. C. & Miltenburg, J. D. 2000. Dairy cow characteristics related to heat stress response. Proceedings IDF symposium on immunology of ruminant mammary gland. Stresa. Italy. 145-151.
- Prasad, L. B. M. & Newbould F. H. S. 1968. Inoculation of bovine teat duct with *Staphylococcus aureus*: the relationship of teat duct length, milk yield and milkingrate to developmente of intramammary infection. Canadian Veteterinary Journal. 9: 107.
- Radostitis, O. M., Leslie, K. E. & Fetrow, J. 1994. Herd health – Food animal production medicine. 2^a Ed., W. B. Saunders Company. Cap. 9. 229-273.
- Rasmussen, M. D. 2004. Overmilking and teat condition. National mastitis council annual meeting proceedings. Charlotte. USA. 169-174.
- Rasmussen, M. D., Baines, J., Neijenhuis, F. & Hillerton, E. 2003. Teat condition and mastitis Proc. IDF World dairy summit & centenary. Conference on 100 years of liners and pulsators. Bruges. Belgium. 463-468.
- Rasmussen, M. D., Frimer, E. S. & Decker, E. L. 1994. Reverse pressure gradients across the teat canal related to machine milking. Journal of Dairy Science. 77: 984-993.
- Rasmussen, M. D., Frimer, E. S., Galton, D. M. & Peterson, L. G. 1992. The influence of premilking teat preparation and attachment delay on milk yield and milking performance. Journal of Dairy Science. 75: 2131-2141.
- Rasmussen, M. D. & Hemling, T. C. 2002. The influence of automatic teat spraying on teat condition. National mastitis council annual meeting proceedings. Orlando. USA. 166-167.
- Rasmussen, M. D. & Larsen, H. D. 1998. The effect of post-milking teat dip and suckling on teat condition, bacterial colonisation, and udder health. Acta Veterinaria Scandinavica. 39, 4: 443-452.
- Reinemann, D. J. Rasmussen, M. D., LeMire, S., Neijenhuis, F., Mein, G. A., Hillerton, J.E., Morgan, W. F., Timms, L., Cook, N., Farnsworth, R. & Hemling, T. 2001. Evaluation of bovine teat condition in commercial dairy herds: 3. Getting the numbers right. Second international symposium on mastitis and milk quality proceedings. Vancouver, BC, Canada. 357-361.
- Reinemann, D. J., Davis, M. A., Costa, D. & Rodriguez, A. C. 2001b. Effects of milking vacuum on milking performance and teat condition. Proceedings of the 2nd International Symposium on Mastitis and Milk Quality. 367-371
- Reneau, J. K. 2001. Prepping cows: who needs it? National mastitis council-PDPW Milk Quality Conference proceedings. 33-42.

Rogers, G. W. & Spencer, S. B. Relationships among udder and teat morphology and milking characteristics. *Journal of Dairy Science*. 74: 4189-4194.

Ruegg, P. 2003. The role of hygiene in efficient milking. www.uwes.edu/milkquality/PDF/The%20Role%20of%20Hygiene%20in%20Efficient%20Milking.pdf. Consultado em 01-06-2008.

Sandholm, M., Honkanen-Buzalski, T., Kaartinen, L. & Pyörälä, S. 1995. The bovine udder and mastitis. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine.

Santos, M. V., Ma, Y. & Barbano, D. M. 2003. Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fluid milk during shelf-life storage. *Journal of Dairy Science*. 86: 2491-2503.

Schukken, Y. H., Petersson, L. G. & Rauch, B. J. 2006. Liners and teat end health. National mastitis council annual meeting proceedings. Tampa. USA. 183-196.

Seykora, A. J. & Mcdaniel, B. T. 1985. Heritabilities of teat traits and their relationships with milk yield, somatic cell count, and percent two-minute milk. *Journal of Dairy Science*. 68: 2670-2683.

Seykora, A. J. & Mcdaniel, B. T. 1986. Genetics statistics and relationships of teat and udder traits, somatic cell counts, and milk production. *Journal of Dairy Science*. 69: 2395-2407.

Shearn, M. & Hillerton, J. E. 1996. Hiperkeratosis of the teat duct orifice in the dairy cow. *Journal of Dairy Research*. 63: 525-532.

Sieber, R. L. & Farnsworth, R. J. 1981. Prevalence of chronic teat-end lesions and their relationship to intramammary infection in 22 herds of dairy cattle. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 178, 12: 1263-1267.

Sieber, R. L. & Farnsworth, R. J. 1984. Differential diagnosis of the bovine teat lesions. *Veterinary Clinics of North America: Large Animal Practice*. 6, 2: 313-321.

Smith, P. 1996. Large animal internal medicine. 2^a ed. Mosby. Cap. 34. 1177-1197.

Sordillo, L. M., Shafer-Weaver, K. & Derosa, D. 1997. Immunobiology of the mammary gland. *Journal of Dairy Science*. 80: 1851-1865.

Spencer, S. B. & Volz, C. 1990. Measuring milking machine liner slips. *Journal of Dairy Science*. 73: 1000-1004.

Timms, L. 2004. Winter conditions and teat health: Why and what to do. National mastitis council annual meeting proceedings. Charlotte. USA. 143-158.

Timms, L., Faust, M., Ackermann, M. & Kehrli, M. 1998a. A year in the life of a teat end. National mastitis council annual meeting proceedings. 74-74d.

Timms, L., Van der Mateen, M. L., Kehrli Jr., M. E. & Ackermann, M. R. 1998b. Histologic features and results of virus isolation tests of tissues obtained from teat lesions that developed in dairy cattle during winter. Journal of American Veterinary Medical Association. 213, 6: 862-865.

Van der Mewe, N. J. 1985. Some observations on the morphology of the bovine teat canal (ductus papillaris mammae). Journal of South African Veterinary Association. 56, 1: 13-16.

Velasco, R. O. A., Vuelta, R. F., Baro de la Fuente, J. A. & Garcia, M. A. P. Relacion entre nivel de vacío, sobrepresión y fuerzas de colapso de las pezoneras con la condición de los pezones. http://www.portalechero.com/ver_items_descrip.asp?wVarItem=591.

Consultado em 01-02-2007

Wang, H. & Hurley, W. L. 1998. Identification of lactoferrin complexes in bovine mammary secretions during gland involution. Journal of Dairy Science. 81:1896-1903.

Weiss, D. & Bruckmaier, R. M. 2004. Optimization of individual prestimulation in dairy cows. Journal of Dairy Science. 88: 137-147.

Weiss, D., Weinfurtner, M. & Bruckmaier, R. M. 2004. Teat anatomy and its relationship with quarter and udder milk flow characteristics in dairy cows. Journal of Dairy Science. 87: 3280-3289.

Williams, D. M., Mein, G. A. & Brown, M. B. 1981. Biological responses of the bovine teat to milking: information from measurements of milk flow rate within single pulsation cycles. Journal of Dairy Research. 48: 7-21.

Williams, D. M. & Mein, G. A. 1986. The bovine teat canal: information for measurement of velocity of milk flow from the teat. Journal of Dairy Research. 53: 179-185.

Wilson, D. J., Gonzalez, R. N., Southwick, L. H. & Guard, C. L. 2000. Evaluation of an experimental milking pulsation system for effects on milking and udder health. Journal of Dairy Science. 83: 2004-2007.

Wood, D. L., Bright, S. A., Roche, A., Pankey, J. W., Miller, R. H. & Bitman, J. 1988. Lipid composition of teat canal keratin from lactating Jersey and Holstein cows. Journal of Dairy Science. 71. Suppl. 1:245 p. 16.

Zdanowicz, M., Shelford, J. A., Tucker, C. B., Weary, D. M. & Von Keyserling, M. A. G. 2004. Bacterial populations on teat ends of dairy cows housed in free

stalls and bedded with either sand or sawdust. *Journal of Dairy Science*. 87: 1694-1701.

Zecconi, A., Hamann, J., Bronzo, V. & Rufo, G. 1992. Machine induced teat tissue reactions and infection risk in a dairy herd free from contagious mastitis pathogens. 59: 265-271.

Zecconi, A. & Hamann, J. 2004. Machine effects on cytological defence mechanisms in the teat tissue. National mastitis council annual meeting proceedings. Charlotte. USA. 135-142

Zecconi, A. & Smith, K. L. 2000. IDF position paper on ruminant mammary gland immunity. Symposium on immunology of ruminant mammary gland. Stresa. Italy.

ANEXO I

Inquérito realizado para caracterização das explorações e dos factores de risco para a hiperqueratose

ANEXO II

Variáveis binomiais

Tabela 8: Variáveis binomiais

Variáveis	Unidade epidemiológica	Classe referência	Classe teste
Pulsação	Vaca	Animais expostos a pulsação sem anomalias	Animais expostos a pulsação com anomalias
Sobreordenha	Vaca	Não se praticava sobreordenha	Fazia-se sobreordenha de uma forma generalizada
Esgotamento	Vaca	Não se efectuava esgotamento	Efectuava-se esgotamento regularmente
Desinfectante	Vaca	Não se efectuava desinfectação após a ordenha	Efectuava-se desinfectação após a ordenha
Higiene	Vaca	Estábulo em boas condições de higiene	Estábulo em más condições de higiene
Retiradores automáticos	Vaca	Máquina de ordenha equipada com retiradores automáticos	Máquina de ordenha sem retiradores automáticos
Nr lactações	Vaca	Vacas na 1ª lactação	Vacas com 2 ou mais lactações
Idade tetinas	Vaca	Tetinas com menos de 6 meses de idade	Tetinas com mais de 6 meses de idade
Vácuo tetinas	Vaca	Vácuo nas tetinas inferior a 45 kPa	Vácuo nas tetinas superior a 45 kPa
Dias de lactação 94	Vaca	Vacas com menos de 94 dias de lactação	Vacas com 94 dias de lactação ou mais
Produção leiteira 10 L	Vaca	Vacas com produções leiteiras por ordenha inferiores a 10 litros	Vacas com produções leiteiras por ordenha maior ou igual a 10 litros
Produção leiteira 13 L	Vaca	Vacas com produções leiteiras por ordenha inferiores a 13 litros	Vacas com produções leiteiras por ordenha maior ou igual a 13 litros
Produção leiteira 16 L	Vaca	Vacas com produções leiteiras por ordenha inferiores a 16 litros	Vacas com produções leiteiras por ordenha maior ou igual a 16 litros
Tetos anteriores Vs posteriores	Tetos	Tetos posteriores	Tetos anteriores
Forma invertidos Vs lisos	Tetos	Tetos com forma invertida	Tetos com forma lisa
Forma invertidos Vs redondos	Tetos	Tetos com forma invertida	Tetos com forma redonda
Forma invertidos Vs pontiagudos	Tetos	Tetos com forma invertida	Tetos com forma pontiaguda
Comprimento 5 cm.	Tetos	Tetos com comprimento inferior a 5 cm.	Tetos com comprimento maior ou igual a 5 cm.
Estaf. Coag. Neg.	Vaca	Vacas sem infecção por estafilococos coagulase negativos	Vacas infectadas com estafilococos coagulase negativos
<i>Corynebacterium spp</i>	Vaca	Vacas sem infecção <i>Corynebacterium spp</i>	Vacas infectadas com <i>Corynebacterium spp</i>
Cult. Negativas	Vaca	Vacas sem infecção do úbere	Vacas infectadas
<i>Enterococcus spp</i>	Vaca	Vacas sem infecção por <i>Enterococcus spp</i>	Vacas infectadas com <i>Enterococcus spp</i>
<i>Strept. Spp</i>	Vaca	Vacas sem infecção por <i>Streptococcus spp</i>	Vacas infectadas com <i>Streptococcus spp</i>
<i>Enterobactereaceae</i>	Vaca	Vacas sem infecção por <i>Enterobactereaceae</i>	Vacas infectadas com <i>Enterobactereaceae</i>
<i>Staph. aureus</i>	Vaca	Vacas sem infecção por <i>Staph. aureus</i>	Vacas infectadas com <i>Staph. aureus</i>
<i>Strept. agalactiae</i>	Vaca	Vacas sem infecção por <i>Strept. agalactiae</i>	Vacas infectadas com <i>Strept. agalactiae</i>
Expl. <i>Staph. aureus</i>	Vaca	Vacas sem infecção por <i>Staph. aureus</i> em explorações com <i>Staph. aureus</i>	Vacas infectadas com <i>Staph. aureus</i> em explorações com <i>Staph. aureus</i>
Expl. <i>Strept. agalactiae</i>	Vaca	Vacas sem infecção por <i>Strept. agalactiae</i> em explorações com <i>Strept. agalactiae</i>	Vacas infectadas com <i>Strept. agalactiae</i> em explorações com <i>Strept. agalactiae</i>

ANEXO III

Agrupamentos de agentes patogénicos

Tabela 9: Agrupamentos de agentes patogênicos

Grupos de identificação	Nome das espécies e dos grupos de microrganismos agrupados
<i>Bacillus spp</i>	<i>Bacillus spp</i>
CONTAMINADA	
<i>Corynebacterium spp</i>	<i>Corynebacterium spp</i>
CULTURAS NEGATIVAS	
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter amnigen</i>
	<i>Enterobacter cloacae</i>
	<i>Enterobacteriaceae</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Escherichia ferguson</i>
	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	<i>Klebsiella pneum.pneumoniae</i>
	<i>Klebsiella spp</i>
	<i>Serratia marcescens</i>
	<i>Raoultella ornithino</i>
	<i>Citrobacter freundii</i>
	<i>Citrobacter koseri</i>
	<i>Buttiauxella agrestii</i>
<i>Enterococcus spp</i>	<i>Enterococcus cecorum</i>
	<i>Enterococcus faecalis</i>
	<i>Enterococcus faecium</i>
	<i>Enterococcus hirae</i>
	<i>Enterococcus sacchar</i>
	<i>Enterococcus spp</i>
Estaf.coag.neg	<i>Staphylococcus chromogenes</i>
	<i>Staphylococcus spp</i>
	<i>Staphylococcus xylosus</i>
	Estaf.coag.neg
Gram negativas não enterobactereaceas	<i>Ps. Fluorescens</i>
	<i>Pseudomonas aerugino</i>
	<i>Pseudomonas putida</i>
	<i>Pseudomonas spp</i>
	<i>Moraxella spp</i>
Leveduras	Leveduras
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Prototheca spp</i>	<i>Prototheca spp</i>
<i>Streptococcus spp</i>	<i>Lactococcus garvieae</i>
	<i>Lactococcus spp</i>
	<i>Str.hyointestinalis</i>
	<i>Streptococcus canis</i>
	<i>Streptococcus alacto</i>
	<i>Streptococcus dys.dysgactiae</i>
	<i>Streptococcus dys.eq</i>
	<i>Streptococcus spp</i>
	<i>Streptococcus thoral</i>
	<i>Streptococcus uberis</i>
	<i>Vagococcus fluvialis</i>
	<i>Aerococcus viridans</i>